
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

VOLUMEN 37
NUMEROS 1-2
ENERO-JUNIO, 1984



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

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

Vicedirector

Dr. César Nombela, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

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

Dr. Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia.

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.

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

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

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
28006 Madrid (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
28006 Madrid (España)

ISSN: 0026-2595

Depósito Legal M.702.-1958

CASTELLANA INDUSTRIAS GRAFICAS.—ALEJANDRO VILLEGAS, 25 - 28033-MADRID

I N D I C E

	Página
Plásmidos-R albergados en cepas nosocomiales de <i>Serratia marcescens</i> : espectro de huésped y estabilidad, F. J. Méndez, M. ^a Carmen Mendoza, J. Llana y C. Hardisson (**)	1
Morfología del endofito de la inoculación cruzada <i>Elaeagnus angustifolia</i> × <i>Alnus glutinosa</i> , F. Bermúdez de Castro, P. Yuste y C. Ascaso (*)	9
Estudio de bacterias halófilas extremas aisladas de hábitats salinos no litorales, J. Soliveri, M. E. Arias y F. Laborda (*)	17
Estudio e identificación de microorganismos en el río Henares, M. A. Lapeña, M. E. Arias y F. Laborda (*)	27
Componentes aromáticos de la fermentación alcohólica del Jerez, M. A. Alvarez-Batista y E. García-Maiquez (*)	39
Actividad inmunomoduladora en el género <i>Myxococcus</i> , C. Ruiz, G. Alvarez de Cienfuegos, A. Ramos-Cormenzana y A. Ruiz-Bravo (*)	47
Efecto de las bacterias orofaríngeas sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Mycoplasma orale</i> , C. Martín-Bourgon, J. A. Sáez y J. Casal (**)	55
Libros recibidos, Gonzalo Sierra y A. Ramos-Cormenzana (*)	65

(*) En español.

(**) En inglés.

I N D E X

	Page
R-plasmids carried by nosocomial strains of <i>Serratia marcescens</i> : host range and stability, F. J. Méndez, M. ^a Carmen Mendoza, J. Llana and C. Hardisson (**)	1
Endophyte morphology of the cross-inoculation <i>Elaeagnus agustifolia</i> × <i>Alnus glutinosa</i> , F. Bermúdez de Castro, P. Yuste and C. Ascaso (*)	9
Study of extreme halophilic bacteria isolated from non-litoral salty habitats, J. Soliveri, M. E. Arias and F. Laborda (*)	17
Study and identification of microorganisms in the Henares river, M. A. Lapeña, M. E. Arias and F. Laborda (*)	27
Aromatic components in the alcoholic fermentation of Sherry wine, M. A. Alvarez-Batista and E. García-Maiquez (*)	39
Immunomodulation by the genus <i>Myxococcus</i> , C. Ruiz, G. Alvarez de Cienfuegos, A. Ramos-Cormenzana and A. Ruiz-Bravo (*)	47
Effect of oral bacteria on the <i>in vitro</i> growth of <i>Mycoplasma orale</i> , C. Martín-Bourgon, J. A. Sáez and J. Casal (**)	55
Received books, Gonzalo Sierra and A. Ramos-Cormenzana (*)	65

(*) In Spanish.

(**) In English.

R-PLASMIDS CARRIED BY NOSOCOMIAL STRAINS OF *SERRATIA MARCESCENS*: HOST RANGE AND STABILITY

F. J. MENDEZ ^(a), M.^a CARMEN MENDOZA ^(b), J. LLANEZA ^(b)
and C. HARDISSON ^(b)

^(a) Servicio de Microbiología, Ciudad Sanitaria «Nuestra Señora de Covadonga», Oviedo

^(b) Departamento Interfacultativo de Microbiología, Universidad de Oviedo

(Aceptado: 2 de enero de 1984)

SUMMARY

We have studied three properties related with the dissemination of R-plasmids such as host range, frequency of transfer and stability in twelve types of R-plasmids carried by nosocomial strains of *Serratia marcescens*. Two of the plasmids were transferred only to strains of the same species and to *Escherichia coli* at frequencies lower than 10^{-7} ; another five plasmids were transferred to different species of Enterobacteriaceae at frequencies ranging from 10^{-5} to $< 10^{-7}$. Two plasmids were transferred to *Vibrio* and another two to *Pseudomonas*. All plasmids showed more stability in the original hosts than in the transconjugants when refrigerated in complex or minimal media. Some of the plasmids interfere with prodigiosin synthesis in *S. marcescens*.

RESUMEN

Se estudian, *in vitro*, tres propiedades relacionadas con el poder de diseminación de los plásmidos de resistencia: espectro de huésped, frecuencia de transferencia y estabilidad. La muestra estudiada incluyó doce variedades de plásmidos, albergados en cepas nosocomiales de *Serratia marcescens* procedentes de un hospital. Los diferentes plásmidos presentaron diferente espectro de huésped: dos fueron transferidos solamente a estirpes de su misma especie y a *Escherichia coli* a frecuencias menores de 10^{-7} ; seis a diferentes especies de Enterobacteriaceae a frecuencias entre 10^{-5} y $< 10^{-7}$; dos a Enterobacteriaceae y a *Vibrio parahaemolyticus* y otros dos a Enterobacteriaceae y a *Pseudomonas*, a frecuencias $\leq 5 \cdot 10^{-7}$. Los plásmidos se mostraron muy estables en sus huéspedes originales, especialmente cuando eran almacenados.

dos bajo refrigeración en medios ricos, aunque algunos de ellos se perdían cuando el almacenamiento se hacía en medio mínimo. Todos ellos mostraron una estabilidad menor en los clones transconjugantes. Algunos de los plásmidos interferían con la síntesis de prodigiosina en *S. marcescens*.

INTRODUCTION

A hospital may be considered in an epidemiological context as a reservoir of R-plasmids harbored by an opportunistic or pathogen pool of bacteria. The maintenance and dissemination of the resistance depends essentially on the antibiotic pressure, which promotes clonal selection of resistant strains, and some other properties of the plasmids such as stability, host range, mechanism of transmission between bacterial populations, frequency of transfer and capacity to insert and to maintain new determinants of resistance.

In previous works (9-10, 15), we have reported that different R plasmids were established in bacterial populations of *Serratia marcescens* coming from the same hospital environment, (C.S. Nuestra Señora de Covadonga. Oviedo, Spain). All these strains were multiresistant, and contained one or more plasmids, some of which could be visualized and partially characterized. We have described different types of conjugative R plasmids in relation to their phenotype and molecular weight, and some of them have been classified in incompatibility groups (10). Six of them were transferred from *S. marcescens* to *Escherichia coli* by conjugation in different biological fluids of human origin (8), and two of them codified for fosfomicin resistance (9-10, 15). In the present

work we studied the host range and the stability *in vitro* of ten of these plasmids coming from nine strains of *S. marcescens* isolated from clinical specimens.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The nine *Serratia marcescens* strains used in this work (table 1) were isolated from patients of the Ciudad Sanitaria Nuestra Señora de Covadonga (Oviedo, Spain) between 1975-1979. Recipients used were mutant resistant to 100 µg/ml of rifampicine of the following strains: *Escherichia coli* K12 W3110; *Citrobacter freundii* CECT(*) 409; *Enterobacter aerogenes* CECT 196; *S. marcescens* CECT 159; *Proteus vulgaris* CETC 167 *Pseudomonas maltophilia* ATCC(**) 13637; and plasmid-free clinical isolates of *Shigella sonnei*; *Salmonella paratyphi B*; *P. mirabilis*; *P. aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus*.

Antibiotic susceptibility testing

Resistance to antibiotics was determined by the disk diffusion method, and minimal inhibitory concentration by the agar dilution

(*) Colección Española de Cultivos-Tipo.

(**) American Type Culture Collection.

Table 1. Relevant characteristics of the clinical isolates of *S. marcescens* and their R-plasmids

Clinical isolates			R-plasmids				
CMUO(*)	Plasmids carried		Nomenclature	Size (Mdal)	Resistance phenotype	Incompatibility group	
	a(**)	b(***)					
SM 3	1	2	pU0300	53	Ap Km Gm Cm Tc Su	Inc P	
SM 7	2		pU0700	97	Ap Sm Km Gm Cm Tc Su Fo	Inc C	
SM 9	2	2	pU0900	57	Ap Sm Fo	Inc M	
			pU0901	50	Ap Km Gm Cm Tc Su	ND(****)	
SM 10	3	2	pU0101	40	Ap Gm Tm	Inc M	
			pU0102	50	Ap Sm Km Gm Su Tc Tp	ND	
			pU0130	34	Ap	Inc M	
SM 19	2	2	pU0191	93	Ap Sm Km Gm Tm Tc Su	Inc C	
			pU0900	57	Ap Sm Fo	Inc M	
SM 32	2	2	pU0900	57	Ap Sm Fo	Inc M	
			pU0321	85	Ap Sm Km Gm Tm Tc Su Cm Tp	Inc C	
SM 57	3	1	pU0900	57	Ap Sm Fo	Inc M	
			pU0571	79	Ap Sm Gm Tc Su Tp	Inc C	
SM 61	4		pU0610	45	Ap	Inc M, Inc FII	
			pU0611(****)	64	Ap Sm Km Tc	ND	
SM 70	2		pU0900	57	Ap Sm Fo	Inc M	

(*) Colección de Microorganismos, Universidad de Oviedo. (**) Number of plasmids with size ≥ 20 Mdal. (***) Number of plasmids with size < 10 Mdal. (****) Not determined. (*****) This plasmid is transferred together with pU0610.

method. Alternatively, single colonies were assayed by toothpick replica plating onto antibiotic containing plates (9).

Prodigiosin production

The prodigiosin production was assayed in peptone glycerol agar medium, as proposed by Grimont and Grimont (4).

Conjugal transfer

Transfer of antibiotic resistance was performed as described previously (9).

Plasmid stability

Strains were stored at -20°C in vials containing peptone 1.5% in

distilled water (w/v) and glycerol (1:1). The storage media used were: Mueller-Hinton Agar (MH) (Difco); Nutrient Agar (NA) (Difco). Thallous Caprilate Agar (TCA) prepared as recommended by Starr *et al.* (14). Minimal medium M-70 is an agarified saline medium containing the same salts and concentrations of that of TCA, excepted thallous acetate and substituting n-octanoic acid by 1% w/v of glucose. Plasmid stability in different hosts was tested by using several storage media in the following way: adequate dilutions of each problem culture were plated on nonselective medium and incubated 24 h. About one hundred colonies were replicated separately onto plates containing the drugs corresponding to the different resistance markers. The concentration of drugs in plates were: ampicillin and fosfomicin 50 $\mu\text{g/ml}$;

streptomycin, kanamycin, gentamicin and tobramycin 10 µg/ml; tetracycline and chloramphenicol 20 µg/ml and sulfanilamide 100 µg/ml.

Plasmid DNA analysis

Plasmid DNA was extracted from cells by the cleared lysate method of Clewell and Helinski (2) with the modifications previously described (9). Agarose slab gel electrophoresis of plasmid DNA was carried out by the method of Meyers *et al.* (11). Plasmid size was estimated by including molecular weight standard plasmids in the gels.

RESULTS AND DISCUSSION

Host range and frequency of transfer

Nine clinical isolates of *Serratia marcescens* harboring some of the R plasmids previously characterized were used as donors in experiments *in vitro* to determine their host range. The relevant characteristics of these clinical isolates and their R plasmids are shown in table 1. Seven plasmid-free strains of different species of Enterobacteriaceae, two of *Pseudomonas* and one of *Vibrio*, were used as recipients in matting experiments and the results are summarized in table 2. The different plasmid were transferred in various frequencies, all being relatively low. The highest frequency was about $2 \cdot 10^{-5}$ and the lowest was less than 10^{-7} (table 2). Two of the plas-

mids (pU0102 and pU0130) were only transferred to other strains belonging to the same species and to *Escherichia coli*. Two plasmids (pU0191 and pU0571) were also transferred to *Citrobacter freundii*. Three plasmids (pU0901, pU0101 and pU0700) were transferred to six or eight representative species of Enterobacteriaceae. Two plasmids (pU0610 and pU0611) were transferred to all of the Enterobacteriaceae species and *Vibrio parahaemolyticus*, another two plasmids (pU0900 and pU0300) were transferred to Enterobacteriaceae and to one or both species of *Pseudomonas*, respectively.

Conjugal transfer of plasmids requires cell surface interaction between donor and recipient cells (see 13, for a review). In addition, it requires three DNA metabolic processes: mobilization in the donor, transfer between two cells and replication in the recipient. Host range indicates the total spectrum of bacterial species to which a plasmid can be transferred. A wide host range would be due basically to the capacity of the plasmid to form mating pairs between different bacterial species, its capacity to replicate in different recipient species and its ability to resist the action of different host-specific restriction enzymes.

Moreover, a narrow host range would be due to: a) the incapacity to form mating pairs; b) the influence of the host on the plasmid replication, developing this in an abnormal way with total or partial loss of the plasmid; c) the plasmid sensitivity against the restric-

Table 2. Host range and transfer frequency of R-plasmids identified in clinical isolates of *S. marcescens*

Plasmid	Donor strain	Recipient strains										Frequency of transfer	
		<i>Se. marcescens</i>	<i>Es. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. paratyphi</i>	<i>Sh. sonnei</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Ps. maltophilia</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>
pU0300	SM 3	I(*)	I	I	I	I	I	—(**)	I	I	I	—	5.10 ⁻⁷ —<10 ⁻⁷
pU0700	SM 7	I	I	I	I	I	I	I	I	—	—	—	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁷
pU0900	SM 9, 57, 19, 32, 70	IC(***)	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC	IC	—	—	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁶
pU0901	SM 9	IC	IC	IC	—	C(****)	C	—	C	—	—	—	10 ⁻⁷ —<10 ⁻⁷
pU0101	SM 10	IC	IC	I	I	I	I	—	—	—	—	—	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁶
pU0191	SM 19	C	IC	IC	—	—	—	—	—	—	—	—	<10 ⁻⁷ —
pU0321	SM 32	IC	IC	IC	C	—	—	—	—	—	—	—	<10 ⁻⁷ —10 ⁻⁷
pU0610	SM 61	I	IC	IC	I	IC	IC	IC	IC	—	I	—	2.10 ⁻⁵ —10 ⁻⁷
pU0611	SM 61	C	C	C	C	C	C	C	C	—	C	—	10 ⁻⁶ —10 ⁻⁷
pU0571	SM 57	IC	IC	IC	—	—	—	—	—	—	—	—	10 ⁻⁷
pU0102	SM 10	IC	IC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<10 ⁻⁷
pU0130	SM 10	IC	IC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<10 ⁻⁷

(*) Transferred individually. (**) Not transferred. (***) Transferred individually of together with another plasmid. (****) Co-transferred with other plasmids.

tion enzymes of the host. Among the plasmids studied in this work, none showed a narrow host range; all of them were transferred to some other different species. All were transferred to different Enterobacteriaceae species, two were also transferred to *Vibrio parahaemolyticus* and another two to Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* species. The last plasmids showed a broader host range than that usually described for plasmids of *Serratia*, but similar to that reported by Olexy *et al.*, (12). We must remark that in that work R-plasmids were not physically studied.

In each clinical isolate of *Serratia marcescens* several plasmids coresided, some of them of larger size than DNA chromosomal fragments. The electrophoretic analysis of the plasmid DNA in the different transconjugant clones showed

that the plasmids pU0900, pU0901, pU0571, pU0101, pU0130, pU0191, pU0321, pU0610, pU0102 were transferred to different recipients alone or together with other R plasmids present in the parental strains. On the other hand pU0700 and pU0300 were always transferred alone, and the plasmid pU0611 was always co-transferred with pU0610. We do not know if it was autotransferred or mobilized by pU0610.

Among the plasmids that we have characterized in the present work, pU0900 seems to be the most frequently found, because it was isolated in several strains of *Serratia marcescens* which transferred different R plasmids; five of them being studied in this paper (table 1). This type of plasmid coresides with other plasmids in clinical strains of *S. marcescens*, shows capacity to mobilize small

non-conjugative plasmids, codifies for fosfomycin resistance and belongs to *Inc M* incompatibility group (9-10, 15). By contrast, the plasmid showing the wider host range (pU0300), belonging to the *Inc P* group, which also shows capacity to mobilize small non-conjugative plasmids, was only found in one strain (10). Therefore, it does not seem to be a prevalent plasmid among the *S. marcescens* strains present in the hospital.

Stability of the plasmids in different hosts

Strains of *Serratia marcescens* maintained in the absence of antibiotics since their isolation were stored by three different procedures: lyophilization, and storage in glycerol peptone at -20°C , or in Mueller-Hinton agar at 4°C . During the period 1975-1981, by using different tests, we found that in the strains starved at 4°C , some resistance markers were lost at frequencies below five per cent, but none of these strains showed a total loss of resistances codified by the plasmids. Transconjugant clones preserved as the donors showed loss of part or all resistance markers at variable frequencies, depending on the specific resistance markers of the plasmid and the host strain. On the contrary, no loss of resistance was observed in either lyophilized or frozen strains.

The significant loss of resistance observed in the cultures starved at 4°C , prompted us to study the influence of the culture storage medium on the stability of the patterns of resistance. The nine clinical

isolates of *Serratia marcescens* were streaked in three different media: minimal medium with glucose (M-70), nutrient agar (NA) and a specific media for growing and maintenance of *Serratia* [i.e. thallos caprylate agar (TCA) (14)]. In these experiments, twelve *Escherichia coli* transconjugant clones containing several of the ten plasmids cited in table 1, were also included. These *E. coli* transconjugants were stored only in M-70 and NA. After overnight incubation the cultures were starved at 4°C during 60 days. At the end of this period, test for sensitivity-resistance were performed. As is shown in table 3, all plasmids of the original hosts were stable in complex media (NA and TCA), whereas in M-70, three plasmids, pU0300 (from *S. marcescens* 3), pU0900 and pU0320 (from *S. marcescens* 32) were lost at variable frequencies lower than 2%. The incidence of clones with deletions which had loss one or several plasmid-mediated resistance markers was higher in minimal media than in complex media. All these data indicate that TCA is the best of the three media used for maintenance, under refrigeration, of R-plasmids in *S. marcescens*.

When the corresponding transconjugant clones of *Escherichia coli* harboring some of the ten types of R-plasmids were starved at 4°C in M-70 or NA, they lost these R-plasmids at frequencies lower than 10%; and the incidence of clones with deletions was about 2% and 1% in M-70 and NA respectively. The results of these experiments are summarized in table 3. It is concluded that the medium used for storage and for growth

Tabla 3. Stability of the R-plasmids from *S. marcescens*.

Host strains	Storage media	Tested clones	Cured clones	Porcentaje	Deleted clones	Porcentaje
Clinical isolates of <i>S. marcescens</i>	M-70	760	11	1.4(*)	33	4.3
	NA	776	0	0	14	1.8
	TCA	843	0	0	3	0.36
Transconjugants of <i>E. coli</i>	M-70	1186	116	9.8	24	2
	NA	1194	100	8.3	12	1

(*) Only found in two *S. marcescens* strains: 3 and 32.

has a great influence in the stability of resistance markers, as well as in the whole plasmids.

The data obtained from *in vitro* experiments concerning the spontaneous loss of resistance markers, suggest that the multiple resistance presents a high stability in the original hosts and a low one in the transconjugants. High stability in natural occurring plasmids, as well as their resistance to curing agents in nosocomial strains of *Serratia marcescens*, were previously described in the strains SM3 and SM9 (6-7) as well as in other strains.

It must be underlined that when the pigmented strain *Serratia marcescens* CECT 159 was used as a recipient the transconjugant clones, harboring some of the plasmids, lost the capacity of producing the red pigment (prodigiosin), as shown by inoculating these clones in a medium appropriate for prodigiosin production (PGA). This phenomenon has been reported by several authors, and has been discussed by Holland and Dale (5), who proposed several hypothesis to explain this phenomenon. On the other hand, we have found that non-pigmented multiresistant strains of *S. marcescens*, which had lost their R plasmids, produced prodigiosin when cultivated in

PGA. This result seems to confirm the existence of some mechanism of interference between synthesis of the pigment and presence of R-plasmids.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the Servicio de Microbiología de la C.S. Nuestra Señora de Covadonga, Oviedo, Spain, and the Prof. Federico Uruburu, Director of the CETC, for kindly providing us with the clinical isolates and the Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* strains respectively. This work was partially supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social Española.

REFERENCES

1. ALVAREZ, J. S., and REGUEIRO, B. 1980. R plasmids from clinical isolates of *Serratia marcescens*. J. Hosp. Infect., 1, 133-39.
2. CLEWELL, D. B., and HELINSKI, D. R. 1968. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli* purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 62, 1159-66.

3. COOKSEY, R.C.; THORNE, G. M., and FARRAR, W. E. 1976. R factor mediated antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. Antimicrob. Ag. Chemother., 10, 123-27.
4. GRIMONT, P.A.D., and GRIMONT, F. 1978. Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. J. Clin. Microbiol., 8, 88-92.
5. HOLLAND, S., and DALE, J. W. 1978. The effect of resistance plasmids on pigmentation of *Serratia marcescens*. Microbios Lett., 8, 85-9.
6. LLANEZA, J.; MÉNDEZ, F. J.; MENDOZA, M. C., y HARDISSON, C. 1979. Transferencia por conjugación y eliminación por agentes curantes de un factor R de *Serratia marcescens*. Arch. Fac. Med. Oviedo, 1, 359-66.
7. MÉNDEZ, F. J.; LLANEZA, J.; MENDOZA, M. C., y HARDISSON, C. 1978. Resistencia plasmídica a la fosfomicina en *Serratia marcescens*. Proc. I Mediter. Congr. Chemother., 685-93.
8. MÉNDEZ, F. J.; MENDOZA, M. C.; LLANEZA, J., and HARDISSON, C. 1982. Conjugation of drug-resistance plasmids from nosocomial strains of *Serratia marcescens* to *Escherichia coli* in biological fluids of human origin. J. Hosp. Infect., 3, 285-92.
9. MENDOZA, M. C.; GARCÍA, J. M.; LLANEZA, J.; MÉNDEZ, F. J.; HARDISSON, C., and ORTIZ, J. M. 1980. Plasmid-determined resistance to fosfomycin in *Serratia marcescens*. Antimicrob. Ag. Chemother., 18, 215-19.
10. MENDOZA, M. C.; MÉNDEZ, F. J.; LLANEZA, J.; MAYO, B., and HARDISSON, C. 1983. R-plasmid diversity in clinical isolates of *Serratia marcescens*. Microbios Lett., 27-7-17.
11. MEYERS, J. A.; SÁNCHEZ, D.; ELWELL, L. P., and FALKOW, S. 1976. Simple agarose eletrophoretic method for the identification and characterization of plasmids DNA. J. Bacteriol., 127, 1529-37.
12. OLEXY, V. M.; BIRD, T. J.; GRIEBLE, H. G., and FARRAND, S. K. 1979. Hospital isolates of *Serratia marcescens* transferring ampicillin, carbenicillin and gentamicin resistance to other Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Ag. Chemother., 15, 93-100.
13. ROWBURY, R. J. 1977. Bacterial plasmids with particular reference to their replication and transfer properties. Progr. Biophys. Mol. Biol., 31, 271-317.
14. STARR, M. P., GRIMONT, P. A. B.; GRIMONT, F., and STARR, P. B. 1976. Caprylate thallous agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol., 4, 270-76.
15. VILLAR, C. J.; MENDOZA, M. C., and HARDISSON, C. 1981. Characterization of two resistance plasmids from a clinical isolate of *Serratia marcescens*. Microbios Lett., 18, 87-96.

