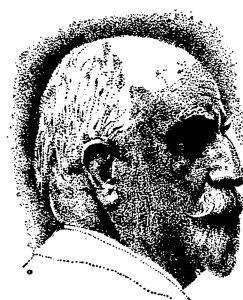

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Revista del Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán"

VOLUMEN 38
NUMEROS 1-2
ENERO-JUNIO, 1985



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

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

Vicedirector

Dr. Angel García Gancedo, Vicedirector del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Consejo de Redacción

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

Prof. Dr. Enrique Montoya, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Alberto Ramos Cormenzana, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Benito Regueiro, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

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

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

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

«Microbiología Española» está citada en:

Biological Abstracts

Chemical Abstracts

Index Medicus

Pascal Explore

Referativny Zhurnal

Redacción

«Microbiología Española»

Joaquín Costa, 32

28002 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

IMPRENTA CASILLAS - AGUSTIN CALVO, 47 - 28043 MADRID

I N D I C E

	Página
Detección, aislamiento y caracterización de <i>Bifidobacterium</i> en aguas libres superficiales, F. J. Muñoz, J. Vives-Rego y R. Parés (*)	1
Regeneración de <i>Aspergillus niger</i> 44. Estudio de diferentes medios de esporulación, R. Gómez, I. Schnabel y J. Garrido (*)	11
Estudios genéticos sobre la citocromo-c-peroxidasa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : posible influencia de factores citoplasmáticos, E. Valdivia, M. Maqueda y E. Montoya (*)	19
Influencia de la glucosa sobre la movilización de la trehalosa en <i>Candida utilis</i> , J. C. Argüelles, J. Vicente y M. Gacto (**)	27
Criterios de selección de cepas de levadura para un proceso continuo de fermentación alcohólica, J. Tabera, M. A. Iznaola, I. Schnabel y J. Garrido (*)	35
Relación entre la estabilidad respiratoria y la resistencia a la supresividad de estirpes rho ⁺ de <i>S. cerevisiae</i> , M. Maqueda, E. Valdivia y E. Montoya (*)	45
Inducción por pectina de distintas actividades pécticas del hongo <i>Alternaria alternata</i> durante su autólisis, C. Vázquez, M. J. Martínez, R. Lahoz y F. Reyes (*)	53

(*) En español. (**) En inglés.

I N D E X

	Page
Detection, isolation and characterization of <i>Bifidobacterium</i> in natural water, F. J. Muñoz, J. Vives-Rego and R. Parés (*)	1
Regeneration of <i>Aspergillus niger</i> 44. Study of different sporulation media, R. Gómez, I. Schnabel and J. Garrido (*)	11
Genetic studies on cytochrome-c-peroxidase of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : possible influence of cytoplasmic factors, E. Valdivia, M. Maqueda and E. Montoya (*)	19
Effect of glucose on trehalose mobilization in <i>Candida utilis</i> , J. C. Argüelles, J. Vicente and M. Gacto (**)	27
Yeast strains screening criteria for a continuous process of alcoholic fermentation, J. Tabera, M. A. Iznaola, I. Schnabel and J. Garrido (*)	35
Relationship between respiratory stability and resistance to suppressiveness of rho ⁺ strains in <i>S. cerevisiae</i> , M. Maqueda, E. Valdivia and E. Montoya (*)	45
Induction by pectin of different pectic activities of the fungus <i>Alternaria alternata</i> during autolysis, C. Vázquez, M. J. Martínez, R. Lahoz and F. Reyes (*)	53

(*) In Spanish. (**) In English.

DETECCION, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *BIFIDOBACTERIUM* EN AGUAS LIBRES SUPERFICIALES

F. J. MUÑOA, J. VIVES-REGO y R. PARES

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

(Aceptado: 9 de mayo de 1985)

RESUMEN

Se han enumerado las bifidobacterias de aguas libres superficiales utilizando los medios selectivos YN-6 e YN-17, realizándose determinaciones simultáneas de *Escherichia coli* y estreptococos fecales. Del total de aislamientos, 10 cepas se clasificaron a nivel de especie, identificándose como *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. adolescentis* y *B. infantis-longum*. Se constata a través de los resultados obtenidos, que los medios YN-6 e IN-17 carecen de la selectividad necesaria para permitir el uso de *Bifidobacterium* como indicador de contaminación fecal en pruebas rutinarias. Se evidencia que los agentes selectivos utilizados en los medios de cultivo son relativamente tóxicos para una parte de la población de bífidos recuperable de las aguas por medios no selectivos.