MORFOLOGIA DEL ENDOFITO DE LA INOCULACION
CRUZADA *ELAEAGNUS ANGUSTIFOLIA* ×
ALNUS GLUTINOSA

F. BERMUDEZ DE CASTRO, P. YUSTE y C. ASCASO
Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid
Instituto de Edafología y Biología Vegetal (CSIC), Madrid

(Aceptado: 14 de diciembre de 1983)

RESUMEN

Se estudia la morfología del endofito de la inoculación cruzada *Elaeagnus angustifolia* × *Alnus glutinosa* en suelos de alisedas. Se encuentran en el córtex del nódulo células con hifas y con vesículas esféricas. No se observan gránulos o esporas y aparecen, sin embargo, numerosas células vacías. El diámetro de las hifas está comprendido entre 0,3 y 0,7 μm y el de las vesículas entre 1,8 y 3,0 μm . Hifas y vesículas se encuentran rodeadas por la membrana, pared celular, espacio vacío y cápsula. La membrana de la célula huésped se invagina aislando el endofito. Hifas y vesículas están tabicadas y contienen mesosomas, zonas nucleares y cuerpos estriados longitudinales y transversales. En el citoplasma de la célula huésped se observan vacuolas y mitocondrias.

SUMMARY

It is studied the endophyte morphology in the cross-inoculation *Elaeagnus angustifolia* × *Alnus glutinosa* growing in alder forest soils. Cells with hyphae and spherical vesicles are found in the nodule cortex. Granules or spores are not observed, but numerous ghosts appear. The hyphal diameter has 0.3 - 0.7 μm and the vesicles one 1.8 - 3.0 μm . Hyphae and vesicles are surrounded by membrane, cell wall, void space and

capsular material. The host plasmalemma is invaginated, isolating the endophyte. Hyphae and vesicles are septate and mesosomes, nuclear zones and longitudinal and transverse striated bodies appear. In the host cytoplasm vacuoles and mitochondria are observed.

INTRODUCCIÓN

Las inoculaciones cruzadas entre plantas actinorrizas y los endofitos respectivos están bien establecidas en cultivos de tierra (4, 6) e hidropónicos (17, 19), y por inoculación con las cepas microbianas aisladas desde nódulos radicales (11).

Sin embargo, las estructuras que presentan los endofitos en los nódulos conseguidos difieren, a veces, en forma y tamaño de las estructuras tipo que han servido a Becking (1) para clasificar los actinomicetos simbioses, recogidas en la octava edición del Bergey's Manual for Determinative Bacteriology (2), por lo que parece conveniente revisar esta clasificación. Además, la respuesta a la inoculación varía mucho, tanto en la producción de nódulos, que a veces es nula y otras oscila entre el rango de excelente (50%), buena (50-25%) y deficiente (25%), según el criterio de MacKintosh y Bond (16), como en la eficiencia diazotrófica de los nódulos formados.

Rodríguez-Barrueco y Miguel (19) consiguieron nodular plantas de *Elaeagnus angustifolia*, mantenidas en solución nutritiva de Crone sin nitrógeno, con un inóculo cruzado al 10%, obtenido triturando nódulos de *Alnus glutinosa* en agua estéril. Nosotros hemos obtenido resultados similares plantan-

do *E. angustifolia* en suelos donde crecían alisos y en los que presumiblemente se encontraba el endofito de *A. glutinosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de *Elaeagnus angustifolia* sin nódulos se obtuvieron por germinación de semillas recogidas en Valdemoro (Madrid) y esterilizadas superficialmente con ácido sulfúrico concentrado (22). Cuando tenían tres hojas se transplantaron a tiestos con tierra procedente de un bosque ripario del río Alberche con *Alnus glutinosa*, donde se mantuvieron 15 semanas. Se colocaron también tiestos control con perlábón esterilizado, como se hace habitualmente en este tipo de trabajos (6). Cuando se cosecharon las plantas, se separaron los nódulos de la raíz parental e inmediatamente fueron fijados en glutaraldehído al 3,25% en tampón Sorensen 0,1 M, pH = 7,1, postfijados en OsO₄ al 1%, deshidratados y embebidos en el medio de Spurr (20). Las secciones ultrafinas se obtuvieron con un ultramicrotomo Reichert OmU2, y se tiñeron con citrato de plomo, según Reynolds (18). Fueron examinadas en un microscopio electrónico Philips 300.

RESULTADOS

Las microfotografías muestran que el nódulo tiene las partes típicas de una raíz, meristemo apical, córtex y estela, y que se diferencia de ella por la hipertrofia del córtex. El endofito solamente se desarrolla dentro de las células corticales, apareciendo la estela y el meristemo apical libres de la infección.

En las células del córtex infectadas se observan hifas (figuras 1-3) y vesículas (figuras 4-6) en el extremo apical de las hifas (figura 5), cuyos diámetros se recogen en la tabla 1, donde se comparan con las dimensiones que indican otros autores para el endofito de los nódulos de *Elaeagnus angustifolia* × *Alnus glutinosa* y con los microsimbiontes de ambas especies.



Figura 1. Células corticales del nódulo. A, célula sin infectar. B, célula infectada por el endofito. PC, pared celular de la célula huésped. h, hifas



Figura 2. Sección del protoplasma de una célula cortical del nódulo en la que se observan hifas cortadas longitudinalmente ramificadas en forma de Y. h, hifas. m, plasma-mem. pc, pared celular. e, espacio vacío. M, membrana citoplasmática de la célula huésped que rodea a la hifa. Se observan vacuolas, V, en el citoplasma de la célula huésped



Figura 3. Parte terminal de una hifa en forma de gancho, en cuyo protoplasma se distinguen mesosomas, me

Las hifas aparecen ramificadas y adoptan formas diferentes que se asemejan a una Y o a un gancho

(figuras 1-3). Las vesículas son esféricas (figuras 4-5).

La presencia de las formas hifa-

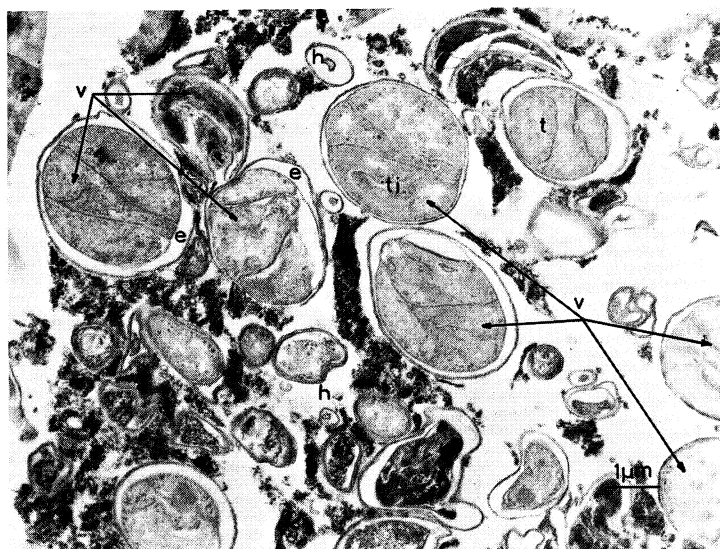


Figura 4. Aspecto de una célula cortical del huésped en la que predominan vesículas tabicadas. v, vesícula. t, tabiques completos. ti, tabiques incompletos. h, hifas cortadas transversalmente. e, espacio vacío

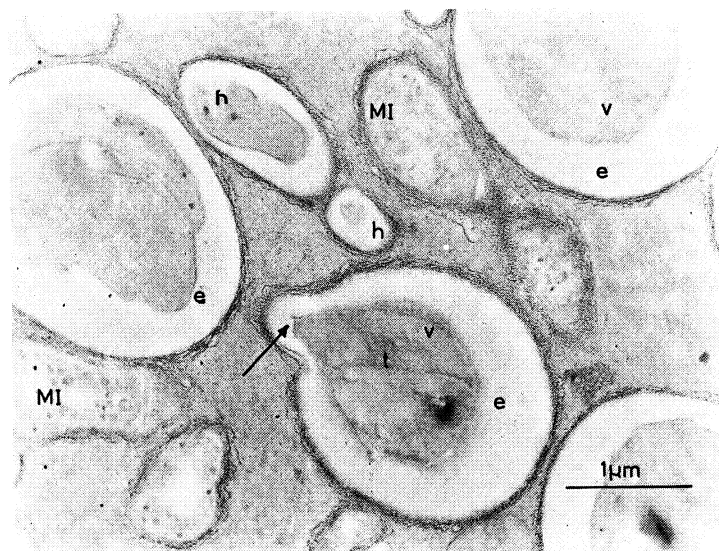


Figura 5. Zona de una célula huésped con mitocondrias, MI. hifas, h, y vesículas, v. e, espacio vacío. t, tabiques. La flecha señala el punto de unión de la vesícula con la hifa parental

Tabla 1. Características diferenciales de los endofitos

Inoculación cruzada	Hifas Ø µm	Vesículas		Esporas Ø µm
		Forma	Ø µm	
<i>Alnus glutinosa</i> × <i>A. glutinosa</i> (*)	0,3-0,5	Esféricas	3,0-5,0	0,5-1,5
<i>Elaeagnus angustifolia</i> × <i>E. angustifolia</i> (*)	0,3-0,5	Esféricas	2,5-4,0 1,8-2,2	0,3-0,9
<i>E. angustifolia</i> × <i>A. glutinosa</i> (**)	0,6	Esféricas	3,4	
<i>E. angustifolia</i> × <i>A. glutinosa</i> (***)	0,3-0,7	Esféricas	1,8-3,0	

(*) Según Becking (1-2). (**) Según Rodríguez-Barrueco y Miguel (20). (***) Según este artículo.

así de su citoplasma (figura 2), y de una banda de material capsular denso de los electrones. Además dos envolturas de origen microbiano rodean al microsimbionte, la pared celular y el plasmalemma. Entre la cápsula y la pared celular aparece el espacio vacío, algunas veces notablemente ensanchado, que se observa corrientemente al microscopio electrónico de transmisión en las preparaciones nodulares (figuras 5-6).

Las hifas y las vesículas están tabicadas. El tabique, completo o in-

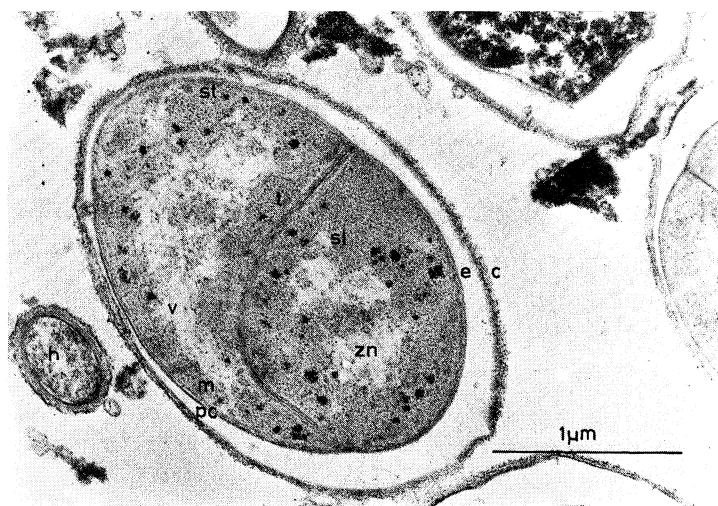


Figura 6. Vesículas, v, y una hifa, h, a gran aumento. En la vesícula del centro de la foto se distingue: c, material capsular. e, espacio vacío. pc, pared celular. m, membrana citoplasmática. t, tabique. zn, zona nucleares. sl, cuerpos estriados longitudinales. st, cuerpos estriados transversales

les en una célula es compatible con orgánulos celulares, como mitocondrias (figura 5) y vacuolas (figura 2) y con el retículo endoplasmático de la célula huésped.

El endofito se encuentra rodeado del plasmalemma de la célula huésped que se invagina, aislándolo

completo, se forma al invaginarse la pared celular y la membrana citoplasmática del endofito (figuras 4-6). El microorganismo presenta, además, zonas nucleares (figura 6), claras al microscopio electrónico, y mesosomas (figura 3). Las formas vesiculares tienen cuerpos

estriados longitudinales y transversales (figura 6).

La degeneración del microsimbionte dentro de la célula huésped comienza por un proceso de reabsorción del protoplasma, algunas de cuyas etapas se muestran en las figuras 1-2, seguido por la aparición de vesículas más densas que las normales con lisis del contenido citoplasmático y finaliza con la formación de células vacías.

El esquema de la figura 7 representa una hifa ideal, prolongada en una vesícula, en las que se han dibujado todas las estructuras observadas, como aparecen en el nódulo *Elaeagnus angustifolia* × *Alnus glutinosa*.

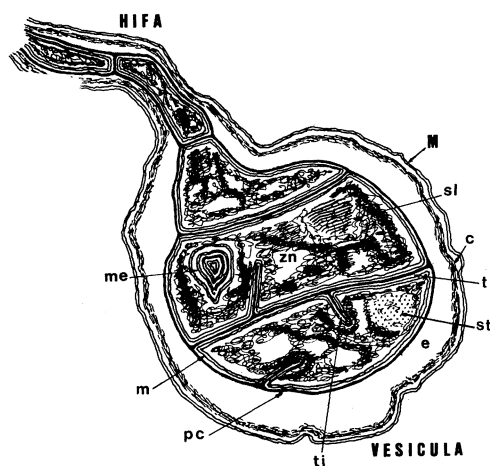


Figura 7. Esquema de una hifa con la vesícula terminal. Se ha dibujado el conjunto de estructuras observadas. Para más explicaciones véase el texto. M, plasmalema de la célula huésped. c, material capsular. e, espacio vacío. pc, pared celular. m, plasmalema. t, tabique completo. ti, tabique incompleto. me, mesosoma. st, cuerpos estriados transversales. sl, cuerpos estriados longitudinales. zn, zonas nucleares

DISCUSIÓN

El microorganismo observado en las células corticales de los nódulos de *Elaeagnus angustifolia* inducidos en suelos de *Alnus glutinosa*, tanto por las hifas y vesículas como por la estructura y tamaño, es similar al actinomiceto *Frankia* sp., endofito de las plantas actinorrizas (1-2). El diámetro de algunas hifas es ligeramente superior al indicado para *F. alni* y *F. elaeagni*, mientras que el diámetro de las vesículas se acerca más al de esta última especie y es inferior al señalado para los nódulos de *E. angustifolia* × *A. glutinosa* en cultivo hidropónico (19). Algunas hifas con formas anormales recuerdan las que se han encontrado en los nódulos de *Myrica gale* × *A. glutinosa* (4-5) que se interpretan como formas adaptativas de un endofito a una planta en la que no habita normalmente.

No se han observado esporas, lo que coincide con los resultados obtenidos por Rodríguez-Barrueco y Miguel (19) en los nódulos de *Elaeagnus angustifolia* × *Alnus glutinosa* y con los nódulos sin esporas Sp(-) que vanDijk y Merkus (21) encuentran en *A. glutinosa* con menor capacidad infectiva que los nódulos Sp(+) (10).

Las formas degenerativas del microorganismo con tabiques parcialmente reabsorbidos y contenido citoplasmático muy denso a los electrones, tal como aparecen en las microfotografías, y su posterior estado de célula vacía, se han visto con anterioridad en inoculaciones cruzadas en cultivo de tierra (5) y en cultivo hidropónico (19).

Los tabiques completos e in-

completos de hifas y vesículas aparecen en los endofitos de los nódulos de las plantas actinorrizas (3-4, 13), así como los mesosomas, observados también en otros actinomicetos (7, 9), y las demás estructuras que se han indicado. Del mismo modo es común la presencia de los engrosamientos esféricos terminales de las hifas de los endofitos de *Alnus*, *Elaeagnus*, *Discaria*, *Ceanothus* y *Purshia* (2) y en *Myrica gale* × *A. glutinosa* (4-5).

En cuanto a las diferentes envolturas del microsimbionte dentro de la célula huésped, Lalonde y Devoe (12) han demostrado por criofractura la invaginación del plasmalemma de la célula huésped, que aísla de esta forma el endofito, hecho que había sido postulado anteriormente por varios autores.

El material capsular de naturaleza péctica, denso a los electrones, se observa también en parásitos (8), en micorrizas (15) y en nódulos foliares de *Psychotria bacteriophila* (23). Parece que se produce a nivel del dictiosoma de la célula huésped y lo utiliza el endofito como fuente de energía (14), por lo que estaríamos ante un equilibrio entre una biosíntesis realizada por un organismo autotrófico, *Elaeagnus angustifolia*, y una biodegradación por un organismo heterotrófico, el endofito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a V. Zamorano la realización del esquema del microorganismo, que interpreta fielmente las observaciones al microscopio electrónico.

BIBLIOGRAFÍA

1. BECKING, J. H. 1970. Frankiaceae. Fam. Nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174. Int. J. Syst. Bacteriol., 20, 201-20.
2. BECKING, J. H. 1974. Family III Frankiaceae, Becking 1970, 201. En: R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS (eds.) Bergey's Manual for Determinative Bacteriology, 701-6. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
3. BECKING, J. H.; DEBOER, W. E., and HOUWINK, A. L. 1964. Electron microscopy of the endophyte of *Alnus glutinosa*. Antonie van Leeuwenhoek, 30, 343-76.
4. BERMÚDEZ DE CASTRO, F. 1975. Nuevas investigaciones sobre la inoculación cruzada entre las especies fijadoras de nitrógeno *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. y *Myrica gale* L. An. Edafol. Agrobiol., 34, 369-82.
5. BERMÚDEZ DE CASTRO, F. 1976. Estudios sobre las simbiosis fijadoras de nitrógeno *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. - *Frankia alni* (Woronin) von Tubeuf y *Myrica gale* L. - *Frankia brunchorstii* Moeller. Tesis doctoral, 310 páginas. Universidad de Salamanca.
6. BERMÚDEZ DE CASTRO, F.; MIGUEL, C., and RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. 1976. A study of the capacity of soils to induce nodules in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and *Myrica gale* L., with special reference to the specificity of the endophytes. Ann. Microbiol. Paris, 127 A, 307-15.
7. CHEN, P. L. 1964. The membrane system of *Streptomyces cinnamomensis*. Amer. J. Bot., 51, 125-32.
8. DAVISON, E. M. 1968. Cytochemistry and ultrastructure of hyphae and haustoria of *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr. Ann. Bot. London, 32, 613-21.
9. DUDA, J. J., and SLACK, J. M. 1972. Ultrastructure studies on the genus *Actynomyces*. J. Gen. Microbiol., 71, 63-68.
10. HOUWERS, A., and AKKERMANS, A. D. L. 1981. Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands. Plant Soil, 61, 189-202.
11. LALONDE, M., and CALVERT, H. E. 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as a infective inoculant for *Al-*

- nus* species. En: J. C. GORDON, C. T. WHEELER and D. A. PERRY (eds.) Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests, 95-110. Oregon St. Univ. Corvallis.
12. LALONDE, M., and DEVOE, I. W. 1976. Origin of the membrane envelope enclosing the *Alnus crispa* var. *mollis* Fern. root nodule endophyte as revealed by freeze-etching microscopy. *Physiol. Plant Pathol.*, 8, 123-29.
 13. LALONDE, M., and KNOWLES, R. 1975. Ultrastructure of the *Alnus crispa* var. *mollis* Fern. root nodule endophyte. *Can. J. Microbiol.*, 21, 1058-80.
 14. LALONDE, M., and KNOWLES, R. 1975. Ultrastructure, composition and biogenesis of the encapsulation material surrounding the endophyte in *Alnus crispa* var. *mollis* root nodules. *Can. J. Bot.*, 53, 1951-71.
 15. LUTZ, R. W., and SJOLUND, R. D. 1973. *Monotropa uniflora*: ultrastructural details of its mycorrhizal habit. *Amer. J. Bot.*, 60, 339-45.
 16. MACKINTOSH, A. H., and BOND, G. 1970. Diversity in the nodular endophytes of *Alnus* and *Myrica*. *Phyton*, 27, 79-90.
 17. MIGUEL, C.; CAÑIZO, A.; COSTA, A.; and RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. 1978. Some aspects of the *Alnus*-type root nodule symbiosis. En: J. DÖBEREINER, R. H. BURRIS and A. HOLLAENDER (eds.) Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics, 121-35. Plenum Press, New York.
 18. REYNOLDS, S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-12.
 19. RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., and MIGUEL, C. 1979. Host. plant-endophyte specificity in actinomycete-nodulated plants. En: J. C. GORDON, C. T. WHEELER and D. A. PERRY (eds.) Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. 143-59. Oregon St. Univ. Corvallis.
 20. SPURR, A. R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26, 31-43.
 21. VAN DIJK, C., and MERKUS, E. 1976. A microscopical study of the development of a spore-like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *New Phytol.*, 77, 73-91.
 22. VINCENT, J. M. 1970. IBP Handb. n15. A Manual for the Practical Study of the Root-nodule Bacteria. Blackwell Sc. Pub, Oxford.
 23. WHITMOYER, R. E., and HORNER, H. T. 1970. Developmental aspects of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *Bot. Gaz., Chicago*, 131, 193-200.