SUMMARY

Enumerations of bifidobacteria have been performed from aquatic samples using the selective media YN-6 and YN-17. Simultaneously, *Escherichia coli* and faecal streptococci were also determined. Ten isolates of *Bifidobacterium* have been classified as *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. adolescentis* and *B. infantis-longum*. The results indicated that YN-6 and YN-17 lacks the desired selectivity to allow *Bifidobacterium* to be used as faecal indicator in routinary assays. It seems evident that the selective agents used in these media are of relative toxicity to a part of the bifids population, wich could be isolated by a non-selective medium.

INTRODUCCIÓN

Los bífidos o bifidobacterias (*Bifidobacterium*) son procariotas gram-

positivos, no esporulados, presentes en las heces de animales superiores a concentraciones mayores que *Escheri-*

chia coli. Por este motivo Mossel, en 1958, sugirió por primera vez la posibilidad de usar el género *Bifidobacterium* como un indicador de contaminación fecal. Hasta la fecha, *E. coli* y los estreptococos fecales son los indicadores clásicos.

Aunque la detección y enumeración de estas bacterias en aguas frías ofrece una idea bastante aceptable del nivel de contaminación fecal, en aguas cálidas o incluso templadas con alta carga orgánica, puede darse un crecimiento de *Escherichia coli* o una desaparición de los estreptococos fecales (3,6).

La necesidad de encontrar otros parámetros que permitan detectar en todo momento el nivel real de contaminación fecal, hizo pensar en la utilización de bacterias anaerobias como indicadores. *Bifidobacterium* es anaerobio y tiene complejos requerimientos nutritivos, factores ambos que impiden su crecimiento extraentérico aún en aguas con alto contenido de materia orgánica. Por otro lado, la existencia de diferentes especies de *Bifidobacterium* permitiría la diferenciación del origen humano o animal de la contaminación detectada (7,11).

El principal problema que limita el desarrollo de técnicas sencillas de enumeración de *Bifidobacterium*, es la falta de un medio de aislamiento con alto grado de selectividad para impedir el crecimiento de microorganismos de fisiología próxima a la del propio *Bifidobacterium*.

El objetivo de este trabajo ha sido el de realizar una primera aproximación a las posibilidades de uso de *Bifidobacterium* como indicador de contaminación fecal en aguas libres superficiales de la zona de Barcelona (ríos, mar y colectores urbano-industriales). Los medios de aislamiento empleados son el YN-6 (10) y el YN-17 (7). Las

determinaciones de *Bifidobacterium* fueron acompañadas de las efectuadas con los parámetros clásicos, *Escherichia coli* y estreptococos fecales, para la comparación de los niveles entre cada uno de ellos.

Por último, se ha realizado la identificación, a nivel de especie, de varias de las cepas aisladas de *Bifidobacterium*. Se discute el significado de la presencia de dichas especies en cuanto al origen de la contaminación fecal detectada y la capacidad selectiva de los medios YN-6 e YN-17.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estaciones de muestreo

Todas las muestras objeto de estudio provenían de aguas superficiales de la zona de Barcelona. Las de agua de mar (estaciones de Barceloneta, Gavá y Badalona) fueron tomadas en la orilla de las correspondientes playas. En los ríos Besós y Llobregat, con importantes aportes urbano-industriales, las muestras fueron tomadas en zonas próximas a la desembocadura. Los colectores de Badalona recogen las aguas residuales de toda esta ciudad, llegando a desembocar en la playa, lugar en que se tomaron las muestras. El colector Prim recoge las aguas residuales de una zona muy extensa de Barcelona. También las muestras se tomaron en la desembocadura. En todos los casos, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el procesamiento de las mismas en el laboratorio fue inferior a 4 h. Se estudiaron un total de 36 muestras, distribuidas del siguiente modo (tabla 1): Barceloneta 4, Badalona 4, Gavá 3, Besós 4, Llobregat 3, colector Prim 4, colectores de Badalona 14 (una muestra en cada uno de ellos excepto en el colector 7,

Tabla 1. Aislamiento de *Bifidobacterium*, *E. coli* y *estreptococos fecales* en aguas libres