ESTUDIO DE BACTERIAS HALOFILAS EXTREMAS AISLADAS DE HABITATS SALINOS NO LITORALES

J. SOLIVERI, M. E. ARIAS y F. LABORDA

Departamento de Microbiología, Universidad de Alcalá de Henares (Madrid)

(Aceptado: 30 de julio de 1984)

RESUMEN

Se ha estudiado la presencia de bacterias halófilas extremas en dos hábitats salinos no litorales, las salinas de Imón (Guadalajara) y las lagunas de Alcázar de San Juan (Ciudad Real) (España).

En las salinas de Imón se han aislado 35 cepas, todas de morfología bacilar. De éstas, 26 (74,2%) se identificaron como halófilas extremas pertenecientes al género *Halobacterium*. En las lagunas de Alcázar de San Juan se aislaron un total de 16 cepas, bacilos y cocos, de las que solamente 1 (6,2%) mostró características similares al género *Halobacterium*. Las cepas aisladas en ambas zonas, presentaron propiedades que difieren de las descritas en la bibliografía, para las especies de este género.

El resto de las cepas aisladas se podrían considerar como halotolerantes, presentando un margen más amplio de tolerancia a la sal las cepas aisladas de las lagunas de Alcázar de San Juan.

SUMMARY

The presence of extreme halophilic bacteria has been studied in two non-litoral salty habitats, namely, the Imón solar salterns and the Alcázar de San Juan salt lakes, located in Guadalajara and Ciudad Real (Spain) respectively.

The 35 strains isolated from the Imón salterns had a bacillar morphology. Out of these, 26 were identified as extreme halophilic of the genus *Halobacterium*. The 16 strains isolated from the salt lakes of Alcázar de San Juan had bacillar and coccoid morphology and only one of these presented similar characteristics to that of the genus *Halobacterium*.

The properties of these strains were different from those already described from the *Halobacterium* species.

The rest of the isolated strains could be considered as halotolerant. The salinity tolerance range is wider for the strains isolated from Alcázar de San Juan.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias halófilas extremas son un grupo de microorganismos adaptados a vivir en hábitats de concentraciones elevadas de sales. La presencia de microorganismos pertenecientes a este grupo ha sido demostrada en aguas extraídas de dos tipos de lagos hipersalinos, el Gran Lago Salado (10) y el Lago Asal (2).

En España, diversos autores (11-15) han realizado estudios sobre la distribución y caracterización de halófilos extremos en diferentes hábitats salinos litorales. La ausencia de datos sobre la posible existencia de estos microorganismos en aguas salinas no litorales nos indujo a realizar el estudio que presentamos.

El trabajo se llevó a cabo en muestras de agua procedentes de dos ambientes hipersalinos no litorales, diferentes en cuanto a situación y características, las salinas de Imón, situadas a 12 km al N. E. de Sigüenza (Guadalajara) y las lagunas de Alcázar de San Juan (Ciudad Real). En este primer estudio se trató de realizar, en la medida de lo posible, la caracterización morfológica y fisiológica de las cepas que constituyen la población bacteriana de estas aguas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de las zonas de estudio y recolección de las muestras

Las salinas de Imón se encuentran situadas sobre terrenos margosos terciarios en la ribera del río Salado. Son salinas de evaporación, alimentadas con aguas subterráneas que contienen un 20% (p/v) de sales disueltas y que están sometidas a condiciones extremas de climatología (17). Las aguas extraídas del subsuelo, a una temperatura de 18-20 °C, se extienden en embalses subdivididos en pequeños estanques para su evaporación al sol.

La toma de muestras se realizó en los estanques de evaporación, cuyas aguas (10 cm de altura) presentaron un 33% (p/v) de sales disueltas y un pH de 7,2, no detectándose restos significativos de materia orgánica insoluble tras filtración y lavado a través de papel Whatman núm. 1.

Las lagunas de Alcázar de San Juan son representantes actuales de un antiguo régimen lacustre que imperaba en la zona. Sus aguas están cargadas de sales, principalmente de cloruros y sulfatos, debido al aporte continuo de aguas subterráneas ricas en las mismas (9), y a la gran evaporación causada por las altas temperaturas estivales.

Las tomas de muestras se realizaron en la laguna denominada la «Grande», cuyas aguas tenían un 31,4% de sales disueltas, un pH de 7,4, una temperatura de 18 °C y un contenido en materia orgánica insoluble de 6,45 g/l.

En ambos casos, la toma de muestras de agua se realizó en el mes de septiembre, en condiciones estériles, en frascos de vidrio de 1,5 l de capacidad.

Aislamiento y recuento de microorganismos viables

Las muestras de agua se sembraron en los medios de cultivo descritos en la bibliografía para el aislamiento de este grupo de microorganismos (6, 10, 12, 16). Las placas recién inoculadas se colocaron en bolsas de plástico para evitar su desecación y se incubaron a 37 °C durante 2-3 semanas, tras las cuales se realizaron los respectivos recuentos.

Estudio de las cepas aisladas

Caracterización morfológica. De las colonias aparecidas en los distintos medios de cultivo, se determinó su forma, tamaño y coloración.

La observación microscópica de los microorganismos se realizó al microscopio de contraste de fases (Zeiss, mod. Universal), mediante la técnica de gota pendiente, utilizando como soporte la solución salina de la siguiente composición: NaCl, 20 %; MgSO₄ · 7H₂O, 2 % y KCl, 0,2 % (p/v). Se determinó de cada cepa, la morfología, la presencia o no de vacuolas de gas y la respuesta a la tinción de Gram, previa fijación con ácido acético (5).

Caracterización fisiológica y bioquímica. La concentración sali-

na óptima para el crecimiento de las cepas aisladas se determinó tras 15 d de incubación en el medio de cultivo descrito por Rodríguez Valera y col. (12), adicionado de las siguientes concentraciones salinas: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %.

En cada cepa se realizaron las siguientes pruebas: Catalasa, oxidasa, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de caseína, lipasa sobre tween 20, 40, 60 y 80, fosfatasa, reducción de nitratos a nitritos y/o a N₂, producción de indol, producción de SH₂ y tipo de respiración. En cada caso se aplicó la metodología descrita por González y col. (7).

Los ensayos correspondientes a las actividades arginina-deshidrolasa y ureasa, así como la capacidad de crecimiento a pH 4,5, se realizaron según la metodología descrita por Colwell y col. (4).

Susceptibilidad a distintos agentes antibacterianos. Para este ensayo, se aplicó el método descrito por Bauer y col. (1); se utilizó como medio de cultivo el descrito por Shegal y Gibbons (16) y se probó el comportamiento de las cepas aisladas frente a los siguientes agentes antibacterianos: eritromicina (30 µg), sulfadiazina (300 µg), bacitracina (10 UI), kanamicina (30 µg), estreptomycin (10 µg), aureomicina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), polimixina (300 UI), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg) y penicilina-G (10 µg) (Difco).

Las características de las cepas aisladas se compararon con las correspondientes a bacterias halófilas extremas descritas en la bibliografía (3-4, 8, 18).

RESULTADOS

Recuento de microorganismos viables

De las muestras procedentes de las salinas de Imón, se obtuvo el número máximo de viables sobre el medio de Shegal y Gibbons (16) (346.10^6 cel./ml), que se eligió como medio de mantenimiento. En el resto de los medios utilizados para el aislamiento, los recuentos de microorganismos viables obtenidos fueron similares (330.10^4 cel./ml).

En las muestras procedentes de las lagunas de Alcázar de San Juan, también se obtuvo el número máximo de viables sobre el medio de Shegal y Gibbons (16) (154.10^5 cel./ml), obteniéndose en el resto de los medios ensayados resultados similares (70.10^4 cel./ml).

Características morfológicas

En las muestras procedentes de las salinas de Imón, se aislaron un total de 35 cepas, todos bacilos gram-negativos, cuyas colonias presentaron coloración rosa o roja, un diámetro comprendido entre 0,6 y 2 mm y morfología circular u oval indistintamente. Se detectó la presencia de vacuolas de gas en 20 cepas, que corresponden al 56 % de las aisladas (*tabla 1*).

En las muestras procedentes de las lagunas de Alcázar de San Juan, se aislaron 16 cepas que presentaron una gran heterogeneidad en sus características morfológicas y culturales; 14 eran bacilos y 2 cocos, de respuesta variable a la tinción de Gram. También resultó

variable el color ofrecido por tres colonias, presentando sólo 7 de ellas coloración rosa o roja (*tabla 2*).

Características fisiológicas y bioquímicas

Las cepas aisladas de las salinas de Imón presentaron crecimiento óptimo sobre concentraciones de sales comprendidas entre el 25 y el 30 % (p/v), disminuyendo a concentraciones del 20 % (p/v) y no mostrando crecimiento apreciable para rangos comprendidos entre el 5-15 % (p/v) (*tabla 1*).

Las cepas aisladas de las lagunas de Alcázar de San Juan mostraron gran variabilidad en cuanto a la capacidad de crecimiento en las distintas concentraciones salinas ensayadas. El crecimiento óptimo tuvo lugar sobre las concentraciones correspondientes al 20 y 25 % de sales (p/v), disminuyendo en general a concentraciones del 30 % (p/v) y presentando un número considerable de cepas, capacidad de crecer sobre intervalos comprendidos entre el 5 y el 15 % (p/v).

Todas las cepas aisladas de las salinas de Imón mostraron los siguientes resultados comunes: catalasa (+), arginina-deshidrolasa (+), producción de SH_2 a partir de cisteína (+), hidrólisis de almidón (—), hidrólisis de caseína (—), lipasa sobre tween 60 (—), ureasa (—) y reducción de nitratos a N_2 (—). Los resultados correspondientes al resto de las pruebas se presentan en la *tabla 3*.

Las cepas aisladas de las lagunas de Alcázar de San Juan mostraron los siguientes resulta-

Tabla 1. Características de las cepas aisladas en Imón

Características morfológicas					Cálculo de la concentración salina óptima						Utilización de fuentes de carbono				
Cepa	A	B mm	C	D	5	10	15	20	25	30	Glucosa	Glicerol	Fructosa	Lactosa	Galactosa
1	Circular	2	Rojo	—	—	+	+	++	+++	+++	—	+	—	—	—
2	Circular	2	Rojo	—	—	—	—	—	+++ (*)	+++	++	++	++	—	—
3	Circular	2	Rojo	—	—	+	++	++	+++	—	++	+	++	+	+
4	Circular	1	Rosa	—	—	—	++	++	+++	+	+	++	++	+	+
5	Oval	1 × 2	Rojo	—	—	—	+	++	+++	++ (*)	++	++	+	+	+
6	Circular	1,8	Rojo	+	—	—	—	+	+++	+++	+	+	++	+	++
7	Circular	1,5	Rosa	+	—	—	—	+	+++	++ (*)	—	—	—	—	—
8	Circular	1,5	Rosa	+	—	—	—	++	++	+++ (*)	—	—	—	++	—
9	Circular	1	Rojo	+	—	—	—	—	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
10	Circular	1,5	Rojo	+	—	—	—	+	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
11	Circular	1,5	Rosa	+	—	—	—	+	+++	+++ (*)	—	—	+	—	—
12	Circular	2	Rosa	+	—	—	—	+	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
13	Circular	1,3	Rosa	+	—	—	—	+	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
14	Oval	1,5	Rosa	+	—	—	—	+	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
15	Circular	2,2	Rojo	+	—	—	+	++	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
16	Circular (*)	1,5	Rosa	—	—	—	—	++	+++	+++ (*)	+	—	+	—	—
17	Circular	1,2	Rojo	+	—	—	—	++	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
18	Circular	1,2	Rosa	+	—	—	—	++	+++	+++ (*)	—	—	++	+	—
19	Circular	1,2	Rosa	+	—	—	—	++	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
20	Oval	2 × 1,2	Rosa	—	—	—	—	++	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
21	Circular	1,2	Rosa	+	—	—	—	++	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
22	Oval	0,8 × 1,2	Rosa	+	—	—	—	++	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
23	Circular	1,2	Rosa	+	—	—	—	+	+++	+++ (*)	—	—	—	—	—
24	Circular	2,7	Rojo	—	—	—	+	+	+++	+++ (*)	+	+	+	+	+
25	Circular	1	Rojo	—	—	—	—	+	+++	+++ (*)	++	++	+	—	++
26	Circular	1,2	Rojo	+	—	—	—	+	+++	+++	++	++	—	++	++
27	Circular	1,2	Rojo	+	—	—	+	+++	+	—	—	—	—	++	++
28	Circular	0,7	Rojo	—	—	—	—	++ (*)	++	—	—	—	—	—	—
29	Circular	1,2	Rosa	+	—	—	+	+++	+++	+++	++	++	—	—	++
30	Circular	0,7	Rosa	+	—	—	—	+	+++	+++	—	—	—	—	—
31	Circular	0,6	Rojo	—	—	—	—	++	+++	+++	++	—	+	—	—
32	Circular	0,6	Rojo	—	—	—	—	++	+++	+++	—	—	—	—	—
33	Circular	0,7	Rojo	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—
34	Circular	0,7	Rosa	+	—	—	—	++	+++	+++	—	++	+	++	—
35	Circular	0,7	Rojo	—	—	—	+	++ (*)	+++	++ (*)	+	+	+	+	+

A, forma de la colonia. B, tamaño de la colonia. C, color de la colonia. D, presencia de vacuolas de gas. (*) Borde irregular. (*) Indica pérdida de coloración del cultivo.

Tabla 2. Características de las cepas aisladas en Alcázar de San Juan

Características morfológicas							Cálculo de la concentración salina óptima Porcentaje						Utilización de fuentes de carbono				
Cepa	A	B mm	C	D	E	F	5	10	15	20	25	30	Glucosa	Glicerol	Fructosa	Lactosa	Galactosa
1	Oval	3,5 × 2,5	Amarillo	—	Bacilo	—	+	++	++	+++	+++	+	+	—	+	—	—
2	Circular	4	Marrón	+	Bacilo	—	++	+++	+++	+++	+++	+	—	+	—	—	—
3	Oval	4 × 3	Beige	—	Coco	—	—	—	++	+++	+++	—	++	+	++	+	++
4	Circular	1,3	Amarillo	+	Coco	—	++ (*)	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	++	+
5	Oval	4 × 3	Beige	—	Bacilo	—	—	—	++	+++	+++	—	—	—	—	—	—
6	Circular	1,2	Beige	+	Bacilo	—	—	+	++	+++	+++	+	—	—	—	—	—
7	Circular	2	Rojo	—	Bacilo	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	+
8	Circular	1,1	Rojo	—	Bacilo	—	—	—	—	+++	+++	+	++	++	—	—	—
9	Circular	1,5	Blanco	+	Bacilo	—	—	+	++	+++	+++	+	—	—	—	—	—
10	Circular	2	Amarillo	—	Bacilo	—	+	+++	+++	+++	+++	+	++	—	—	—	—
11	Circular	5	Transparente	—	Bacilo	—	+	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	—	—
12	Circular	2	Rojo	—	Bacilo	—	—	—	—	++	+	—	++	++	—	++	—
13	Circular	3	Rosa	+	Bacilo	—	—	—	+++	+++	+++	—	++	++	++	++	—
14	Circular	1,1	Rojo	—	Bacilo	—	—	—	+	+	+++	+	—	+	+	+	—
15	Circular	3	Rojo	+	Bacilo	—	—	—	—	++	+++	—	++	++	++	++	++
16	Circular	3	Rojo	—	Bacilo	—	—	—	—	+	+++	—	++	+	+	++	++

A, forma de colonia. B, tamaño de la colonia. C, color de la colonia. D, respuesta a la tinción de gram. E, forma del microorganismo. F, presencia de vacuolas de gas. (*) Indica pérdida de coloración del cultivo.

Tabla 3. Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las cepas aisladas de las salinas de Imón

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—
Lipasa (tween 20)	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(tween 40)	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
(tween 80)	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fosfatasa	—	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—
Reducción de nitra- tos a nitritos	—	—	+	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	+	+
Indol	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—	+	+
Crecimiento a ph 4,5	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Producción de SH ₂ (SO ₄ H ₂)	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Aerobios estrictos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+

dos comunes: catalasa (+), arginina-deshidrolasa (+), hidrólisis de almidón (—), hidrólisis de caseína (—), lipasa sobre tween 60 (—), ureasa (—) y reducción de nitratos a N₂ (—). Los resultados correspondientes al resto de las pruebas, se presentan en la tabla 4.

elevado número de cepas halófilas estrictas aisladas en las salinas de Imón, en contraste con el escaso número aislado de las lagunas de Alcázar de San Juan, hábitats que presentan, sin embargo, una concentración de sales similar, en ambos casos superior al 30 % (p/v).

La diferencia observada pudiera

Tabla 4. Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las cepas aisladas de las lagunas de Alcázar de San Juan

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Oxidasa	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	+
Lipasa (tween 20)	—	—	+	—	+	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
(tween 40)	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
(tween 80)	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	+
Fosfatasa	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	+
Reducción de nitratos a nitritos	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Indol	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Producción de SH ₂ (SO ₄ Mg)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Producción de SH ₂ (cisteína)	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
Aerobios estrictos	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+

Susceptibilidad a los distintos agentes antibacterianos

El ensayo de esta prueba en las cepas aisladas dio resultados variables según la procedencia de las mismas. De las cepas aisladas en Imón, 9 (25,7 %) (núms. 1, 3, 4, 5, 24, 25, 27, 28 y 33) se mostraron sensibles a todos los agentes ensayados y el resto (75,3 %) únicamente mostraron sensibilidad a la bacitracina.

Las cepas aisladas de las lagunas de Alcázar de San Juan se mostraron sensibles a todos los agentes ensayados, a excepción de una de ellas (núm. 14) que únicamente mostró sensibilidad a la bacitracina.

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio refleja el

ser debida a que las lagunas de Alcázar de San Juan se encuentran sometidas a un aporte continuo de materia orgánica procedente de los vertidos de aguas residuales y basuras, que contaminan enormemente sus aguas y a las variaciones estacionales que alteran su composición. Los cambios sufridos por este hábitat, favorecen la permanencia en el mismo de bacterias que no requieren concentraciones constantes de sales, de ahí el amplio margen de tolerancia a la sal que presentan las cepas aisladas en esta zona.

En estudios realizados en otros hábitats salinos no litorales (2, 10) se observa, al igual que en nuestro caso, una gran amplitud en los márgenes de tolerancia a la sal de las cepas aisladas.

Las zonas de estudio ofrecen una microflora diferente, mucho menos homogénea en las lagunas

de Alcázar de San Juan. De las cepas aisladas en esta zona, únicamente la catalogada con el núm. 14 se puede considerar halófila extrema y perteneciente al género *Halobacterium* en base a sus características morfológicas, fisiológicas y de susceptibilidad a los distintos agentes antibacterianos ensayados. El resto de las cepas aisladas de esta zona (93,7%), se podrían considerar halotolerantes.

De las cepas aisladas en las salinas de Imón, 26 (74,2%) se pueden considerar halófilas extremas, pertenecientes al género *Halobacterium*, (núms. 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 29, 30, 31, 32, 34 y 35), si se tiene en cuenta su margen de tolerancia a la sal, sus características morfológicas y bioquímicas y su respuesta a los agentes antibacterianos. De estas cepas, hay que destacar la capacidad de metabolizar carbohidratos que presentan las cepas núms. 2, 6, 26, 29, 31, 34 y 35, propiedad que las asemeja a la especie *H. saccharovororum* (18). Las 19 cepas halófilas extremas restantes aisladas en las salinas de Imón se pueden considerar pertenecientes al género *Halobacterium*, pero su clasificación en especies resulta difícil, dadas las diferencias de comportamiento que presentan respecto de las descritas en la bibliografía (3, 4, 8, 18). El resto de las cepas aisladas en esta zona (25,7%), se corresponden con cepas halotolerantes, que hasta el momento no se han clasificado taxonómicamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAUER, A. W.; KIRBI, W. M. N.; SHERRIS, J. C., and TURK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk methods. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-96.
2. BRISOU, J.; COURTOIS, D., and DENIS, F. 1974. Microbiological study of a hypersaline lake in french somaliland. *Appl. Microbiol.*, 27, 819-22.
3. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Part 7, 269-72. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
4. COLWELL, R.; LITCHFIELD, C. D.; VREELAND, R. H.; KIEFFER, L. A., and GIBBONS, N. E. 1979. Taxonomic studies of red halophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29, 379-99.
5. DUSSAULT, H. P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, 70, 484-85.
6. EIMHJELLEN, K. 1965. In H. G. SCHLEGEL (ed.) *Anreicherungskultur und Mutantenauslese*, 126. Fischer Verlag, Stuttgart.
7. GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, C. and RAMÍREZ, C. 1978. *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 24, 710-15.
8. MULLAKHANBHAI, M. F., and LARSEN, H. 1975. *Halobacterium volcanii* sp. nov., a dead sea *Halobacterium* with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.*, 104, 207-14.
9. OCTAVIO DE TOLEDO Y UBIETO, F., y LÓPEZ-CAMACHO, B. 1976. Relaciones entre el flujo subterráneo y la calidad química de las aguas en formaciones continentales: lago del Sureste de Toledo. *Acta del 1.º Simposio Nacional de Hidrogeología*, 1, 1078-101.
10. POST, F. J. 1977. The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb. Ecol.*, 3, 143-65.
11. QUESADA, E.; VENTOSA, A.; RODRÍGUEZ-VALERA, F., and RAMOS-CORMENZANA, A. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 53, 155-61.
12. RAMÓN, F., y RODRÍGUEZ-VALERA, F. 1977. Estudio taxonómico de 28 cepas del género *Halococcus* procedentes de

- una salina solar. Ars. Pharm., 18, 710-15.
13. RODRÍGUEZ-VALERA, F.; RUIZ-BERRAQUE-RO, F., and RAMOS-CORMENZANA, A. 1979. Isolation of extreme halophiles from seawater. Appl. Environ. Microbiol., 38, 164-65.
 14. RODRÍGUEZ-VALERA, F.; RUIZ-BERRAQUE-RO, F., and RAMOS-CORMENZANA, A. 1980. Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. Can. J. Microbiol., 26, 1259-63.
 15. RODRÍGUEZ-VALERA, F.; RUIZ-BERRAQUE-RO, F., and RAMOS-CORMENZANA, A. 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. J. Gen. Microbiol., 119, 535-38.
 16. SEHGAL, S. N., and GIBBONS, N. E. 1960. Effect of ions on the growth of *Halobacterium cutirrubrum*. Can. J. Microbiol., 6, 165-69.
 17. TEMPLADO, D., y MESEGUER, J. 1946. Hoja de Sigüenza (núm. 461). Instituto Geológico y Minero de España.
 18. TOMLINSON, G. A., and HOCHSTEIN, L. I. 1976. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. Can. J. Microbiol., 22, 587-91.