Estación		Microorganismos/ml			
		<i>Bifidobacterium</i>	<i>E. coli</i>	Estreptococos fecales	B/E
Barceloneta (mar)		$<1 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$		$<0,04$
		$<1 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	2,3	$<0,23$
		$<1 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$<0,04$
		$<1 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	$<0,47$
Badalona (mar)		$1,1 \times 10^1$	$4,6 \times 10^2$	4,3	0,02
		$<1 \times 10^1$	$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	$<0,02$
		$<1 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$<0,06$
		$<1 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$	0,4	$<0,04$
Gavá (mar)		$<1 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	$<0,10$
		$<1 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	$<0,06$
		$<1 \times 10^1$	4,6	0,4	$<2,17$
Besós (río)		$<1 \times 10^1$	$2,3 \times 10^4$		$<0,0004$
		$<1 \times 10^1$	$9,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$<0,001$
		$<1 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$<0,0009$
		$<1 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^3$	$<0,0004$
Llobregat (río)		$<1 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$<0,0004$
		$2,5 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	0,002
		$5,0 \times 10^1$	$4,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	0,01
Colector Prim		$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	1
		$5,0 \times 10^2$	$4,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	0,01
		$1,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	0,73
		$7,0 \times 10^3$			
Colector Badalona	n.º 1	$<1 \times 10^1$	$2,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$<0,0004$
	n.º 2	$<1 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$<0,003$
	n.º 3	$<1 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$<0,003$
	n.º 4	$<1 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$<0,001$
	n.º 5	$<1 \times 10^1$		$9,0 \times 10^3$	
	n.º 6	$<1 \times 10^1$	$2,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$<0,0005$
	n.º 7	$1,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	0,007
	«	$2,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	0,01
	n.º 8	$<1 \times 10^1$	$2,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$<0,0005$
	n.º 9	$<1 \times 10^1$	$9,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$	$<0,001$
	n.º 10	$<1 \times 10^1$	$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$<0,0002$
	n.º 11	$<1 \times 10^1$	$4,3 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	$<0,0002$
	n.º 12	$<1 \times 10^1$	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	$<0,00004$
n.º 13	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0,03	

donde se tomaron dos). En el río Besós se tomaron otras 5 muestras en una segunda etapa.

Enumeración de *Escherichia coli* y *estreptococos fecales*

Escherichia coli se enumera por el método del número más probable

(NMP). La prueba presuntiva se realiza en caldo lactosado púrpura, incubándose 48 h a 30° C. De los tubos positivos (formación de ácido y gas), se realiza la prueba confirmativa incubándose 24 h a 44° C en caldo al verde brillante y bilis al 2%, así como en caldo con triptófano, detectándose producción de gas e indol, respectiva-

mente (12). Los estreptococos fecales se enumeran también por el NMP, haciéndose la prueba presuntiva sobre caldo-azida de Rothe y la confirmativa sobre caldo-azida violeta de Litsky. Ambas pruebas se incuban durante 48 h a 37° C. (12) En todos los casos se utilizaron tres tubos por disolución.

Enumeración de *Bifidobacterium*

Bifidobacterium se enumera por dilución y recuento en placa sobre los tres medios empleados, YN-6, YN-17 y RCA. La incubación se efectuó en jarras de anaerobios gas-pack (BBL) 48 h a 37° C.

El medio YN-6 (10) es un medio de aislamiento que incorpora ácido nalidíxico y sulfato de neomicina como agentes selectivos. El medio YN-17 (7) incorpora ácido nalidíxico, sulfato de kanamicina y sulfato de polimixina B, también como agentes selectivos.

El medio RCA (BBL 11564) se utiliza para el mantenimiento de las cepas de *Bifidobacterium* aisladas. Su composición cualitativa es: extracto de levadura, extracto de carne, peptona, glucosa, cloruro sódico, acetato sódico, almidón soluble y L-cisteína. No es un medio de aislamiento para *Bifidobacterium*, ya que carece de agentes selectivos, permitiendo el crecimiento de muchos otros microorganismos. Su empleo como medio de aislamiento en éste y en otros trabajos (10-11) tiene como finalidad permitir el crecimiento de todos los bífidos viables presentes en la muestra analizada, para servir de referencia a las enumeraciones realizadas con medios más selectivos.