ESTUDIO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS EN EL RIO HENARES

M. A., LAPEÑA, M. E. ARIAS y F. LABORDA

Departamento de Microbiología, Universidad de Alcalá de Henares (Madrid)

(Aceptado: 21 de febrero de 1984)

RESUMEN

En el estudio microbiológico del río Henares, se ha observado que el número de microorganismos presentes está en relación directa con la estación del año y el punto de muestreo, pudiéndose modificar por parámetros como el pH y la temperatura.

La identificación de microorganismos realizada puso de manifiesto que las enterobacterias que presentan una mayor frecuencia de aparición son las pertenecientes a la tribu Escherichieae y a la tribu Klebsiellae, presentando menor frecuencia de aparición las pertenecientes a la tribu Proteae y a la tribu Erwiniaceae. No se han aislado cepas pertenecientes a la tribu Yersiniaceae. Se ha observado que respecto a las cepas tipo, un elevado porcentaje de las cepas de *Escherichia coli* aisladas han desarrollado resistencias a varios de los agentes antimicrobianos ensayados. El recuento de bacteriófagos de *Escherichia coli* sigue las variaciones estacionales y puntuales observadas en otros grupos microbianos. Se han encontrado tres tipos morfológicos distintos de bacteriófagos de *Escherichia coli*.

SUMMARY

The microbiological study of the river Henares showed the number of microorganisms present is season-related, and may be altered by certain parameters such as pH. Of the identified microorganisms, the prevailing Enterobacteriaceae belong to the tribe Escherichieae and tribe Klebsiellae; those of tribe Proteae and tribe Erwiniaceae appeared with lower frequency. No strains belonging to tribe Yersiniaceae have been de-

tected. Compared to standard strains, a high percentage of *Escherichia coli* strains isolated, have developed resistances to several of the antimicrobial agents tested. The number of *E. coli* bacteriophages follow the pattern of season and punctual variations observed in other microbial groups. It was observed that the counting was influenced possibly by water pH. Three different morphological types of bacteriophages have been found.

INTRODUCCIÓN

Es creciente la preocupación por el lamentable estado de polución que presentan con frecuencia las aguas superficiales.

El término polución, definido en la Asamblea Consultiva del Consejo de Europa, hace referencia a modificaciones más o menos importantes de los equilibrios físicos, químicos o biológicos que inciden en la calidad del agua. Estas modificaciones, provocadas generalmente por el hombre, hacen al agua impropia para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca, las actividades recreativas, etc. (30).

Teóricamente, cualquier bacteria puede llegar al agua y propagarse por este medio, aunque en la práctica esta posibilidad se limita a un cierto tipo de microorganismos eliminados por heces u orina y que pueden provocar enfermedades de carácter epidémico. En este aspecto, la OMS (27-28) estima que alrededor de 500 millones de personas al año contraen algún tipo de enfermedad transmitida a través del agua o relacionada con ésta, con un balance total de 10 millones de defunciones al año, de las que un 50 % ocurren entre la población infantil.

El río Henares se encuentra sometido a múltiples causas de polu-

ción, debido, tanto a residuos industriales, como a que recibe los vertidos de algunos municipios por los que atraviesa en su curso. Motivados por la ausencia de estudios microbiológicos en el citado río, y a fin de contribuir con los ya existentes (9-10, 18, 24) a un mejor conocimiento del mismo, se ha llevado a cabo un estudio comparativo del contenido microbiano del río en diferentes puntos de su recorrido y en diferentes épocas del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recogida de muestras

Las muestras se recogieron en condiciones estériles, según las normas habituales (21). Los puntos de muestreo escogidos fueron: P-1, nacimiento del río Henares, término municipal de Horna (Guadalajara); P-2, puente de la carretera C-101, desviación a Tórtola de Henares, y antes del paso del río por Guadalajara capital; P-3, puente de la CN-II, (Km 53) tras el paso del río por Guadalajara capital; P-4, puente de la Oruga, desviación de la CN-II (Km 33) antes del paso del río por Alcalá de Henares; P-5, puente de Zulema, desviación de la CN-II, (Km 26) durante el paso del río por Alcalá de Henares; P-6, 300

m antes de la desembocadura en el Henares del río Camarmilla, tras el paso del río por Alcalá de Henares. La temperatura de las muestras se determinó *in situ*. El pH se determinó en nuestro laboratorio mediante la utilización de un pH-metro CRIŞON 501. Los caudales fueron consultados en el Ministerio de Obras Públicas (14).

2. Recuentos de microorganismos

Los recuentos se realizaron mediante la aplicación del método de las diluciones (1, 21), utilizando la solución patrón de Ringer (6), a la que añadimos dos tensoactivos tween 80 y triton-X-100, ambos al 0,01 %.

Los medios de cultivo utilizados fueron: agar estándar (Difco-0479); sabouraud-glucosa (glucosa, 20 g; extracto de levadura, 5 g; agar, 20 g; agua destilada, 1.000 ml; pH 7,0 $\pm$ 0,1). Agar G.A.E. (glucosa, 10 g; asparragina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; fosfato dipotásico 0,5 g; sulfato magnésico, 0,5 g; sulfato ferroso, 0,01 g; agar, 20 g; agua destilada, 1.000 ml; pH 7,0 $\pm$ 0,1). A estos dos últimos medios se añadieron penicilina-G y estreptomina (a 50 ppm) en condiciones estériles. Agar Levine (Difco-0005); agar de desoxicolato (Difco-0237); agar cetrímide (Merck-5284) y agar-manitol-salado (Difco-0306). Todos los medios anteriormente citados se sembraron en superficie incubándose a 37 °C durante 24 h, a excepción del agar G.A.E. y el de sabouraud-glucosa, que fueron incubados a 29 °C durante 5 h.

Asimismo, se realizaron recuentos mediante la técnica del número más probable (NMP) (21, 33), uti-

lizándose series de tres tubos inoculados con 10, 1, y 0,1 ml, respectivamente. Los medios utilizados fueron: lactosa-bilis-verde-brillante (Difco-0007) con campana de fermentación tipo Durham, y bacto SF (Difco-0315). Ambos medios fueron incubados 48 h a 37 °C.

3. Identificación de microorganismos gram-negativos

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa (12); catalasa (22); fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa, producción de gas y formación de SH₂, en medio triple azúcar con hierro (Difco-0265) (31); producción de indol (12); rojo de metilo (22); Voges-Proskauer (3); utilización de citrato (33); fermentación de inositol y arabinosa; producción de lisina y ornitina descarboxilasas (22). También se utilizó el sistema de identificación API de API System, S. A.

4. Estudio de la susceptibilidad de las cepas de *Escherichia coli* aisladas a distintos agentes antimicrobianos

Se aislaron e identificaron un total de 44 cepas de *Escherichia coli* en los diferentes puntos de muestreo, determinándose su susceptibilidad mediante la técnica de difusión en agar (4), frente a los siguientes compuestos antibacterianos: polimixina B (300 U.I.), sulfadiazina (300 µg), penicilina G (10 U.I.), eritromicina (15 µg); cefalotina (30 µg); vancomicina (30 µg); clo-ranfenicol (30 µg); tetraciclina (30 µg); kanamicina (30 µg); estrepto-

micina (10 μ g); ácido nalidíxico (30 μ g) y bacitracina (10 U.I.), todos ellos de la casa comercial Difco. [según las normas del N.C.C.L.S., (25)].

5. Recuento y caracterización morfológica de bacteriófagos de *Escherichia coli*

Los recuentos se realizaron por el método de la bicapa de agar (20), utilizándose medio L.B. (16). La cepa huésped utilizada fue *Escherichia coli* K-12 (CECT-424), llevándose a incubar a 37 °C durante 24 h.

La caracterización morfológica de los bacteriófagos aislados, se realizó mediante el método de tinción negativa (ácido fosfotúngstico al 2 %, p/v, a pH 6,9).

Las microfotografías electrónicas se realizaron en el microscopio electrónico de transmisión del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», del CSIC (Siemens, modelo Elmiskop I).

RESULTADOS

En las determinaciones de temperatura, se aprecia la relativa homogeneidad del punto núm. 1, influido sin duda por el poco caudal del río y las diferentes horas de recogidas de las muestras (15,30 h en invierno y 22 h en verano). Por el contrario, el resto de puntos sufren oscilaciones medias que van de los 7,5 °C en invierno, a los 26 °C en verano (figura 1).

En cuanto al pH, se mantiene siempre entre 7 y 8, excepto en el punto núm. 5 (en primavera), donde se registró un pH de 8,89. En ge-

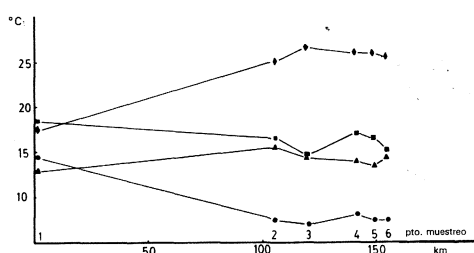


Figura 1. Temperatura estacional del río Henares. ◆, verano; ■, primavera; ▲, otoño; ●, invierno

neral, se observa un aumento de pH desde el punto 1 al 2, para descender luego en el núm. 3, equilibrarse en el 4, aumentar de nuevo en el 5, y descender en el 6 (figura 2).

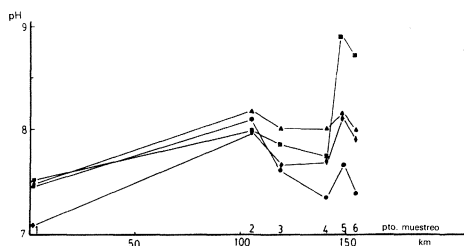


Figura 2. pH estacional del río Henares. ◆, verano; ■, primavera; ▲, otoño; ●, invierno

En relación con los caudales, se aprecia la homogeneidad de los mismos en Bujalaro, mientras que a medida que el río descende, éstos van siendo cada vez más dependientes de la estación, siendo la primavera la que presenta los caudales más altos, mientras que el verano presenta los más bajos (figura 3).

Por otra parte, se aprecia una tendencia general en los recuentos

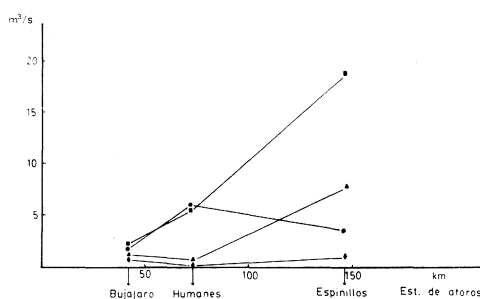


Figura 3. Caudal estacional del río Henares. ◆, verano; ■, primavera; ▲, otoño; ●, invierno

de los diversos grupos de microorganismos sometidos a muestreo (tabla 1), a alcanzar sus valores máximos en verano y los mínimos en invierno, observándose en la primavera y el otoño valores intermedios. Asimismo, se pudo apreciar una tendencia al aumento del número de microorganismos en el punto 2 respecto al 1, y un gran aumento en el punto 3, donde se al-

canzan los valores más altos, para descender de nuevo en el punto 4 y variar ligeramente en los puntos 5 y 6.

Los resultados obtenidos en la identificación de 235 cepas de microorganismos gram-negativos, se expresan en la tabla 2. Con estos datos se realizó una representación gráfica mediante diagramas circulares, de las frecuencias de aparición de los distintos microorganismos, donde se aprecia que los grupos más numerosos son el G-I (tribu Escherichiae), el G-II (tribu Klebsiellae) y el G-V (no enterobacterias), siguiéndoles por su frecuencia de aparición el G-III (tribu Proteeae) y el G-IV (tribu Erwiniaceae), grupo éste que sólo aparece en dos ocasiones. Hay que mencionar, por otro lado, la ausencia de aislamientos de microorganismos pertenecientes a la tribu Yersiniaceae (figura 4).

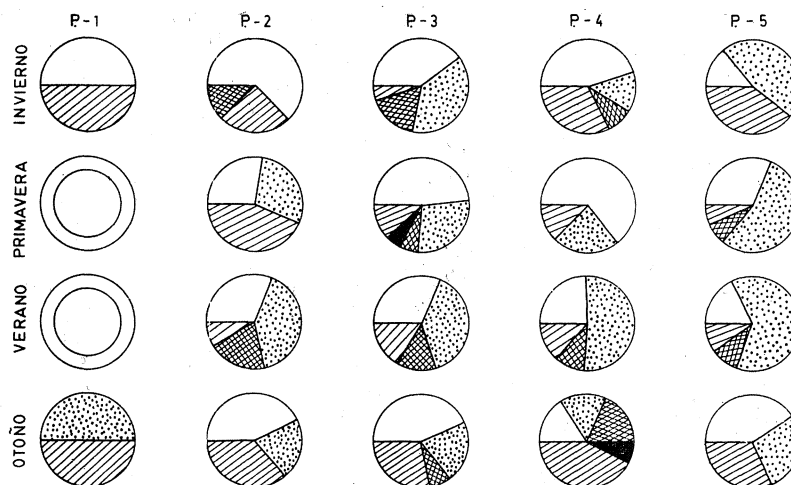


Figura 4. Distribución de los microorganismos gram-negativos. □, grupo I: tribu Escherichiae (Escherichia, Edwardsiella, Citrobacter, Salmonella y Shigella). ▨, grupo II: tribu Klebsiellae (Klebsiella, Enterobacter, Hafnia y Serratia). ▩, grupo III: tribu Proteeae (Proteus). ▧, grupo IV: tribu Erwiniaceae (Erwinia). ░, grupo V: no enterobacterias. ○, sin aislamientos

Tabla I. Resultados de los recuentos realizados, expresados en número de microorganismos/ml de agua

Microorganismo y medio de cultivo	Estación	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Bacterias aeróbicas agar-estándar	(*) I	2,5 10 ¹	1,1 10 ³	2,7 10 ⁴	1,1 10 ⁴	1,3 10 ⁴	8,7 10 ³
	P	2,1 10 ¹	9,3 10 ²	3,6 10 ⁵	3,1 10 ⁴	5,4 10 ³	5,4 10 ³
	V	3,5 10 ¹	7,8 10 ⁴	1,5 10 ⁷	1,7 10 ⁶	1,3 10 ⁶	2,5 10 ⁵
	O	6,0 10 ⁰	1,5 10 ³	7,4 10 ⁵	1,9 10 ⁴	2,0 10 ⁴	8,7 10 ³
Mohos agar-Sabouraud	I	6,0 10 ⁰	1,0 10 ¹	6,5 10 ²	8,0 10 ¹	2,0 10 ²	9,0 10 ¹
	P	1,1 10 ¹	8,0 10 ⁰	1,0 10 ³	1,4 10 ²	1,0 10 ¹	7,5 10 ¹
	V	1,7 10 ¹	2,6 10 ²	2,6 10 ³	1,4 10 ²	1,1 10 ²	1,4 10 ²
	O	3,0 10 ⁰	2,6 10 ¹	5,3 10 ²	1,1 10 ²	2,5 10 ²	8,0 10 ¹
Mohos agar-glucosa asparragina-extracto de levadura	I	7,0 10 ⁰	0,0 10 ⁰	2,0 10 ²	1,4 10 ²	3,0 10 ²	1,2 10 ²
	P	1,6 10 ¹	9,0 10 ⁰	4,3 10 ²	9,5 10 ¹	3,0 10 ¹	8,0 10 ¹
	V	1,9 10 ¹	1,2 10 ²	1,9 10 ³	5,5 10 ¹	9,0 10 ¹	4,0 10 ¹
	O	1,0 10 ⁰	4,6 10 ¹	4,1 10 ²	1,1 10 ²	1,8 10 ²	6,0 10 ¹
Coliformes (**) lactosa-bilis-verde brillante	I	9,1 10 ⁰	2,4 10 ²	1,5 10 ³	4,6 10 ²	2,1 10 ³	1,5 10 ³
	P	3,6 10 ⁰	2,4 10 ²	+1,1 10 ⁴	+1,1 10 ³	4,3 10 ²	2,3 10 ²
	V	1,5 10 ¹	+1,1 10 ³	+1,1 10 ⁵	2,9 10 ³	7,5 10 ³	4,6 10 ³
	O	3,6 10 ⁰	1,1 10 ³	+1,1 10 ⁵	+1,1 10 ³	1,5 10 ³	1,1 10 ³
Coliformes agar-Levine	I	2,0 10 ⁰	1,3 10 ²	9,2 10 ²	4,9 10 ³	1,2 10 ³	8,0 10 ²
	P	0,0 10 ⁰	1,4 10 ²	1,9 10 ⁴	1,6 10 ³	3,0 10 ²	1,8 10 ²
	V	0,0 10 ⁰	7,1 10 ³	1,9 10 ⁵	2,6 10 ³	5,9 10 ³	3,1 10 ³
	O	2,0 10 ⁰	9,1 10 ²	1,1 10 ⁵	1,3 10 ³	1,4 10 ³	7,2 10 ²
Coliformes agar-desoxicolato	I	1,1 10 ¹	3,3 10 ²	1,3 10 ⁴	5,2 10 ³	5,6 10 ³	3,5 10 ³
	P	0,0 10 ⁰	3,4 10 ²	2,1 10 ⁴	1,3 10 ⁴	2,0 10 ³	1,8 10 ³
	V	1,2 10 ¹	6,3 10 ⁴	8,7 10 ⁵	2,1 10 ⁴	2,0 10 ⁴	1,7 10 ⁴
	O	1,0 10 ⁰	1,1 10 ³	1,7 10 ⁵	2,7 10 ³	1,0 10 ⁴	2,1 10 ³
Estafilococos agar-manitol-salado	I	1,0 10 ⁰	2,0 10 ⁰	3,0 10 ¹	3,0 10 ¹	0,0 10 ⁰	2,0 10 ⁰
	P	0,0 10 ⁰	6,0 10 ⁰	1,4 10 ²	4,0 10 ¹	0,0 10 ⁰	1,0 10 ¹
	V	0,0 10 ⁰	5,5 10 ²	8,7 10 ²	1,5 10 ²	1,9 10 ²	1,2 10 ²
	O	0,0 10 ⁰	4,0 10 ¹	2,0 10 ²	4,0 10 ¹	3,5 10 ¹	2,7 10 ¹
Estreptococos(**) bacto S.F.	I	3,6 10 ⁰	9,1 10 ⁰	2,3 10 ²	4,3 10 ¹	1,5 10 ²	2,1 10 ²
	P	0,0 10 ⁰	3,6 10 ⁰	1,5 10 ³	9,3 10 ¹	9,1 10 ¹	9,1 10 ¹
	V	3,6 10 ⁰	2,4 10 ²	9,3 10 ³	2,1 10 ²	7,3 10 ²	4,3 10 ²
	O	0,0 10 ⁰	2,3 10 ¹	4,6 10 ³	7,5 10 ¹	2,3 10 ²	2,1 10 ²
<i>Pseudomonas</i> agar-cetrimide	I	0,0 10 ⁰	0,0 10 ⁰	8,0 10 ¹	2,0 10 ¹	3,0 10 ¹	2,1 10 ¹
	P	0,0 10 ⁰	0,0 10 ⁰	2,4 10 ²	1,0 10 ¹	1,0 10 ¹	3,0 10 ¹
	V	0,0 10 ⁰	2,2 10 ²	1,5 10 ³	4,0 10 ¹	4,0 10 ¹	2,0 10 ¹
	O	0,0 10 ⁰	0,0 10 ⁰	3,6 10 ²	0,0 10 ⁰	7,5 10 ⁰	1,3 10 ¹

(*) I, invierno; P, primavera; V, verano; O, otoño. (**). Determinaciones realizadas aplicando el método del número más probable.

Tabla 2. Relación del número de cepas gram-negativas identificadas en el río Henares

Microorganismos	Punto 1				Punto 2				Punto 3				Punto 4				Punto 5			
	(*)I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O
<i>Citrobacter freundii</i>	1	—	—	—	3	—	1	1	4	1	1	1	5	7	2	1	—	1	—	—
<i>C. intermedius</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—
<i>Enterobacter aerogenes</i>	—	—	—	1	—	—	1	—	1	—	1	1	—	1	1	—	2	1	1	1
<i>E. cloacae</i>	—	—	—	—	1	1	—	1	2	3	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—
<i>Erwinia</i> sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	2	2	2	2	3	5	5	5	—	2	3	—	2	3	4	4
<i>Hafnia alvei</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	—	—	5	1	2	1	8	2	—
<i>Klebsiella ozaenae</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	3	—	1	—
<i>K. pneumoniae</i>	—	—	—	—	1	—	—	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella</i> sp.	—	—	—	—	—	2	—	1	—	4	—	2	—	5	1	2	—	5	—	—
<i>Proteus morganii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. rettgeri</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Proteus</i> sp.	—	—	—	—	1	—	2	—	3	1	2	—	1	—	2	2	—	1	2	—
<i>Salmonella paratyphi</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Serratia marcescens</i>	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—
<i>Shigella</i> sp.	—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
No enterobacterias	1	—	—	1	2	3	1	3	1	1	4	4	5	2	3	6	6	1	2	5

(*) I, invierno; P, primavera; V, verano; O, otoño.

Los resultados obtenidos en el estudio de la susceptibilidad de las cepas de *Escherichia coli* a los agentes antimicrobianos ensayados, aparece representada en la figura 5. Se compararon estos resultados con los obtenidos en 4 cepas-tipo de *Escherichia coli* [ML 308 (CECT 424); K 12 (CECT 424); B (CECT 101) y ATCC 25922, que mostraron resistencia a 3 ó 4 de los agentes antimicrobianos ensayados (figura 6).

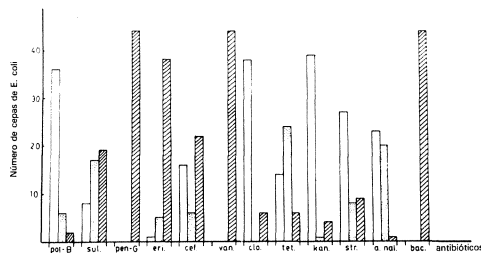
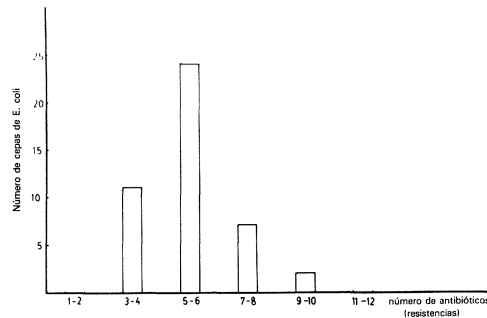


Figura 5. Actividad comparada de los diversos antibióticos ensayados: , sensibilidad alta; , sensibilidad intermedia; , resistencia

Figura 6. Resistencia comparada de las cepas de *E. coli* aisladas

Los recuentos de los bacteriófagos de *Escherichia coli* hallados, aparecen representados en la figura 7, en la que se observan variaciones dependientes de la estación y punto de muestreo. En las placas de recuento se hallaron tres tipos diferentes de calvas de lisis: las que denominamos pequeñas (1 mm de Ø); intermedias (1,5 - 2 mm de Ø) y grandes (3-4 mm de Ø), cu-

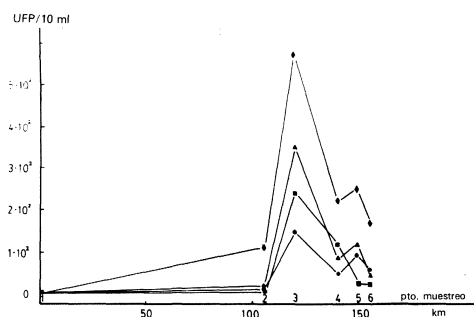


Figura 7. Recuentos de bacteriófagos de *E. coli*. ◆, verano; ■, primavera; ▲, otoño; ●, invierno

ya distribución se observa en la tabla 3.

DISCUSIÓN

En las determinaciones de temperatura, se aprecia la diferencia observada en todos los puntos entre el invierno y el verano, lo que influye en los resultados obtenidos. De igual forma, el pH de los puntos 5 y 6 en primavera (8,89 y 8,72, respectivamente), debido probablemente a vertidos de tipo industrial, afectó a los recuentos realizados, obteniéndose valores significativamente más bajos. En relación con los caudales, se puede observar cómo en invierno el

Tabla 3. Recuentos de los bacteriófagos de *Escherichia coli*

Estación	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Invierno	(*) T 0 G 0 I 0 P 0	T 8 G 0 I 0 P 8	T 144 G 3 I 17 P 124	T 43 G 0 I 0 P 43	T 87 G 0 I 0 P 87	T 52 G 0 I 2 P 50
	T 0 G 0 I 0 P 0	T 2 G 0 I 0 P 2	T 236 G 4 I 9 P 223	T 113 G 6 I 4 P 103	T 20 G 0 I 0 P 20	T 18 G 0 I 0 P 18
	T 0 G 0 I 0 P 0	T 108 G 3 I 0 P 105	T 573 G 12 I 33 P 525	T 219 G 7 I 13 P 199	T 235 G 1 I 8 P 226	T 164 G 1 I 5 P 158
	T 0 G 0 I 0 P 0	T 14 G 0 I 2 P 12	T 347 G 14 I 35 P 298	T 77 G 0 I 6 P 71	T 112 G 2 I 6 P 104	T 43 G 0 I 2 P 41

(*) T, número total de calvas de lisis. G, número de calvas de lisis grandes (3-4 mm de Ø). I, número de calvas de lisis intermedias (1,5-2 mm de Ø). P, número de calvas de lisis pequeñas (1 mm de Ø).

Número total de aislamientos: 2.615.

Distribución total relativa: Calvas de lisis grandes, 1,9 %; calvas de lisis intermedias, 6,7 %; calvas de lisis pequeñas, 91,4 %.

Mediante examen al microscopio electrónico de transmisión, se han encontrado tres tipos morfológicos distintos de bacteriófagos (*figuras 8-10*).

caudal del río desciende a partir de Humanes, debido a la filtración de aguas que recargan el acuífero subyacente, mientras que, por el contrario, en verano, es el acuífero

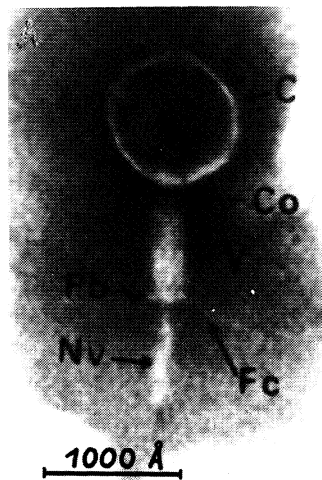


Figura 8. Bacteriófago de *E. coli* de la serie T-Par, aislado del punto 3. C, cápside. Co, collar. Fc, fibra de la cola. Nv, núcleo de la vaina. Pb, placa basal. V, vaina

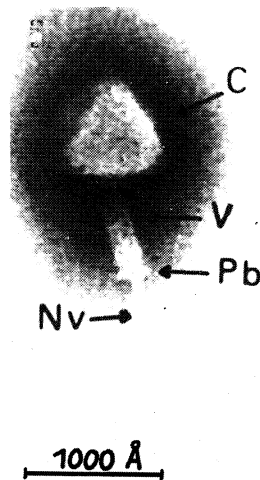


Figura 10. Bacteriófago de *E. coli* aislado del punto 3. Se aprecia la forma bipyramidal de la cápside, así como otras estructuras presentes en los bacteriófagos de la serie T-Par. C, cápside. Nv, núcleo de la vaina. Pb, placa basal. V, vaina

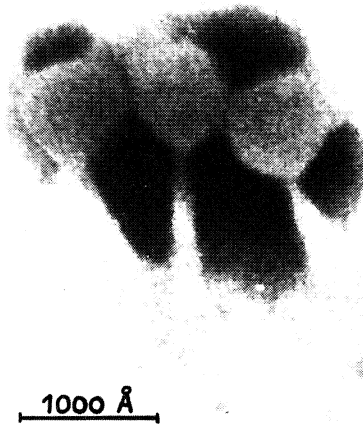


Figura 9. Bacteriófagos de *E. coli* aislados del punto 3. Obsérvese la divergencia de la cola y la cápside similar a los bacteriófagos de la serie T-Par

el que recarga al río (leve aumento del caudal a partir de Humanes), evitando así que el río se seque.

Los resultados obtenidos en los recuentos del punto 2, se deben quizá a los pequeños aportes de aguas residuales producidos por los pequeños municipios por los que atraviesa el río antes de llegar a Guadalajara (Fontanar, Yunquera de Henares, etc.). El gran aumento del punto 3, se debe evidentemente a los vertidos residuales de la ciudad de Guadalajara; a continuación, el río autodepura su contenido hasta el punto 4 (a pesar de los vertidos de Azuqueca de Henares y varias fábricas), a partir del cual comienzan los verti-

dos de Alcalá de Henares (puntos 5 y 6). Es interesante destacar las grandes oscilaciones observadas en el recuento de bacterias aerobias viables, ya que en verano se llegaron a obtener valores 500 veces superiores a los del invierno; también se observaron oscilaciones en el número de coliformes, estreptococos fecales y bacteriófagos de *Escherichia coli*, lo que se debe, a nuestro juicio, a la importante contaminación fecal que presenta el río Henares. En cuanto al número total de estafilococos y *Pseudomonas* es menor, si bien los mayores recuentos observados siguen ligados a los puntos de mayor contaminación fecal.

En relación con las fluctuaciones que se observan en las frecuencias de aparición de los distintos microorganismos gram-negativos, no parecen seguir ninguna norma concreta en su distribución estacional y puntual. Dada la importancia fitopatógica del G-IV (tribu Erwinieae), queremos resaltar su presencia en los puntos 3 (primavera) y 4 (otoño), debido a la existencia de explotaciones agrícolas colindantes.

Al comparar la actividad de los agentes antimicrobianos utilizados frente a las cepas de *Escherichia coli* aisladas, con la mostrada frente a las cepas-tipo, se pudo apreciar un aumento de resistencias frente a cefalotina, sulfadiacina y eritromicina, mientras que con el resto de agentes antimicrobianos, las cepas aisladas mostraron un comportamiento similar al de las cepas-tipo. Se comprobó, asimismo, que mientras dichas cepas se mostraban resistentes a 3 ó 4 de los agentes antimicrobianos ensayados, 24 de las 44 cepas aisladas

fueron resistentes a 9 ó 10 agentes antimicrobianos, con lo que se evidencia un aumento general en la resistencia mostrada por las cepas aisladas.

Los resultados obtenidos en los recuentos de bacteriófagos de *Escherichia coli* siguen las variaciones estacionales y puntuales mencionadas anteriormente; así, en invierno, se hallaron un total de 334 UFP (unidades formadoras de placas); en primavera, 389; en verano, 1.299 y, en otoño, 593. En cuanto a la distribución por puntos, en el P-1 no se realizó ningún aislamiento; en el P-2, 132; en el P-3, 1.300; en el P-4, 452; en el P-5, 454, y en el P-6, 277 UFP, respectivamente. Es interesante destacar el descenso de los recuentos de bacteriófagos en los puntos 5 y 6 durante la primavera, que pudiera ser debido al elevado pH determinado en estos puntos.

En el examen por microscopia electrónica de transmisión, se han hallado tres tipos morfológicos distintos de bacteriófagos de *Escherichia coli*, dos de los cuales no aparecen descritos en la bibliografía revisada: (7, 13, 15, 20, 29, 34). No se ha observado relación entre morfología externa del bacteriófago y tipo de calva de lisis producida.

Si se comparan los niveles de coliformes obtenidos en el punto de máxima contaminación ($8,7 \cdot 10^5$ coliformes/ml de agua), con los niveles descritos por otros autores para otros ríos españoles como el Guadarrama (32), Llobregat (7,26), Besós (7), Cadagua, Asúa, Galindo y Gobelás (2), se observan unos índices de contaminación similares. Estos valores difieren, sin embargo, de los obtenidos en estudios

análogos realizados en el río Manzanares (11), donde los niveles máximos de contaminación son superiores a los hallados por nosotros, si bien el número de especies aisladas es similar en ambos ríos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Prof. Dr. Miguel Rubio y colaboradores, del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», del CSIC, su inestimable ayuda en la realización de las microfotografías electrónicas que aparecen en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA, AWWA, WPCF. 1971. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 13 Ed. Washington.
2. ARTOLAZAGA, I.; UMARÁN, A.; ARALUCE, J., y BARCINA, J. 1983. Contribución de los ríos Cadagua, Asúa, Galindo y Gobelás a la contaminación de las aguas de la Ría de Bilbao. Actas IX Congr. Nac. Microbiol., 947-48.
3. BARRIT, M. M. 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naftol. J. Pathol. Bacteriol., 42, 441.
4. BAUER, A. W.; KIRBY W.M.M.; SHERRIS, J.C., and TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45, 493-96.
5. Boletín Oficial del Estado. 1975. Decreto 607/1975, del 29-3-75.
6. BOSCH, A.; GIRONÉS, R.; LUCENA, F., y JOFRE, J. 1983. Relación entre los niveles de virus animales y de bacterias fecales en aguas fluviales. Actas IX Congr. Nac. Microbiol., 1, 941-42.
7. BOY DE LA TOUR, E., and KELLENBERGER, E. 1965. Aberrant forms of T-even phage head. Virology 27, 222-25.
8. BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. (Ed.). 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
9. CATALAN, J. G., y SANTOS, M. 1966. Contribución al estudio del poder autodepurador del río Henares. I Coloquio de Investigaciones sobre el Agua, Barcelona.
10. CATALÁN, J. G.; SANTOS, M., y EGIDO, S. 1967. Contribución al estudio del poder autodepurador del río Henares. Segundo Coloquio de Investigaciones sobre el Agua. Pamplona.
11. CAZORLA, M., y ARROYO, J. A. 1981. Distribución de estirpes de Enterobacteriaceae del río Manzanares. Actas VIII Congr. Nac. Microbiol., 258.
12. COWAN, S. T., and STEEL, K. J. 1966. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge.
13. CUMMINGS, D. J. 1963. Subunit basis of head configurational changes in T2 bacteriophage. Biochem. Biophys. Acta, 68, 472-78.
14. Dirección General de Obras Hidráulicas. Anuarios de Aforos.
15. DOUGLAS, J. 1978. Bacteriófagos. Editorial Omega, Barcelona.
16. DUBNAU, D.; GOLDTHWAITE C.; SMITH, I., and MARMUR, J. 1967. Genetic mapping in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol., 27, 163-85.
17. EDWARDS, P. E., and EWING, W. H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Cambridge University Press, Cambridge.
18. ELORRIETA, I. 1980. Biología de la contaminación del sistema Sorbe-Henares, Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
19. EWING, W. H., and DAVIS, B. R. 1970. Media and Test for Differentiation of Enterobacteriaceae. Center for Disease Control, Atlanta.
20. FRAENKEL-CONRAT, H. 1972. Química y Biología de los Virus. Editorial Omega, Barcelona.
21. GUINEA, J.; SANCHO, J., y PARÉS, R. 1979. Análisis microbiológico de aguas. Editorial Omega, Barcelona.
22. MAC FADDIN, J. F. 1976. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
23. MAN, J. C. de. 1975. The probability of the Most Probable Number. Eur. J. Appl. Microbiol., 1 67-68.

24. MORA, J., y CATALÁN, J. G. 1967. Estudio de la polución por detergentes de los ríos Jarama y Henares. II Coloquio de Investigaciones sobre el Agua, Pamplona.
25. National Commission for Clinic Laboratory Standard. 1979. Performance Standard for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Washington.
26. OLIVER, B. 1967. Control sanitario del agua de abastecimiento a la ciudad de Barcelona y otros municipios de influencia. Agua, 5, 20-33.
27. Organización Mundial de la Salud. 1972. Normas Internacionales para el uso del Agua Potable. Ginebra.
28. Organización Mundial de la Salud. 1977. Vigilancia de la Calidad del Agua Potable. Monografía 63, Ginebra.
29. PENNINGTON, R. 1979. Virología Molecular. Editorial Omega, Barcelona.
30. PUMAROLA, A. 1979. Análisis Microbiológicos de Aguas, prólogo. Editorial Omega, Barcelona.
31. CORMENZANA, R. 1979. Taxonomía Bacteriana. Editorial Universidad de Granada, Granada.
32. ROSA, M. C. DE LA; MOSO, M. A.; DÍAZ F., y GARCÍA, M. L. 1983. Dinámica y distribución de la micropoblación de interés sanitario y ecológico del río Guadarrama. Actas IX Congr. Nac. Microbiol., 1, 883-84.
33. SIMMONS, J. S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of the typhoid-colon-aerogenes groups and for isolation of certain fungi. J. Infect. Dis., 39, 209-14.
34. SIMON, L. D., and ANDERSON, T. F. 1967. The infection of *Escherichia coli* by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope. II. Structure and function of the baseplate. Virology, 32, 298-305.
35. STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G.; BALOWS, A., and SCHLEGEL, H. G. (Ed). 1981. The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York.

COMPONENTES AROMATICOS DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA DEL JEREZ

M. A. ALVAREZ-BATISTA y E. GARCIA-MAIQUEZ

Centro de Investigación, Desarrollo y Control de Calidad de González
Byass, S. A., Jerez de la Frontera (Cádiz)

(Aceptado: 6 de julio de 1984)

RESUMEN

Se ha estudiado la influencia que tienen las diferentes especies de levaduras: *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces*, en el contenido final de alcoholes superiores y ésteres etílicos de mostos fermentados. Se confirma la importancia de las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en la formación de estos componentes, poniéndose de manifiesto que una aireación, durante la fermentación, produce un aumento del 100 % en el contenido global de los alcoholes estudiados y no ejerce, en las condiciones ensayadas, efecto apreciable sobre los ésteres etílicos.

Los destilados, obtenidos de vinos en presencia de las levaduras que intervinieron en el proceso fermentativo, tienen un mayor contenido —hasta del 100 %— de los ésteres etílicos no influyendo sobre los alcoholes superiores.

SUMMARY

A study has been made of the influence that the different species of yeasts: *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia* and *Saccharomyces*, has on the final content of higher alcohols and ethyl esters in fermented grape musts. The importance has been confirmed of the species *S. cerevisiae* and *S. bayanus* in the formation of these compounds, showing that an aeration during the fermentation produces an increase of 100 % in the total quantity of the alcohols studied, but does not have any appreciable effect, under the tested conditions on the ethyl esters.

The distilled alcohols obtained from wines in the presence of the yeasts which intervene in the fermenting process, have a higher content —as much as 100 %— of the ethyl esters, but there is no influence on the higher alcohols.

INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación alcohólica del Jerez se producen, junto al etanol y CO₂, otros componentes —alcoholes superiores y ésteres etílicos de ácidos grasos— cuyo origen y evolución ha sido ampliamente estudiado (2, 4, 8-10). En este proceso, la naturaleza del sustrato, las condiciones de la fermentación, las levaduras que intervienen, son factores que condicionan las concentraciones finales de estos compuestos. Es cierto que los alcoholes superiores, en destilados alcohólicos, definen la calidad y procedencia vinica; pero son los ésteres etílicos, como ha demostrado Nordström (5), la base aromática de los destilados, destacando el caproato, caprilato, caprato y laurato de etilo; de aquí que su formación, evolución y factores que inciden sobre ellos durante la fermentación constituyen el objetivo básico de este trabajo.

El demostrado papel que desempeñan las levaduras acompañantes de los mostos en la formación de estos componentes secundarios, ha sido puesta de manifiesto por Soumalainen (9). Las recientes aportaciones de Nykänen y cols. (6-7), confirmando la transferencia de los ésteres desde el interior de la levadura al medio de cultivo y su incidencia en las características aromáticas del mismo, nos ha llevado a un replanteamiento sobre la producción y evolución de alcoholes superiores y ésteres etílicos en la fermentación alcohólica del Jerez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras

Las levaduras utilizadas, *Kloeckera apiculata*, *Candida* sp, *Pichia fermentans* y *Saccharomyces cerevisiae* han sido aisladas de mostos de Jerez (3). *S. bayanus* lo fue de velos procedentes de estos mostos fermentados.

Fermentación

La fermentación se realizó sobre mostos estériles de uva Palomino con las siguientes características: azúcares, 180-200 g/l; nitrógeno total, 400-500 mg/l; acidez total, 37,2 mEq/l; sulfuroso, 30 mg/l; pH, 3, 45.

Las experiencias en el laboratorio se realizaron en garrafas estériles de 16 l de capacidad y las de tipo industrial, en botas de 500 l. El inóculo de levadura fue de 220-260.10³ cel./ml, siendo la temperatura de fermentación de 30 °C y la aireación, cuando se empleó, de 80 ml de aire min/l de mosto.

Preparación de las muestras para análisis

Las levaduras fueron separadas del vino por filtración, con filtros de membranas de 0,45 µ; el vino se sometió a destilación abierta hasta conseguir una graduación alcohólica de 40 ° G.L.

El destilado fue extraído con pentano redistilado (4 × 50 ml), y una vez combinados sus extractos y previa desecación con Na₂SO₄ anhidro, fueron concentrados en vacío hasta un volumen de 2 ml. Como patrón interno, para la determinación cuantitativa, se

empleó caprilato de isoamilo, adicionado al extracto de pentano antes de su concentración final.

Análisis cromatográfico

La inyección directa del destilado se realizó en columna de carbowax 1.500 al 0,3 % sobre carbowax-C de 3 m de longitud y 3,2 mm de diámetro exterior. Los parámetros de trabajo fueron: temperatura del horno, 100 °C, temperatura del bloque de inyección y detector, 150 °C, se empleó pentanol-2 como patrón interno.

El extracto concentrado fue analizado en columna de neopentilenglicol adipato al 10 % sobre cromosorb W-HP en columna de acero inoxidable de 4 m de longitud y 3,2

mm de diámetro externo. Siendo las condiciones de trabajo, de 170 °C la temperatura del horno, y 250 °C las temperaturas del bloque de inyección y del detector.

La cuantificación de los componentes se realizó calculando las áreas de los picos cromatográficos en relación con las áreas de los patrones de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del contenido en alcoholes superiores en mostos fermentados con distintas levaduras pone de manifiesto que las especies *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans* y *Candida* sp, crecidas sobre mostos de Jerez (tablas 1-2),

Tabla 1. Contenido en alcoholes superiores de mostos fermentados por distintas especies de levaduras. Las cifras expresan mg/l

Alcoholes superiores	<i>K. apiculata</i>		<i>P. fermentans</i>		<i>Candida</i> sp.		<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. bayanus</i>	
	cL(*)	sL(**)	cL	sL	cL	sL	cL	sL	cL	sL
n-propanol	4	5	4	4	21	23	24	24	24	23
Isobutanol	10	9	6	6	19	21	56	57	95	81
2-metilbutanol-1	1	1	2	2	6	6	22	20	27	26
3-metilbutanol-1	10	10	7	6	47	50	178	178	207	195
Total	25	25	19	18	93	100	280	279	353	325

(*) cL, destilado del vino, con levadura. (**) sL, destilado del vino, sin levadura

Tabla 2. Contenido en ésteres etílicos de mostos fermentados por distintas especies de levaduras. Las cifras expresan mg/l

Esteres etílicos	<i>K. apiculata</i>		<i>P. fermentans</i>		<i>Candida</i> sp.		<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. bayanus</i>	
	cL(*)	sL(**)	cL	sL	cL	sL	cL	sL	cL	sL
Caproato de etilo	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,7	1,0	0,4	0,3
Caprilato de etilo			0,1	0,4	0,4	0,5	1,1	0,4	0,9	0,2
Caprato de etilo		0,2			0,4		2,8	0,2	3,3	0,1
Laurato de etilo				0,1			1,6		1,5	0,1
Total	0,4	0,4	0,3	0,7	0,9	0,9	6,2	1,6	6,1	0,7

(*) cL, destilado del vino, con levadura. (**) sL, destilado del vino, sin levadura.

no producen cantidades apreciables de alcoholes superiores y ésteres etílicos de cadena media; aún teniendo en cuenta que *K. apiculata* está presente en los mostos naturales en porcentajes superiores al 30 % al inicio de la fermentación. En los mostos fermentados con *Saccharomyces cerevisiae*, la formación de estos componentes aromáticos llega a valores medios de 280 mg/l para los alcoholes superiores, no apreciándose diferencias cuando la destilación se realiza en presencia o ausencia de las propias levaduras que intervienen en el proceso. Sin embargo, en la producción de ésteres etílicos sí se observa una diferencia importante en función de que los destilados se realicen en presencia o no de las levaduras, con valores respectivos de 6,2 mg/l y de 1,6 mg/l.