Identificación de *Bifidobacterium*

De cada muestra se seleccionaba una placa conteniendo 40-100 colo-

nias independientes y se efectuaba la tinción de Gram de la totalidad de las mismas. De las colonias correspondientes a bacilos gram-positivos se verificaba el crecimiento aerobio y anaerobio en placas de RCA. Las cepas que mostraban estricto crecimiento anaerobio eran utilizadas para la determinación de la presencia o no de la enzima F6PPK (fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa) según el método de Scardovi (14), asignándose definitivamente al género *Bifidobacterium* las que lo presentaban y descartándose el resto. La identificación a nivel de especie se realizó mediante el ensayo de fermentación de azúcares de Mara y Oragui (7).

RESULTADOS

Aislamientos en el medio YN-6

Antes de iniciarse las determinaciones en las estaciones objeto de estudio, se constató la validez de la técnica enumerando *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* en heces de varios adultos sanos y normales. Se obtuvo un valor medio de $2,2 \times 10^9$ bifidobacterias y $8,1 \times 10^7$ *E. coli*/g de heces. La proporción entre ambos microorganismos (cociente B/E) fue de 27, valor que coincide con los descritos en la bibliografía (2,4,10), donde de modo constante se hace referencia a una mayor densidad en heces de los miembros del género *Bifidobacterium* respecto a *E. coli* (B/E = 1-50).

Una vez verificada la técnica a utilizar, se procedió a realizar enumeraciones en aguas libres superficiales de los puntos de muestreo descritos en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados expresados en la *tabla 1* ponen de manifiesto que en los únicos puntos en los que se detectaba siempre la presencia de bifidobacterias

fueron el colector Prim y el colector 7 de Badalona. En el resto de puntos se detectó *Bifidobacterium* en contadas ocasiones y siempre a niveles muy inferiores a los de los colectores citados. Las determinaciones de *Escherichia coli* y estreptococos fecales arrojaron niveles altos en la totalidad de las muestras, sin que la esperada presencia de *Bifidobacterium* se evidenciase.

Enumeración de Bifidobacterium en diferentes medios de aislamiento

Los valores singularmente bajos de bifidobacterias detectadas con la metodología empleada, plantean si se trata realmente de muestras con bajo contenido de bífidos o, por el contrario, se deben a la no idoneidad del medio utilizado para el aislamiento a partir de aguas libres. Para intentar dilucidar entre estas posibilidades, se procedió a efectuar enumeraciones simultáneas sobre tres medios diferentes a partir de muestreos realizados en el río Besós, caracterizado por un alto y regular contenido fecal. En la *tabla 2* se expresan los resultados obtenidos sobre los medios YN-6, YN-17 y RCA. Los tres medios inoculados con la misma muestra recuperan valores de bífidos muy diferentes entre sí. El medio YN-17 recupera bífidos en un número del orden de 10^1 - 10^3 veces superior al obtenido en el medio YN-6. El medio RCA recupera una población de bífidos de 10^2 - 10^3 veces superior al medio YN-17. La relación B/E es menor en el medio YN-6 que en el medio YN-17, siendo superior a ambos en el medio RCA, donde arroja valores muy próximos a los habituales en heces (2, 4, 10).

Estos resultados indican que el número real de bífidos viables debe ser muy superior al obtenido sobre YN-6. El medio YN-17 tampoco permite sig-

nificativa recuperación, aunque en alguna de las muestras se aproxima a lo detectado sobre el medio RCA, que fue el que proporcionó mejores resultados.

El porcentaje de bifidobacterias recuperadas sobre el total de colonias crecidas en los medios YN-6, YN-17 y RCA fue, respectivamente de 0, 3 %, 33 % y 8 %. Se evidencia la escasa selectividad que presentan los medios utilizados, permitiendo el crecimiento de numerosos microorganismos diferentes a *Bifidobacterium*, cuya presencia quedará encubierta cuando se halle a concentración inferior a la de aquéllos.

Identificación de Bifidobacterium

La morfología colonial de *Bifidobacterium* en estos medios no tiene características propias que difieran de modo concluyente de las del resto de microorganismos no bífidos capaces de crecer en ellos. No es, por tanto, un criterio de identificación definitivo.