Los componentes secundarios producidos por el *Saccharomyces bayanus* —levadura de flor del Jerez— durante la fermentación del mosto fueron de 353 mg/l y 325 mg/l, superiores en un 18 % a los obtenidos por el *S. cerevisiae* y

manteniéndose los datos para los ésteres etílicos, como puede observarse en las *tablas 1-2*.

Una vez confirmada la escasa incidencia de las especies acompañantes en la producción de componentes secundarios, centramos nuestro estudio en el género *Saccharomyces*. La *tabla 3* recoge la evolución de los alcoholes superiores durante la fermentación del mosto por *S. cerevisiae*, pudiéndose observar que la formación de los alcoholes estudiados varía a lo largo del proceso. El propanol que sólo representa el 7,5 % en peso del total de los alcoholes superiores estudiados, se ha formado en un 80 % en las primeras 48 h, siendo del 100 % a las 72 h. Por su parte, el isobutanol, con un 13 % del global, tiene una formación más lenta, siendo en las primeras 48 h del 56 % y del 76 % a las 72 h, siguiendo su incremento hasta terminar la fermentación. En el caso del isoamílico, 80 % de los alcoholes estudiados, su evolución es progresiva durante el proceso, siendo de destacar que a las 48 h ya se ha formado el 36 %

Tabla 3. Contenido y evolución en alcoholes superiores durante la fermentación alcohólica de mostos de Jerez por *S. cerevisiae* estudiados en sus destilados. Las cifras expresan mg/l

Alcoholes	0 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
	cL(*)	cL(**)	cL	sL	cL	sL	cL	sL	cL	sL
n-propanol	0	0	16	15	20	19	20	20	20	20
Isobutanol	0	0	19	18	26	25	31	30	34	34
2-metilbutanol-1	0	0	14	13	32	30	42	40	45	45
3-metilbutanol-1	2,4	0	64	61	129	118	158	152	167	166
Total	2,4	0	113	107	207	192	251	242	266	265
Alcohol etílico, porcentaje	0	0	4,1	4	7,4	7,2	9,8	9,9	11	10,9

(*) cL, destilado del vino, con levadura. (**) sL, destilado del vino, sin levadura.

y a las 72 h un 75 % del total. Una vez terminado el proceso, en análisis realizados a 30 d y 60 d, no se observa evolución de estos componentes, lo que supone una prueba adicional de que su producción viene controlada por las levaduras que intervienen durante la fermentación.

En la *tabla 4*, se recoge la evolución de los ésteres etílicos durante

ato, caprato y caprilato, siendo la concentración de laurato de etilo del 56 %; no obstante, lo más destacable es que estos componentes están presentes en mayor proporción en los destilados donde las levaduras permanecieron durante la destilación; tenemos, por ejemplo, 11,7 mg/l a las 96 h, máxima producción de estos componentes. Cuando los destilados se realizan

Tabla 4. Formación y evolución de los ésteres etílicos durante la fermentación alcohólica de mostos de Jerez por S. cerevisiae estudiados en sus destilados. Las cifras expresan mg/l

Esteres etílicos	0 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
	cL(*)	sL(**)	cL	sL	cL	sL	cL	sL	cL	sL
Caproato de etilo	0	0	0,7	0,2	1,6	0,8	1,7	1,1	1,7	1,1
Caprilato de etilo	0	0	0,7	0,2	2,2	0,7	2,9	1,1	2,5	1,1
Caprato de etilo	0	0	1	0,1	3,1	0,2	4,4	0,6	3,6	0,7
Laurato de etilo	0	0	0,6	0,1	1,5	0,3	2,7	0,2	2,1	0,4
Total	0	0	3,0	0,6	8,4	2,0	11,7	3,0	9,9	3,3

(*) cL, destilado del vino, con levadura. (**) sL, destilado del vino, sin levadura.

Tabla 5. Contenido en alcoholes superiores de mostos fermentados por S. cerevisiae. Influencia de la aireación (80 ml.min/l de mosto) en estos componentes. Las cifras expresan mg/l

Alcoholes superiores	No aireación			Aireación		
	cL(*)	sL(**)	Levadura(***)	cL	sL	Levadura
Propanol	40	39	t	28	27	t
Isobutanol	26	24	1	83	81	2
2-metilbutanol-1	25	25	2	58	57	2
3-metilbutanol-1	110	104	3	241	231	7
Total	201	192	6	410	396	11

(*) cL, destilado del vino, con levadura. (**) sL, destilado del vino, sin levadura. (***) Suspensión de *S. cerevisiae* en solución hidroalcohólica al 12,2 %.

la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*, comprobándose que es más rápida en el caproato de etilo —41 % a las 48 h— frente al 23 % de media de los otros tres ésteres estudiados, en igual periodo de tiempo. A las 72 h de fermentación se aprecia una presencia superior al 70 % como valor medio en capro-

separando previamente las levaduras por filtración, membranas de 0,45 μ , a las 96 h sólo aparecen 3 mg/l de los ésteres etílicos estudiados. Resultados que parecen confirmar la hipótesis mantenida por Norström (5) del papel almacenador de las levaduras para estos componentes.

En la *tabla 5* se recoge el contenido en alcoholes superiores de mostos fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* y la influencia que tiene la aireación, durante la fermentación, en la formación de estos componentes secundarios. La incorporación de aire hace incrementar el contenido final de los alcoholes superiores en un 100 %, si bien no ejerce un efecto uniforme en todos ellos, pues mientras el propanol disminuye en un 50 % como consecuencia de esta aireación, el isobutanol se incrementa en más del 200 % —pasa de 25 mg/l a 82 mg/l— y el isoamílico se duplica.

Las levaduras, que se habían separado por filtración de los mostos fermentados y destilados sin levaduras, fueron suspendidas en solución hidroalcohólica, al 12,2 % de alcohol, y posteriormente destiladas, no detectándose cantidades apreciables de alcoholes superiores, pues representan cifras porcentuales muy bajas.

En la *tabla 6* se expresa el contenido en ésteres etílicos al final de la fermentación, cuando se realizan las destilaciones con y sin las levaduras que habían intervenido en el

proceso. Independientemente de la aireación, siempre el contenido total de los ésteres etílicos estudiados fue superior en los destilados con levaduras —3,2 mg/l y 3,4 mg/l— que en los realizados sin levaduras —1,2 mg/l y 0,8 mg/l.

Las suspensiones de *Saccharomyces cerevisiae* que intervienen en el proceso, separadas por filtración y resuspendidas en solución hidroalcohólica para su destilación, dan valores globales importantes, 1,1 mg/l y 2,4 mg/l.

CONCLUSIONES

Durante la fermentación de mostos de Jerez, los alcoholes superiores presentan distintas velocidades de formación, comprobándose que una adecuada aireación puede duplicar el contenido global de ellos. Los ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media se producen linealmente en el transcurso de la fermentación, sin que se haya demostrado que la aireación ejerza un papel definido en el contenido final de estos componentes.

Tabla 6. Contenido en ésteres etílicos de cadena media de mostos fermentados por S. cerevisiae. Influencia de la aireación (80 ml.min/l de mosto) en estos componentes. Las cifras expresan mg/l

Esteres etílicos	No aireación			Aireación		
	cL(*)	sL(**)	Levadura(***)	cL	sL	Levadura
Caproato de etilo	0,6	0,4	0,0	0,4	0,3	0,1
Caprilato de etilo	1,0	0,6	0,1	0,7	0,1	0,3
Caprato de etilo	1,4	0,2	0,8	1,5	0,1	1,5
Laurato de etilo	0,2	0,0	0,2	0,8	0,3	0,5
Total	3,2	1,2	1,1	3,4	0,8	2,4

(*) cL, destilado del vino, con levadura. (**) sL, destilado del vino, sin levadura. (***) Suspensión de *S. cerevisiae* en solución hidroalcohólica al 12,2 %.

Las levaduras que han desarrollado el proceso fermentativo y se mantienen en el vino durante la destilación, aportan un aumento importante en el contenido de los ésteres estudiados y no influyen en la concentración final de alcoholes superiores. Las mezclas hidroalcohólicas de estas levaduras, separadas de los mostos fermentados, y posteriormente destiladas, confirman la presencia de altos contenidos de ésteres etílicos en el interior de las células y la escasa o nula retención de alcoholes superiores.

Por último se pone de manifiesto la capacidad de formación de componentes aromáticos, cuando realiza la fermentación el *Saccharomyces bayanus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALVAREZ-BATISTA, M. A., y GARCÍA-MAIQUEZ, E. 1981. Estudio gas-cromatográfico de componentes secundarios en la fermentación alcohólica. VIII Congr. Nac. Microbiol. Madrid, 295.
2. BERTRAND, A., et SOUFLEROS, E. 1980. Incidence de l'action conjuguée de la température de fermentation et de l'acidité du milieu sur les teneurs en substances volatiles formées par les levures. *Connaiss. Vigne Vin*, 14 97-109.
3. GARCÍA-MAIQUEZ, E. 1974. Aislamiento y clasificación de levaduras en mostos de Jerez. Tesina. Universidad de Sevilla.
4. GUYMON, J. F.; INGRAHAM, J. L., and CROWELL, E. A. 1961. Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. *Amer. J. Enol. Viticul.*, 12, 2, 60-6.
5. NORDSTROM, K. 1966. Formation of esters from lower fatty acids by various yeasts species. *J. Inst. Brew. London*, 72, 38-40.
6. NYKÄNEN, L., and NYKÄNEN, I. 1977. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. Inst. Brew. London*, 83, 30-31.
7. NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I., and SOUMALAINEN, H. 1977. Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *J. Inst. Brew. London*, 83, 32-4.
8. PEYNAUD, E., et GIMBERTEAU, G. 1962. Sur la formation des alcools de vinification. *Ann. Technol. Agr.*, 11, 85-105.
9. SOUMALAINEN, H., and LEHTONEN, M. 1979. The production of aroma compounds by yeasts. *J. Inst. Brew. London*, 85, 149-56.
10. THOUKIS, G. 1958. The mechanism of isoamyl alcohol formation using tracer techniques. *Amer. J. Enol.*, 9, 161-67.

ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA EN EL GENERO *MYXOCOCCUS*

C. RUIZ, G. ALVAREZ DE CIENFUEGOS, A. RAMOS-CORMENZANA y A. RUIZ-BRAVO
Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de
Granada

(Aceptado: 24 de febrero de 1984)

RESUMEN

Se ha utilizado la respuesta de esplenocitos formadores de anticuerpos específicos de hematíes de carnero (SHC) en el ratón, para investigar la actividad inmunomoduladora de cuatro cepas pertenecientes a las especies *Myxococcus coralloides*, *M. fulvus*, *M. virescens* y *M. xanthus*. De cada cepa se probaron las siguientes preparaciones: células vegetativas, mixosporas inducidas y sobrenadantes de cultivo. En todos los casos, el intervalo de tiempo entre el tratamiento inmunomodulador y la inmunización con SHC ejerció una influencia decisiva sobre el sentido de la inmunomodulación. La preparación de mixosporas de *M. xanthus* fue la más activa de las ensayadas, tanto en la supresión como en la potenciación de la respuesta.

SUMMARY

The antibody-forming cells (AFC) response to sheep red blood cells (SRBC) in mice was used to investigate the immunomodulation activity of four strains belonging to the species *Myxococcus coralloides*, *M. fulvus*, *M. virescens* and *M. xanthus*. The following preparations were tested: vegetative cells, induced myxospores, and culture supernatants. Immunomodulation properties were detected in all the studied strains. The interval of time between treatment and immunization with SRBC influenced decisively the sense of the immunomodulation.

Myxococcus xanthus myxospores preparation was the more active in both suppression and potentiation of AFC response.

INTRODUCCIÓN

Entre los inmunomoduladores de tipo bacteriano, las bacterias gram-negativas ocupan un lugar destacado; esta actividad inmunomoduladora manifestada por las bacterias es atribuible, en algunos casos, a componentes intracelulares o metabolitos excretados al medio externo, pero generalmente las fracciones activas son componentes de la pared celular, como el muramildipeptido y principalmente el lipopolisacárido (LPS) (18).

La pared celular de las mixobacterias contiene LPS y pequeñas proporciones de mucopéptido (22). Estas bacterias, además, se caracterizan por producir una gran variedad de enzimas, principalmente extracelulares (9-10, 15-16), y poseer un ciclo de vida complejo con dos opciones: formar cuerpos fructificantes o crecer vegetativamente (7).

En este trabajo se determinan las propiedades inmunomoduladoras, sobre la respuesta humoral, de cuatro especies del género *Myxococcus*: *M. coralloides*, *M. fulvus*, *M. virescens* y *M. xanthus*; investigándose tres preparaciones de cada una de ellas (células vegetativas, mixosporas y sobrenadantes de cultivo), y siguiendo tres pautas distintas de inoculación respecto del antígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se han utilizado cuatro especies pertenecientes al género *Myxococ-*

cus: *M. coralloides*, *M. fulvus*, *M. virescens* y *M. xanthus*, aisladas en nuestro laboratorio a partir de muestras de suelo de la provincia de Granada, e identificadas según el Manual de Bergey (13).

Los microorganismos fueron mantenidos mediante siembras periódicas de una semana en medio CT-agar (6).

Animales de experimentación

Se han usado ratones Balb/c, machos, de edades comprendidas entre 6-8 semanas, procedentes de parejas criadas en nuestro laboratorio.

Obtención de las preparaciones bacterianas

Las células vegetativas y los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron a partir de cultivos en medio CT-agar (6). Cuando los cultivos alcanzaron una concentración del orden de 10^8 bacterias/ml, se centrifugaron a 5.000 r/min, durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,22 μ m de poro. El sedimento se lavó dos veces con solución salina de centrifugación, en iguales condiciones que las anteriores. El sedimento final se suspendió en solución salina, a una concentración final de 10^8 células vegetativas/ml.

Las mixosporas se obtuvieron por inducción siguiendo la técnica descrita por Dworkin y Gibson (8) para las cepas que presentaron crecimiento disperso en los medios líquidos (*Myxococcus coralloides* y *M. xanthus*), y la técnica de

Burchard (2) para las que no presentaron crecimiento disperso en medio líquido (*M. fulvus* y *M. virescens*). Después de observar las mixosporas en el seno del cultivo, se centrifugó a 5.000 r/min, durante 15 min. El sedimento se lavó dos veces y se suspendió en solución salina, hasta obtener una suspensión del orden de 10^8 mixosporas/ml.

Medida de la respuesta humoral: cuantificación de células esplénicas formadoras de placas hemolíticas (CFP)

Inmunización. Los animales fueron inmunizados con una inyección única, por vía intraperitoneal, de 0,5 ml de una suspensión de hematíes de carnero al 10%, en solución salina.

Tratamiento con las preparaciones bacterianas. Los animales tratados recibieron por vía intraperitoneal 0,2 ml de sobrenadantes de cultivo o bien de una suspensión que contenía del orden de 10^8 células/ml de mixosporas inducidas o de células vegetativas, en solución salina. Cuando se investigó la actividad de los sobrenadantes de cultivo, los animales fueron inyectados con 0,2 ml de medio C-agar; en los otros casos los testigos recibieron 0,2 ml de solución salina.

Ensayo de cuantificación de CFP. Se realizó a los cuatro días de la inmunización, siguiendo la técnica de hemólisis localizada en medio líquido, descrita por Cunningham y Szenberg (4).

Estadística

Para el análisis de los resultados se utilizó el test de Student.

RESULTADOS

Las tres preparaciones ensayadas como inmunomoduladoras se inocularon dos días antes de la inmunización con SHC (día -2), simultáneamente (día 0) y dos días después de dicha inmunización (día +2). El comportamiento de cada cepa se muestra en las figuras 1-4. En las tres pautas de inoculación se han evidenciado actividades inmunosupresoras e inmunopotenciadoras. En general, los tratamientos efectuados simultáneamente con la inmunización resultaron poco efectivos. Del mismo modo, los sobrenadantes de cultivo fueron las preparaciones menos activas, ya que sólo cuando se inocularon dos días antes de la inmunización, resultaron supresores los obtenidos de *Myxococcus fulvus* y *M. xanthus*, y potenciador el de *M. virescens*. Las preparaciones de mixosporas mostraron un comportamiento más uniforme en las cuatro cepas estudiadas: inoculadas antes o al mismo tiempo que el antígeno, fueron supresoras o indiferentes, y sólo cuando se inocularon después resultaron inmunopotenciadoras, excepto en el caso de *M. virescens*. Las células vegetativas y los sobrenadantes de cultivo tuvieron comportamientos dispares, tanto al comparar las distintas especies como al compararlas entre sí dentro de cada especie. La preparación más activa de las probadas fue la de mixosporas de *M. xanthus*, que mostró los mayores porcentajes de supresión y de inmunopotenciación registrados, exhibiendo una decisiva dependencia del intervalo de tiempo de administración respecto al testigo.

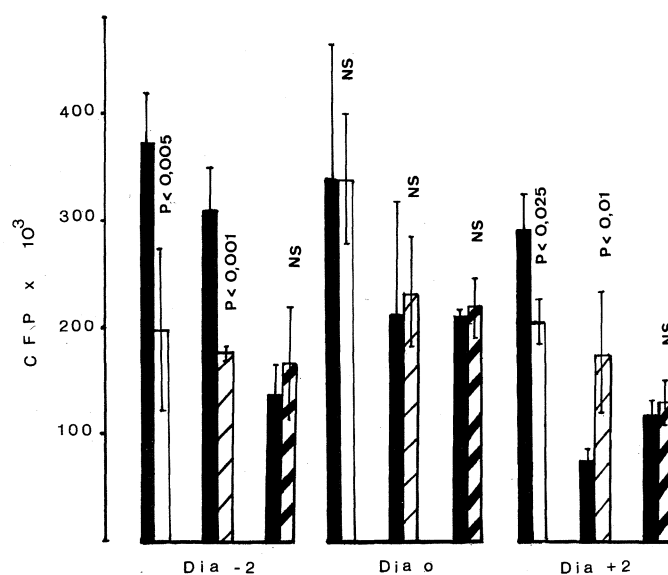


Figura 1. Efecto de *M. coralloides* sobre la respuesta esplénica de CFP en ratones inmunizados el día 0 con hematies de carnero. Barras negras, testigos; barras blancas, tratamiento con células vegetativas; rayas finas, tratamiento con mixosporas; rayas gruesas, tratamiento con sobrenadantes de cultivo; NS, diferencias no significativas

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos evidencian por primera vez la presencia de actividad inmunomoduladora en mixosporas y en formas vegetativas de mixobacterias. Anteriormente, Shiigi y cols. (19) han descrito propiedades coadyuvantes sobre la respuesta humoral en sobrenadantes de cultivo de bacterias deslizantes, aisladas como contaminantes de suero fetal de ternera. Justamente los sobrenadantes estudiados por nosotros mostraron escasa actividad y sólo en un caso hubo una ligera inmunopotenciación (*Myxococcus virescens*). Sin embargo, debe considerarse que en el trabajo citado, las

bacterias no fueron identificadas; por otra parte, se probaron sobrenadantes de cultivos viejos, en los que con muchas posibilidades existirían fracciones solubles procedentes de la lisis celular, intensa característica de las mixobacterias en fase estacionaria (1). Estas circunstancias dificultan la comparación de los resultados del mencionado trabajo con los aquí presentados, ya que las fracciones presentes en sobrenadantes de cultivos jóvenes consisten esencialmente en enzimas extracelulares (9-10, 16). En este sentido, cabría esperar posible actividad inmunomoduladora en los sobrenadantes examinados por nosotros, como se ha descrito para algunas exoenzi-

mas de bacterias gram-negativas (10-11). Nuestros resultados muestran que éste no es el caso de las cepas incluídas en este estudio.

La importancia del intervalo temporal entre el tratamiento con un agente inmunomodulador y la administración del antígeno es un hecho bien conocido. En algunos casos, la dependencia temporal lleva a comportamientos que son típicos para determinadas sustancias, como ocurre con el LPS, que es capaz de deprimir la respuesta humoral cuando se administra antes o después que el antígeno, pero que actúa como inmunopotenciador cuando la administración de ambos ocurre el mismo día (3, 5, 14). En nuestro caso, solamente las células vegetativas de *Myxo-*

coccus coralloides tuvieron un comportamiento evocador del LPS, lo que puede significar escasa importancia de esta estructura en la actividad inmunomoduladora de las mixobacterias; ello coincidiría con lo observado por Shiigi y cols. (19) en sus estudios con sobrenadantes de cultivo de bacterias deslizantes. El comportamiento de las mixosporas, que está muy alejado del descrito para el LPS, concuerda con la aparente ausencia de esta fracción en ellas (20). En cambio, existe gran semejanza entre la inmunomodulación mostrada por las mixosporas y la descrita, en tres pautas temporales casi idénticas, para las esporas de *Bacillus megaterium* por Ruiz-Bravo y cols. (17). Aunque pueda

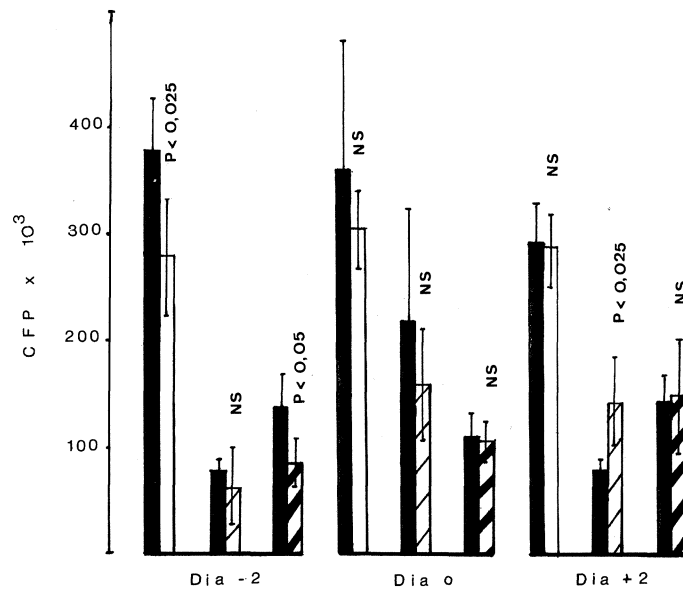


Figura 2. Efecto de *M. fulvus* sobre la respuesta esplénica de CFP en ratones inmunizados el día 0 con hematies de carnero. Barras negras, testigos; barras blancas, tratamiento con células vegetativas; rayas finas, tratamiento con mixosporas; rayas gruesas, tratamiento con sobrenadantes de cultivo; NS, diferencias no significativas

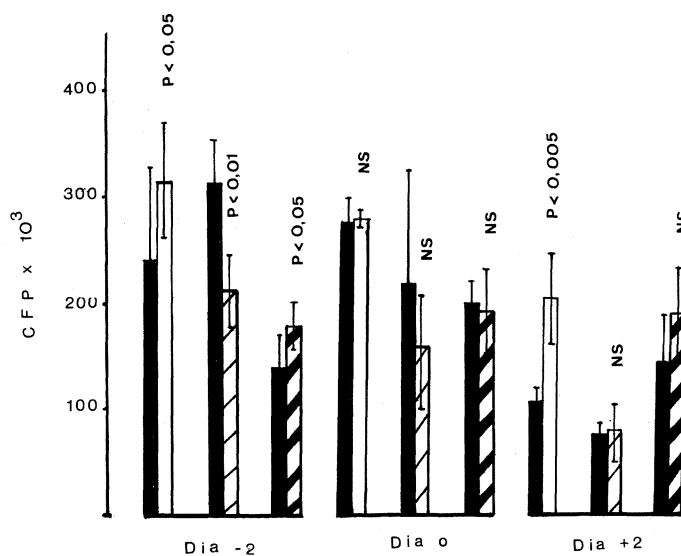


Figura 3. Efecto de *M. virescens* sobre la respuesta esplénica de CFP en ratones inmunizados el día 0 con hematies de carnero. Barras negras, testigos; barras blancas, tratamiento con células vegetativas; rayas finas, tratamiento con mixosporas; rayas gruesas, tratamiento con sobrenadantes de cultivo; NS, diferencias no significativas

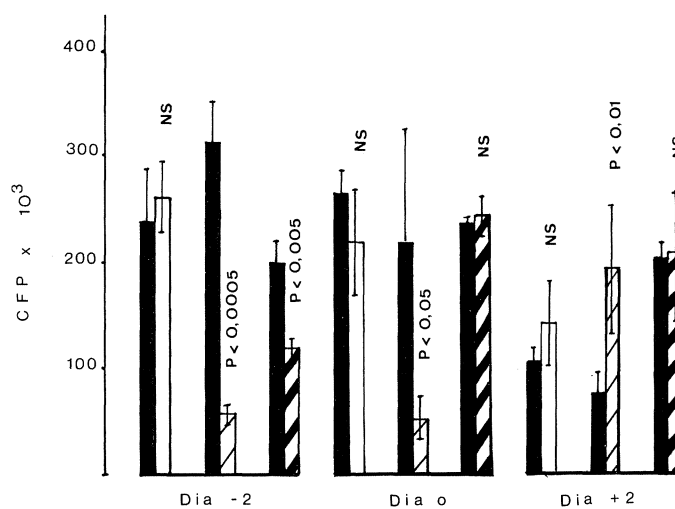


Figura 4. Efecto de *M. xanthus* sobre la respuesta esplénica de CFP en ratones inmunizados el día 0 con hematies de carnero. Barras negras, testigos; barras blancas, tratamiento con células vegetativas; rayas finas, tratamiento con mixosporas; rayas gruesas, tratamiento con sobrenadantes de cultivo; NS, diferencias no significativas

parecer aventurado establecer relaciones entre bacterias tan alejadas taxonómicamente, no debe descartarse la posible existencia de fracciones activas similares en ambas formas de resistencia. En apoyo de este supuesto, cabe recordar las interesantes analogías metabólicas existentes entre las mixosporas y las esporas del género *Bacillus* (21).

BIBLIOGRAFÍA

1. ARIAS, J. M., and MONTOYA, E. 1977. Dispersed growth and cell-lysis in *Myxococcus coralloides*. Microbios Lett., 5, 81-84.
2. BURCHARD, R. P. 1975. Myxospore induction in a nondispersed growing mutant of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 122, 302-6.
3. COVERT, J. B., and ZARKOWER, A. 1971. Influence of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on histamine-forming capacity and antibody formation in lymphoid tissues. Infect. Immunity, 4, 452-55.
4. CUNNINGHAM, A. J., and SZENBERG, A. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. Immunology, 14, 599.
5. DIAMANTEIN, T.; KEPPLER, W.; BLITSTEIN-WILLIGER, E., and BENAFAIN, S. 1976. Suppression of the primary immune response *in vivo* to sheep red blood cells by B cells mitogens. Immunology, 30, 401-7.
6. DWORKIN, M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 84, 250-57.
7. DWORKIN, M. 1966. Biology of the myxobacteria. Annu. Rev. Microbiol., 20, 75-106.
8. DWORKIN, M., and GIBSON, S. 1964. A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of myxocysts in *Myxococcus xanthus*. Science, 146, 243-44.
9. GNOSSPELIUS, G. 1978. Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. J. Bacteriol., 133, 17-25.
10. HAN, I. 1973. Enhancement of *in vitro* lymphocytes response by neuraminidase. Clin. Exp. Immunol., 13, 165-70.
11. HAN, I. 1974. Enhancement of delayed skin hypersensitivity by neuraminidase in cancer patients. Clin. Exp. Immunol., 18, 95-100.
12. HART, B. A., and ZAHLE, S. A. 1966. Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 92, 1632-37.
13. MCCURDY, H. D. 1974. The fruiting myxobacteria. En: R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS (eds.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8.^a Edición. 76-98. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
14. NAKANO, M.; TANABE, M. J.; SAITO, T., and SHIMIZU, T. 1976. Immunosuppressive effect of bacterial lipopolysaccharide on antibody response. Jap. J. Microbiol., 20, 53-8.
15. 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.
16. RUIZ, C.; RODRÍGUEZ, C.; SÁNCHEZ, J. J., and RAMOS-CORMENZANA, A. 1983. A study of the esterase and lipase activities of two strain of *Myxococcus xanthus*. Microbios Lett., 23, 107-14.
17. RUIZ-BRAVO, A.; KOUWATLE, K.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G., and RAMOS-CORMENZANA, A. 1981. Immunomodulation in mice by *Bacillus megaterium* and its dependence on culture conditions. Immunol. Lett., 3, 39-43.
18. SCHWAB, J. H. 1977. Modulation of the immune response by bacteria. En: D. SCHLESSINGER (ed.). Mycrobiology-1977. 366-73. American Society for Microbiology, Washington.
19. SHIGI, S. M.; CAPWELL, R.; GRABSTEIN, K. H., and MISHALL, R. I. 1977. Sera and the *in vitro* induction of immune responses. III. Adjuvant obtained from gliding bacteria with properties distinct from enteric bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol., 119, 679-84.

-
20. SUTHERLAND, I. W. 1976. Novel surface polymer changes in development of *Myxococcus* spp. Nature London, 259, 46-7.
21. WHITE, D. 1975. Myxospores of *Myxococcus xanthus*. En: P. GERHARDT, R. N. COSTILOW and H. L. SADOFF (eds.). Spores VI, 44-9. American Society for Microbiology, Washington.
22. WHITE, D.; DWORKIN, M., and TIPPÉR, D. J. 1968. Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus* structure and relation to morphogenesis. J. Bacteriol., 95, 2186-97.

EFFECT OF ORAL BACTERIA ON THE *IN VITRO* GROWTH OF *MYCOPLASMA ORALE*

C. MARTIN-BOURGON, J. A. SAEZ and J. CASAL

Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e
Inmunología Sanitarias, Majadahonda (Madrid)

(Aceptado: 11 de julio de 1984)

SUMMARY

Bacterial growth obtained by inoculating pharyngeal swab samples from healthy persons on mycoplasma agar without antibiotics, was overlaid with cultures of different strains of *Mycoplasma orale* isolated from the same persons. After incubation, three kinds of reaction were observed: stimulation of growth of *M. orale* by some bacteria, inhibition by others or no effect. Stimulation occurred with *Staphylococcus* and *Neisseria*, while some species of *Streptococcus* were inhibitory. Other species of *Neisseria* and *Staphylococcus* had no effect. Inhibition depended upon the relative concentration of the two organisms while stimulation was only influenced by the concentration of bacteria.

RESUMEN

Se estudia la interacción *in vitro* del crecimiento de cepas de *Mycoplasma orale* y bacterias de la flora orofaríngea. Los microorganismos empleados proceden de las mismas personas. Se observaron tres tipos de reacciones, estimulación del crecimiento de *M. orale* por parte de algunas cepas de los géneros *Staphylococcus* y *Neisseria*, inhibición del crecimiento producido por algunas especies de *Streptococcus*, y, por último, otras cepas de *Neisseria* y *Staphylococcus* no produjeron ningún efecto.

Se determinó que la inhibición es dependiente de la concentración relativa de bacterias y micoplasmas, mientras que la estimulación dependía únicamente de la cantidad de bacterias empleadas en el estudio, como se demostró en las pruebas de titulación cruzada.

INTRODUCTION

The concept of naturally occurring interactions between bacterial species of the normal flora has long been recognized. Antagonistic interactions have received the greatest attention (1, 5, 11-13), but there are few descriptions of the stimulation of growth of one organism by another (12).

Interactions between different species of *Mycoplasma* (15) and between mycoplasmas and viruses (9-10) have also been described, but to our knowledge there is little information about possible interactions between bacteria and mycoplasmas (6).

This report describes the interactions between bacteria and mycoplasmas from the human pharynx studied by a modification of the methods used by Crowe *et al.* (5) and Rosebury *et al.* (12), to demonstrate interactions between bacterial species.

MATERIALS AND METHODS

Media

Mycoplasma media was prepared following the method of Chanock *et al.* (3) modified by Taylor-Robinson *et al.* (17), but thallium acetate and penicillin were not added. Semisolid agar was prepared with the same constituents as the mycoplasma media, except that the concentration of agar was lowered to 0.5% v/v. Blood agar plates were prepared with Mueller Hinton medium (Difco) and 5% v/v sheep blood.

Mycoplasma isolates

Mycoplasmas were isolated from fresh pharyngeal swabs from healthy persons. Swabs were placed in mycoplasma broth and homogenized in a mixer. Aliquots of this broth were inoculated into mycoplasma agar plates and incubated at 37 °C in 5% v/v CO₂ in air. Isolates were cloned and identified by the growth inhibition method (2) employing hyperimmune sera (Microbiological Associates).

Nine *Mycoplasma orale* isolates were stored frozen and titrated as described previously Taylor-Robinson and Cherry (16), such that known concentrations of each isolate could be used in each experiment.

Bacterial isolates

Fresh swab samples from the same subjects were used in all cases. Mycoplasma agar plates were used for growing bacteria to be overlaid with mycoplasmas and blood agar plates were used for isolation of pure cultures of bacteria. Bacterial strains were identified according to standard methods (4, 8).

A total of 36 random isolates were used in the overlay technique and 13 of these were tested by cross titration. Stocks of the bacterial isolates were prepared by suspending the overnight growth from one plate in 5 ml Skim Milk (Difco) and dispensing it in 0.2 ml aliquots that were stored frozen at -70 °C. The concentration of bacteria was determined by thawing one of such aliquots and counting

the colony forming units (CFU) of serial tenfold dilutions.

Overlay technique

A modification of the method described by Crowe *et al.* (5) was used. Nine mycoplasma plates were seeded with the pharyngeal swab sample of one subject in such a way as to obtain isolated colonies and leaving a zone without seeding as a control. After incubation at 37 °C for 24 h in 5 % v/v CO₂ in air, an overlay was added to each plate containing 10⁴ CFU/ml of one of the mycoplasma isolates included in semisolid agar. Plates were incubated 48 h and examined under de microscope at low magnification. Pure cultures of 36 bacterial isolates were also tested by the same method.

Cross titration of bacteria and mycoplasma isolates

This was performed according to the method described by Rosebury *et al.* (12). Sixteen pairs of drops (0.02 ml) were placed on one mycoplasma plate as a cross titration of four tenfold dilutions of both organisms. Dilutions of bacteria containing 10⁶ to 10³ CFU/ml were first inoculated arranging the drops in four columns decreasing in concentration from left to right. These drops were dried at room temperature and the dilutions of mycoplasma from 10⁷ to 10⁴ CFU/ml were dropped in four rows decreasing in concentration from top to bottom and overlapping those of the first series (figu-

res 1-2). Plates were incubated in the same conditions as before.

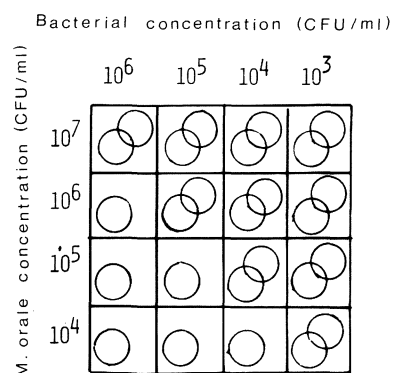


Figure 1. Representative pattern of inhibition of *M. orale* by one streptococcal isolate on cross titration plates. The grid represents one plate in which bacterial dilutions containing 10⁶ to 10³ colony forming units/ml were dropped in columns from left to right and mycoplasma dilutions from 10⁷ to 10⁴ in rows from top to bottom. Each circle in the left bottom part of the squares represents bacterial growth and those in the right upper part, mycoplasma growth

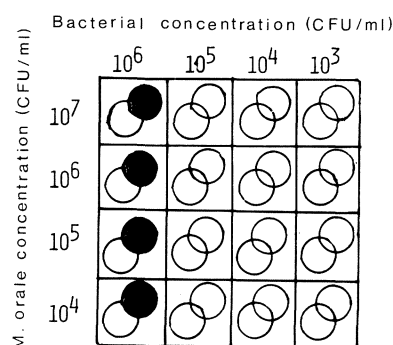


Figure 2. Representative pattern of stimulation displayed on *M. orale* by some staphylococcal and *Neisseria* isolates on cross titration plates (for explanation of method see figure 4). Black circles represent Mycoplasma drops in which stimulation of growth occurred

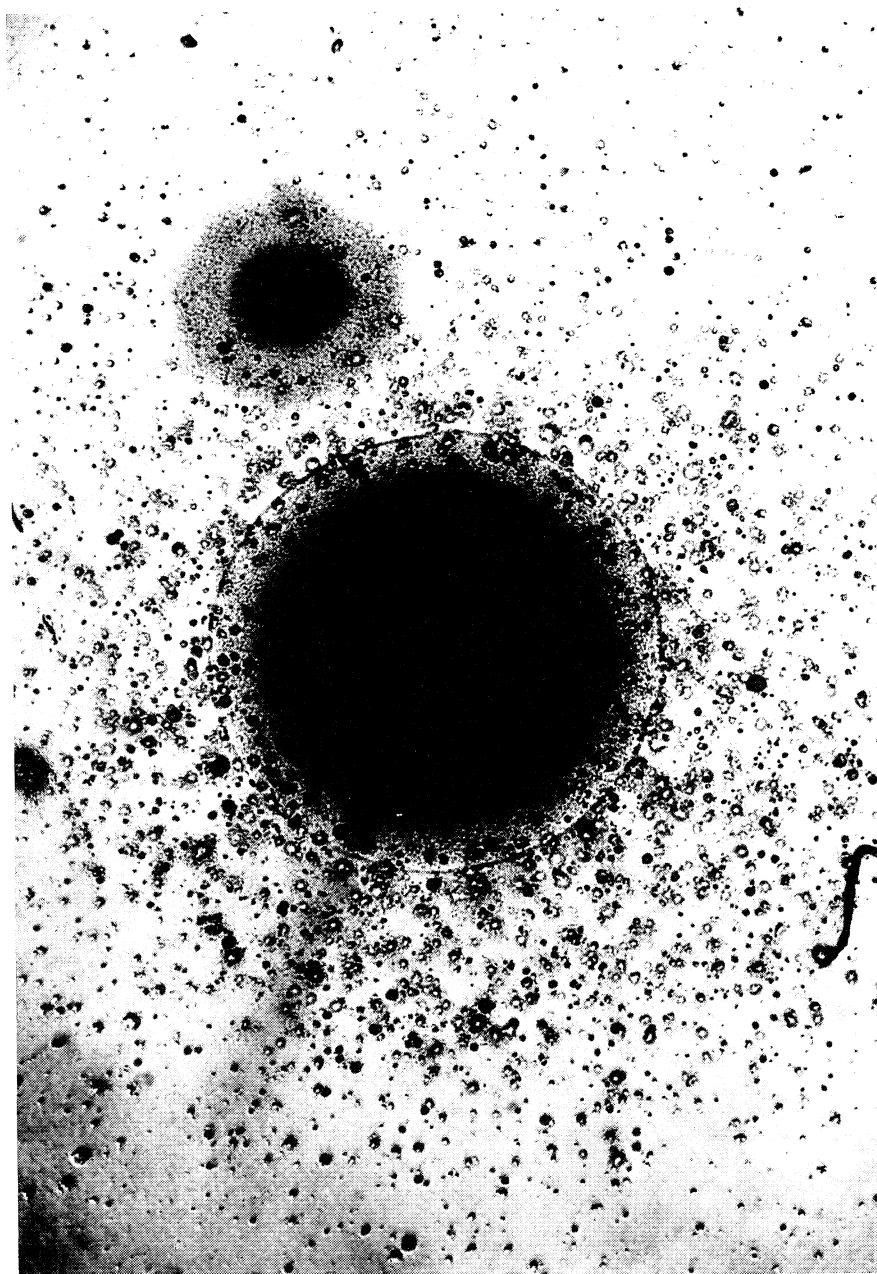


Figure 3. Colony of *Sta. epidermidis* stimulating the growth of the small *M. orale* colonies in the overlay. (10^4 colony forming units of *M. orale* included into 1 ml semisolid agar were added over colonies of *Sta. epidermidis* grown on mycoplasma medium) $\times 250$

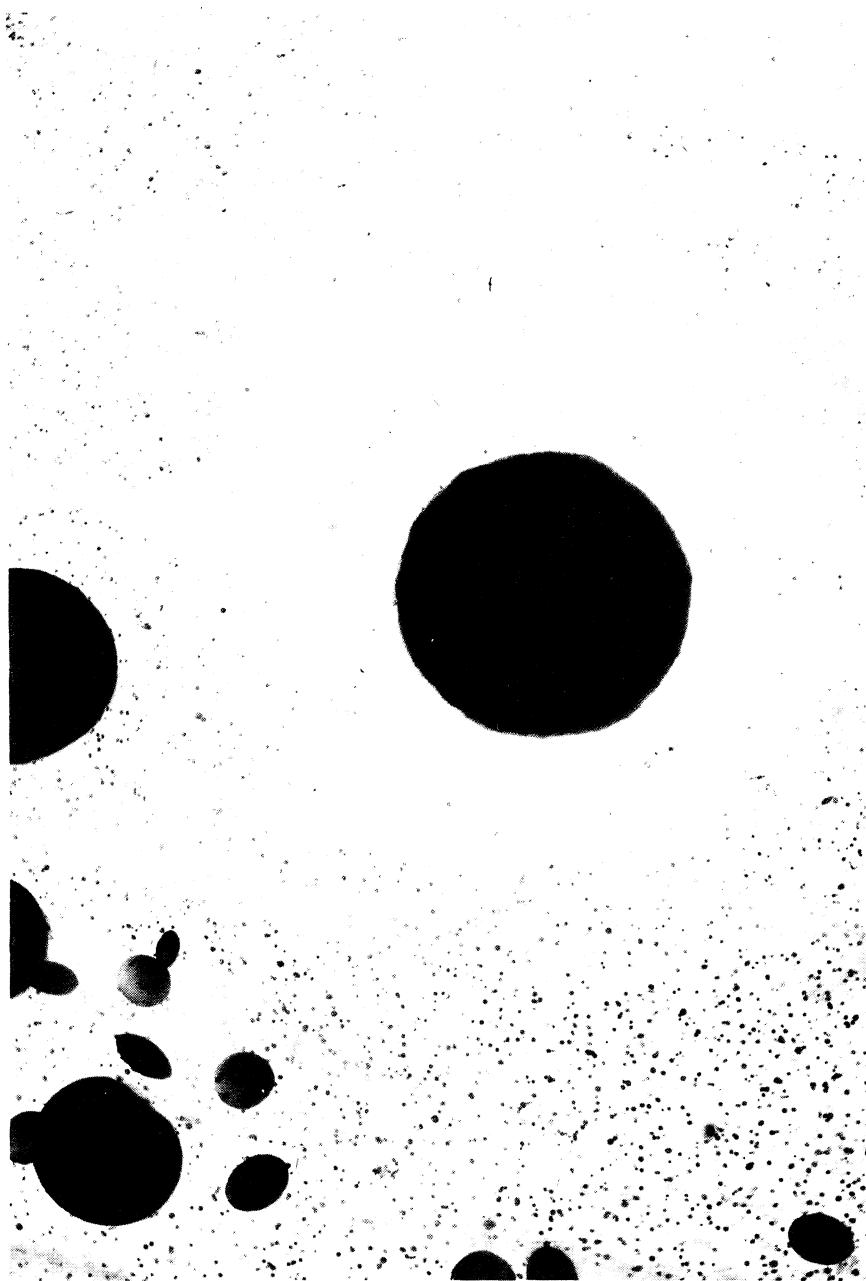


Figure 4. Colony of Str. mitis producing inhibition of growth of M. orale (for explanation of method see figure 1) $\times 190$

RESULTS AND DISCUSSION

Three kinds of reactions were observed with the overlay technique. Some of the bacterial colonies stimulated the growth of the mycoplasma colonies in the overlay (figure 3), others induced

Cross titration of 13 selected bacterial isolates against nine *Mycoplasma orale* isolates confirmed the effects described above and were dependant upon concentration of the two organisms. According to Rosebury *et al.* (12) when the slope of the cross titration

Table 1. Effect of 36 bacterial isolates on the growth of nine *M. orale* isolates by overlay technique

Bacteria	Number	Number of bacteria producing(*)		
		Stimulation	Inhibition	No effect
<i>Streptococcus salivarius</i>	5	1	5	
<i>Str. mitis</i>	4		4	
<i>Str. sanguis I</i>	3		3	
<i>Str. sanguis II</i>	2	1	2	
<i>Str. pneumoniae</i>	3	1	1	3
<i>Branhamella catarrhalis</i>	3	3		3
<i>Neisseria mucosa</i>	2	2		2
<i>N. subflava</i>	2	2		2
<i>N. lactamica</i>	2	2	1	2
<i>N. meningitidis</i>	1	1		1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	5		2
<i>Sta. aureus</i>	1			1
<i>Corynebacterium</i> sp.	3	2		3

(*) Number of bacterial species producing effect on one more of the nine mycoplasma isolates, including species producing different effects when tested against different mycoplasma isolates.

inhibition of growth of mycoplasmas (figure 4), while others had no effect on growth (figure 5).