Las colonias de *Bifidobacterium* crecidas en YN-6 ó YN-17, obtenidas en nuestro estudio, son pequeñas, redondas, con diámetro inferior a 2 mm, enteras, de color oscuro casi negro y algo brillantes. Esta descripción coincide con la realizada por otros autores (10-11).

Las colonias que pueden descartarse *a priori* de pertenecer al género *Bifidobacterium* son aquellas que aparecen rodeadas por un halo blanco, grandes y redondas, con diámetro mayor o igual a 2 mm, cuya morfología celular habitual corresponde a cocos gram-positivos y cuya fisiología es la de anaerobios facultativos.

La morfología celular de los bífidos sí es un criterio mucho más exacto para asegurar, con bajo porcentaje de error, la pertenencia de un microorga-

Tabla 2. Enumeración comparativa de *Bifidobacterium* y *E. coli* en los medios YN-6, YN-17 y RCA (*)

Muestra	<i>E. coli</i>	YN-6			YN-17			RCA		
		Total colonias	Bífidos	B/E	Total colonias	Bífidos	B/E	Total colonias	Bífidos	B/E
1	$2,4 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	0,0008	$5,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	0,008	$1,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	1,25
2	$2,4 \times 10^4$	$7,7 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	0,0008	$1,4 \times 10^3$	$2,0 \times 10^1$	0,0008	$2,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	2,70
3	$4,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$<1 \times 10^1$	<0,002	$2,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	0,02	$9,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	0,32
4	$2,1 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4$	$<1 \times 10^1$	<0,004	$2,8 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	4,70	$1,2 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$	38
5	$2,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$<1 \times 10^1$	<0,0004	$2,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	0,60	$3,3 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	2,70

(*) Los valores representan el número de microorganismos/ml.

Tabla 3. Identificación de las especies aisladas de *Bifidobacterium*

Estación de origen	Número de cepas	Especie
Río Besós	5	<i>B. longum</i> (3) <i>B. infantis-longum</i> (2)
Colector Prim	2	<i>B. adolescentis</i> <i>B. longum</i>
Río Llobregat	1	<i>B. breve</i>
Colector Badalona	2	<i>B. breve</i> <i>B. infantis-longum</i>

nismo al género *Bifidobacterium*. Esta morfología es la de bacilos pleomórficos, gram-positivos, con abundantes bifurcaciones en forma de Y, V, espátula o maza. A pesar de ello, el criterio definitivo es la detección de la enzima F6PPK en extracto celular del cultivo puro obtenido a partir de la colonia presuntiva. Esta prueba, efectuada con 25 microorganismos presuntamente bífidos, aislados de los distintos puntos de muestreo, dio resultado positivo en la totalidad de los casos, quedando así confirmada su pertenencia al género *Bifidobacterium*.

La detección de la F6PPK dio resultados negativos en los microorganismos procedentes de los mismos aislamientos que no presentaban la morfología celular propia de bífidos.

Diez de las cepas confirmadas como *Bifidobacterium* fueron sometidas a un ensayo de fermentación de azúcares para su clasificación a nivel de especie. El resultado de la clasificación se expresa en la *tabla 3*. Todas las especies clasificadas se encuentran entre las bifidobacterias de origen fecal humano. Solo *B. longum* se encuentra también entre las de origen animal (7). Este resultado concuerda con el hecho de que las aguas muestreadas provienen de una zona urbana.

DISCUSIÓN

Los medios YN-6 e YN-17 han demostrado poca eficacia en el aislamiento de los miembros del género *Bifidobacterium* a partir de aguas libres superficiales con alto grado de contaminación fecal. En todas las muestras estudiadas, incluso en aquellas en las que no se detectaron bífidos, las placas con los medios selectivos permitieron el crecimiento de gran cantidad de colonias de microorganismos diferen-

tes a *Bifidobacterium*, que dificultaban enormemente las enumeraciones. Este hecho obligaba a realizar diluciones de todas las aguas que iban a ser analizadas, a la vez que imposibilitaba la utilización de técnicas de filtración por membrana en las estaciones donde no se detectaron bífidos. Además, la semejanza de morfologías, colonial y celular, entre las bifidobacterias y algunos de estos microorganismos, hacía ineludible la detección de la enzima F6PPK para la confirmación concluyente de los aislamientos como pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