Thirty six pure cultures of bacteria were tested by the same technique. The results obtained (table 1) demonstrated that stimulation was the most frequent effect and was induced by various species of bacteria (neisserias, staphylococci, corynebacterias, pneumococci). Inhibition was commonly associated with the genus *Streptococcus* and occurred only rarely with other bacteria. Absence of any effect was found mainly with *Neisseria* and *Staphylococcus*.

grid, as estimated from the limiting pattern of inhibition or stimulation, presents a vertical limiting pattern ($= \infty$) only the effector concentration seems significant in the reaction, while finite slopes are interpreted as indicating that both species play an active part in the interaction. The slopes found in the cross titration grids demonstrated that for inhibitory effect (figure 4) the relative concentrations of the two organisms involved influence the reaction. However in stimulating effect (figure 5) only the concentration of the bacteria was important.

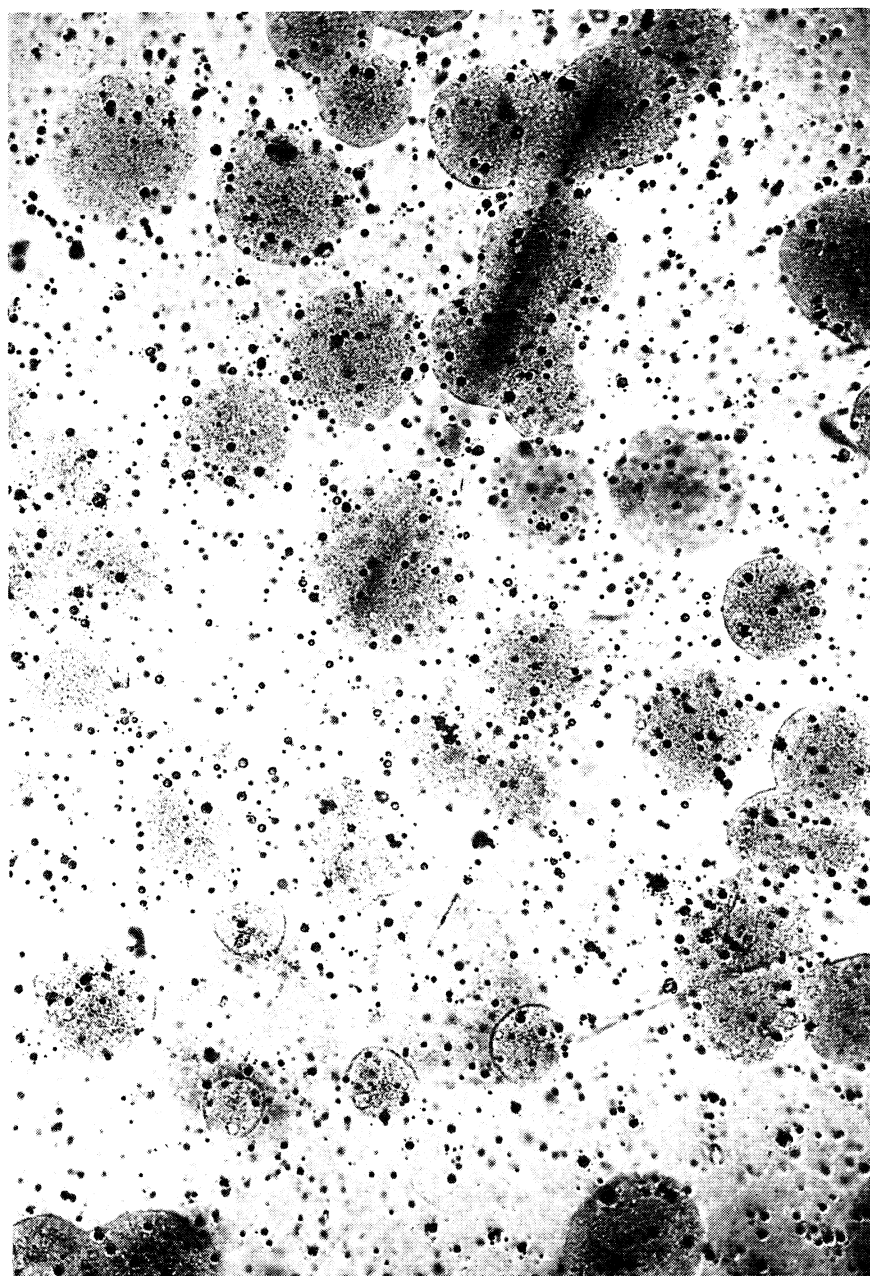


Figure 5. *N. mucosa* colonies that do not produce any interactive effect. Left upper part: control area without bacterial growth mycoplasma colonies appearing as small dark points (for explanation of method see figure 1) $\times 250$

No particular effect could be associated with a particular species since some bacteria species produced a different effect when tested against different mycoplasma isolates. There could be a considerable variation particularly with *Neisseria*, which usually did not induce an effect but nevertheless were responsible for several cases of stimulation and one of inhibition.

Stability of the normal flora appears to result from a balance of dynamic interactions amongst its constituents. Additive or synergistic interactions appear to be in equilibrium with antagonistic interactions (14). Mycoplasmas form part of the normal flora in man and seem to take part in this dynamic equilibrium. The *in vitro* results described in this paper show that they interact with bacteria.

The ability of streptococci to inhibit (12, 14) and staphylococci to stimulate (7) other bacteria is well known.

Our findings indicate that these two genera produce the same effects on mycoplasmas. These reactions depend upon the concentration of organisms, and could explain the coexistence of inhibitors and susceptible organisms *in vivo*. In an attempt to elucidate the causes of inhibition phenol red was included as a pH indicator. A reduction of pH was associated with some cases of inhibition but not others.

Similarly, extracts of one strain of *Neisseria* and two strains of *Staphylococcus* produced a slight stimulation of the growth of *Mycoplasma orale*. A more detailed study of the mechanisms of stimu-

lation or inhibition of growth is required.

REFERENCES

1. ALY, R., MAIBACH, H. I.; MANDEL, A., and STRAUSS, W. G. 1974. Bacterial interference among strains of *Staphylococcus aureus* in man. J. Infec. Dis., 129, 720-24.
2. CLYDE, W. A. 1964. Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immunol., 92, 958-65.
3. CHANOCK, R. M.; HAYFLICK, L., and BARTLE, M. F. 1962. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 48, 41-49.
4. COWAN, S. T., and STEEL, K. J. 1965. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.
5. CROWE, C. C.; SANDERS, W. E., and LONGLEY, S. 1973. Bacterial interference. II. Role of the normal flora in prevention of colonization by group A *Streptococcus*. J. Infec. Dis., 128, 527-32.
6. FAUR, Y. C.; WEISBURD, M. H., and WILSON, M. E. 1975. Morphologic observations of mycoplasmas and *Neisseria gonorrhoeae* in associated growth patterns. Amer. J. Clin. Pathol., 63, 106-16.
7. HALBERT, S. P.; SWICK, L., and SONN, C. 1953. Characteristics of antibiotic-producing strains of the ocular bacterial flora. J. Immunol., 70, 400-10.
8. LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J., and TRUANT, J. P. 1980. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington.
9. REED, S. 1971. The interaction of mycoplasma and influenza viruses in tracheal organ cultures. J. Infec. Dis., 124, 18-25.
10. REED, S. 1972. Interaction between mycoplasmas and respiratory viruses studied in tracheal organ cultures. Pathog. Mycoplasmas Ciba Found. Symp., 329-48.

11. RIBBLE, J. C. 1967. A mechanism of bacterial interference *in vitro*. J. Immunol., 98, 716-23.
12. ROSEBURY, T.; GALE, D., and TAYLOR, D. F. 1954. An approach to the study of interactive phenomena among microorganisms indigenous to man. J. Bacteriol., 67, 135-52.
13. SANDERS, E. 1969. Bacterial interference. I. Its occurrence among the respiratory tract flora and characterization of inhibition of group A streptococci by viridans streptococci. J. Infec. Dis., 120, 698-707.
14. SANDERS (jr.), W. J. 1975. Interactions between streptococci and other bacteria in the throat. Microbiology Washington D. C., 106-9.
15. TAYLOR-ROBINSON, D., and CHERRY, J. D. 1972. A non-pathogenic mycoplasma inhibiting the effect of a pathogenic mycoplasma in organ culture. J. Med. Microbiol., 5, 291-98.
16. TAYLOR-ROBINSON, D., and DINTER, Z. 1968. Unexpected serotypes of mycoplasmas isolated from pigs. J. Gen. Microbiol., 53, 221-29.
17. TAYLOR-ROBINSON, D.; SOMERSON, N. L.; TURNER, M. C., and CHANOCK, R. M. 1963. Serological relationship among human mycoplasmas as shown by complement fixation and gel diffusion. J. Bacteriol., 85, 1261-73.

LIBROS RECIBIDOS

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.
Volume 1. NOEL R. KRIEG and JOHN G. HOLT (Ed.) William &
Wilkins, Baltimore/London. 1984. XXVII + 946 pages. \$ 85.

Durante los últimos años se está asistiendo a un desarrollo de los principios taxonómicos, y la sistemática de algunos grupos de bacterias se encuentra en una fase de esperanzador desarrollo. La aplicación de técnicas específicas, como la taxonomía química y numérica, y particularmente el análisis de los ácidos nucleicos, ha revelado que muchos de los géneros que parecían bien definidos incluyen bacterias con propiedades y composición genética diferentes. Hechos como estos están cambiando rápidamente los esquemas de clasificación e identificación previamente establecidos, y parece vislumbrarse, afortunadamente, una clasificación más lógica de las bacterias basada en sus relaciones constitutivas. Un esquema general de la clasificación con estas características llevaría a conceptos más unificados de los grupos, a esquemas de identificación más seguros y a comprender mejor la evolución de las bacterias. En casos determinados, estudios genéticos ha resuelto situaciones confusas de cepas de una misma especie, y la homología del ADN se utiliza, cada vez más, para establecer nuevas especies y resolver problemas taxonómicos de las especies; pero aún no se ha conseguido ple-

namente un esquema general de este tipo, al disponerse sólo de una información fragmentaria e incompleta. Aunque estos principios taxonómicos parezcan ser más seguros y estables, lo cierto es que los esquemas basados en las relaciones genéticas son relativamente recientes y tendrán que comprobarse cuando se conozca mejor el impacto que los elementos transponibles puedan ejercer sobre la estabilidad del genoma de las células procarióticas. La clasificación de las bacterias probablemente nunca será definitiva, aunque existan predicciones, fundamentadas en su dinámica de desarrollo, según las cuales tendrán que pasar unos 150 años antes de su estabilización.

En esta transición de la taxonomía bacteriana, llega a nuestras manos el volumen 1 de una nueva versión, sistemática, del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, un clásico usado por todos nosotros, que viene sirviendo a la Bacteriología, como referencia internacional, a través de ocho ediciones de un sólo volumen. El nuevo título, que abarcará 4 volúmenes, motivo de este comentario, significa un cambio de un orden de magnitud muy superior a cuan-

tos habían acontecido hasta ahora en la revisión de las anteriores ediciones del Manual y este cambio lo refleja también la Corporación responsable de su edición con un cambio de denominación. Este proyecto, con acierto y autoridad, pretende reajustar la identidad de la taxonomía bacteriana al momento presente. La obra, una vez completa, servirá de nodriza del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology que seguirá editándose para servir de ayuda a la identificación de las bacterias.

Con visión innovadora, la clasificación de las bacterias ha sido completamente alterada respecto a la edición anterior del Manual. Partiendo de la inseguridad que ofrecían las agrupaciones superiores al género, se ha establecido el reino de los procariotas con cuatro divisiones: Gracilicutes, Firmicutes, Tenericutes y Mendocinocutes. Consta el volumen de once secciones que tratan de las bacterias de importancia general, médica o industrial. Entre otras: las espiroquetas, bacterias gram-negativas, móviles e inmóviles, espirales y curvas, bacilos y cocos gram-negativos aerobios. Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, bacilos anaerobios facultativos gram-negativos, cocos gram-negativos anaerobios, rickettsias y clamidias, micoplasmas y endosimbiontes. En los grupos específicos se presenta información sobre su sistemática y ecología, con los métodos de enriquecimiento y aislamiento, las descripciones de las especies, caracteres determinativos y su mantenimiento y conservación. También se incluyen claves para el diagnóstico y tablas para facilitar la identificación junto con infor-

mación descriptiva detallada y comentarios taxonómicos.

Desde una perspectiva taxonómica de interés más general, contiene valiosos artículos, que preceden a las secciones, en los que los autores presentan síntesis actuales y merecen ser enumerados en sus títulos: Clasificación de Organismos Procariotas; Taxonomía Numérica; Los Ácidos Nucleicos en la Clasificación de las Bacterias; Métodos Genéticos; Serología y Quimiotaxonomía; Nomenclatura Bacteriana; Identificación de Bacterias; Colecciones de Bacterias, la Necesidad de Cepas-Tipo; ¿Son las Agrupaciones Superiores al Género un cajón de sastre? En casi todos ellos los autores vienen a recordarnos que, a pesar de los avances realizados, aún están por descubrirse los esquemas taxonómicos del futuro.

Completan el volumen, tipográficamente impecable, una bibliografía valiosísima que consta de unas 7.000 referencias en las cuales se incluyen trabajos de estricta actualidad que respaldan la amplitud y el rigor del texto, generosamente ilustrado, y un índice con los nombres científicos de las bacterias. Entre las referencias bibliográficas vemos con satisfacción nombres de algunos microbiólogos españoles y citas de trabajos publicados en «Microbiología Española».

La dirección del volumen ha corrido a cargo de N. E. Krieg y J. G. Holt. Formaron también parte del Consejo editorial R. G. E. Murray, D. J. Brenner, M. P. Bryant, J. W. Moulder, N. Pfenning, P. H. A. Sneath y T. Staley. Merecen reco-

nocimiento todos cuantos han participado en la edición.

La revisión del libro, en el que han colaborado 133 autoridades de 15 países, ha sido gratificante para el que esto escribe. Durante su lectura he tenido la sensación de estar participando en una de las más altas cumbres de la taxonomía contemporánea. El libro no sólo transmite información, sino posibilidades de investigación y crítica. Con él, la taxonomía de las bacterias tratadas se enriquece con una de las contribuciones más valiosas. Brillante comienzo de un «nuevo» Bergey, que nos hace esperar con impaciencia la publicación del resto de los volúmenes.

No quisiera finalizar estas líneas sin dedicar un recuerdo a la memoria de Norman E. Gibbons, que

fue miembro del Consejo de la Corporación del Manual de Bergey, director de la tercera edición y codirector con R. E. Buchanan de la octava edición del Manual. Trabajé en el laboratorio de Norman siendo un «Post-doctorate Fellow» en la «Division of Biosciences» del «National Research Council». El Dr. Gibbons, uno de los más entusiastas artífices del Manual, fue colaborador y amigo desde 1960 hasta su reciente muerte. Sus excelentes cualidades humanas y vasta formación científica permanecen imborrables entre nuestros más gratos recuerdos.

GONZALO SIERRA

Instituto de Microbiología
«Jaime Ferrán», C S I C

SOIL BIOLOGY AND CONSERVATION OF THE BIOSPHERE. Volumes 1-2. J. SZEGL (Ed.). Akademiai Kiado, Budapest. 1984. XXVI + 902 pages. \$ 75.

La obra *Soil Biology and Conservation of the Biosphere*, que consta de 2 volúmenes, comprende el material de la 8ª Sesión Científica de Biología del Suelo (Sección Biología del Suelo, de la Sociedad de Ciencia del Suelo), celebrada en agosto de 1981, en la Universidad de Agricultura de Godolló (Hungría).

El contenido de esta obra se refiere a aspectos tan importantes como: efecto de la fertilización sobre los procesos biológicos del suelo; interacciones entre pesticidas y microorganismos del suelo; papel de los microorganismos en la

descomposición y síntesis de la materia orgánica; importancia de la fijación del nitrógeno en la fertilidad del suelo; papel de los microorganismos en los ecosistemas del suelo; y papel de los microorganismos del suelo en los procesos de formación de suelos.

Existe un denominador común en todos los trabajos presentados: el predominio de la participación de los países del Este, incluyendo, en ellos, a Egipto y Cuba. Tan sólo existen dos trabajos, uno de Alemania Federal presentado por Domsh, relativo a las interacciones de microorganismos plaguicidas, y

otro de España, concretamente de Sáiz-Jiménez (del Centro de Edafología y Biología Aplicadas, de Sevilla), sobre la colonización y desgaste atmosférico de rocas sedimentarias arenosas en un ambiente urbano.

De la heterogeneidad de autores que colaboran, surge una variabilidad en el tipo de trabajos y en la ordenación de los mismos, que, en algunos casos, lleva a claros defectos. Consideramos, a pesar de comprender lo difícil de la ordenación, que debería haberse exigido por el editor, una cumplimentación de requisitos mínimos, como, por ejemplo, en uno de los trabajos, el de Baliza y Wegrzyn —no es posible su reproducción, ni una

consulta directa con ellos, pues aunque en el texto mencionan a varios autores, no van reflejados en el correspondiente apartado de la bibliografía.

De cualquier forma, la obra es enormemente interesante, no sólo para los especialistas en medio ambiente, biología del suelo y ecología, sino para todos aquellos científicos más o menos relacionados con productividad, protección del medio ambiente, nutrición vegetal y mejoras del suelo.

A. RAMOS-CORMENZANA

Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

NORMAS PARA LOS AUTORES

«Microbiología Española» publica 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 originales 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 12 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. Dibujos, gráficas y fotografías irán numerados 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, 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 de los trabajos, en español e inglés, de un máximo de 250 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 original. No deberán incluir material o datos no citados en el texto. En las notas, los resúmenes no deberán exceder de 100 palabras.

La bibliografía se reducirá a la que está directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, constarán de los siguientes datos:

Revistas: apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, año de publicación, título del trabajo, título abreviado de la revista (según Chemical Abstracts-Bibliographic Guide for Editors and Authors), número del volumen, número de la primera y última páginas.

Patentes: apellidos de los inventores con las iniciales de los nombres propios, país y número de la patente, año de petición de la patente, nombre de la compañía propietaria de la patente.

Tesis: apellido del autor con la inicial del nombre propio, tipo de tesis, universidad en la que se llevó a cabo, sede de la universidad, año de terminación.

Libros: a) Monografías. Apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, año de publicación, título completo del libro, editorial y lugar, números del volumen y de la página. b) Volúmenes colectivos. Apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, apellidos e iniciales de los directores de la obra, año de publicación, título completo de la obra, editorial y lugar, números del volumen y de la página.

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 100 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 pruebas, que deberán devolver en plazo no superior a una se-

mana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán corregidas por la Revista y publicado el trabajo. 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 25 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, 28002 Madrid. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo de Redacción de la Revista.

GUIDELINES TO AUTHORS

«Microbiología Española» publishes original research papers, research notes and occasionally reviews covering all aspects of microbiology. All submissions should be written in Spanish or English. The decision to accept submissions is made by the Editorial Board.

Submission of a paper to this journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere. Consent is given for reproducing publications of this journal if accredited as the source.

Papers addressed to «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, 28002 Madrid, Spain, should be typewritten with double spacing and 2.5 cm wide margin on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially.

Papers must be restricted to a maximum of 12 typescript pages including figures and tables. The original and one copy are required of the text, tables and illustrations.

The title should be supplied on the heading of a separate sheet, including the names of the authors, their affiliations and complete address.

Papers should be divided into: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any) and Bibliography.

Abstracts of no more than 250 words in Spanish and English should be supplied with the articles.

Well-known methods should be indicated only by references. The Metric System is to be used throughout. Symbols according to UNE rules of the National Rationalization and Standardization Institute for texts in Spanish.

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on

the back and identified with the first author's name written in pencil.

Drawings and line-figures should be drawn in black ink on tracing paper. Photoprints are also acceptable instead of the originals, in any case, they should be marked in the same way as photographs. Drawings, graphs and photographs should be numbered jointly and consecutively.

Legends for line-drawings and photoprints must be typed, double-spaced on a separate sheet.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using roman numerals.

Bibliography should be confined to the directly related to the concerned subject, numbered and alphabetized.

References to journals should contain the names and initials of all authors, the year of publication, the title of the paper, the title of the periodical abbreviated according to Chemical Abstracts-Bibliographic Guide for Editors and Authors. These should be followed by the volume number first and last page numbers.

References to patents should contain the names and initials of all inventors, country and number of patent, year of application and name of the company owning the patent.

References to thesis should contain the name and initials of the author, type of thesis, name of the University where submitted, place and year.

References to books should also include the names and initials of all authors, editors if applicable, year, title of the book, volume, page, publishers and town.

Notes should be restricted to 4 typescript pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the guidelines given for papers, but without the heading divisions,

and their abstracts should not exceed 100 words. Figures and tables should be kept to a minimum.

Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. Instead of an abstract, they will contain a list of contents.

On acceptance of the paper, one galley proof will be sent to the nominated author

to check for typesetting accuracy. The corrected proofs shall be duly return within one week's time. If delay were observed, the proofs will be corrected by the editorial staff and published. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author's expense.

For each author 25 free reprints will be supplied. Additional reprints will be billed at cost price if requested in written upon returning the corrected galley proofs.