Por otro lado, a partir de los datos obtenidos en la enumeración simultánea de *Bifidobacterium* en diferentes medios de aislamiento, se evidencia una incapacidad por parte de los medios YN-6 e YN-17 para permitir el crecimiento de la totalidad de los bífidos viables. En todos los casos se recuperan más bifidobacterias sobre RCA que sobre los citados medios. La eficacia de éstos, constatada por sus propios autores y nosotros mismos, para aislar bífidos a partir de heces, disminuye considerablemente en las enumeraciones realizadas en aguas libres superficiales. Estudios realizados con otros microorganismos indicadores de contaminación fecal han puesto de manifiesto la existencia de un debilitamiento fisiológico cuando, expulsados por las heces, alcanzan el medio acuático (1, 5, 8). Este debilitamiento varía en intensidad dependiendo de características intrínsecas y extrínsecas del medio receptor (agentes tóxicos disueltos, radiación solar, temperatura, etc.) y del propio microorganismo.

El debilitamiento o «stress» se manifiesta como una incapacidad para crecer en sus propios medios selectivos, mientras que enumeraciones realizadas al mismo tiempo con medios

sin agentes selectivos, arrojan valores superiores que confirman la viabilidad de las células debilitadas. Para contrarrestar este debilitamiento puede realizarse una incubación en medio rico sin agentes selectivos, previa a la siembra sobre el medio que sí los contiene. Este paso ha sido sugerido por numerosos autores para la puesta a punto de nuevas técnicas de enumeración de microorganismos indicadores a partir de hábitats extraentéricos (1, 5, 8).

En *Bifidobacterium* se ha encontrado un efecto de este tipo si el medio acuático que contiene los bifidos ha sido tratado con cloro, lo que les impide crecer en medios que contengan concentraciones de ácido nalidíxico semejantes a las que lleva el medio YN-6 (13). También en nuestro laboratorio se han hallado efectos semejantes con otros agentes tóxicos habitualmente presentes en aguas contaminadas (datos no publicados). De esta forma se podrían explicar los valores tan bajos de bifidos aislados sobre YN-6 e YN-17 respecto al medio RCA.

A pesar de la menor toxicidad evidenciada por el medio YN-17 respecto al medio YN-6, ninguno de los dos permite por el momento impulsar la utilización de *Bifidobacterium* como indicador de contaminación fecal de un modo práctico, sencillo y rutinario. Se hace imprescindible una mejora de la capacidad selectiva del medio, así como la reducción del efecto tóxico del mismo sobre las células debilitadas que se pretende enumerar. En este último aspecto podría ser beneficiosa la incorporación en las técnicas de enumeración, de una incubación previa en medio rico para eliminar el debilitamiento.

Referente a la clasificación de las cepas de *Bifidobacterium* aisladas, ha de señalarse que todas se encuentran

entre las cepas de origen fecal humano. Únicamente *B. longum* puede ser considerado también de origen animal, siendo conocida su presencia en heces de cerdo (7, 10). Esta especie es precisamente la que más veces fue aislada, lo que podía explicarse por ser una de las dos más abundantes en heces de humanos. La otra especie más abundante, *B. adolescentis*, sólo fue aislada en una ocasión, lo que quizá indique una mayor sensibilidad a los agentes selectivos de los medios empleados, como consecuencia del debilitamiento impuesto por el medio acuático.

BIBLIOGRAFÍA

1. BISSENETTE, G. K.; JEZEKSKY, J. J.; MCFETERS, G. A., and STUART, D. G. 1977. Evaluation of recovery methods to detect coliforms in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 590-95.
2. EVISON, L. M., and JAMES, A. 1973. A comparison of the distribution of intestinal bacteria in British and East African water sources. *J. Appl. Bacteriol.*, 36, 109-18.
3. EVISON, L. M., and JAMES, A. 1975. *Bifidobacterium* as an indicator of faecal pollution in water. *Progr. Water Technol.*, 7, 57-66.
4. EVISON, L. M., and MORGAN, S. 1978. Further studies on bifidobacteria as indicators of faecal pollution in water. *Progr. Water Technol.*, 10, 341-50.
5. LECHEVALLIER, M. W.; CAMERON, S. C., and MCFETERS, G. A. 1983. New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 484-92.
6. LEVIN, M. A. 1977. Bifidobacteria as water quality indicators. En: A. W. HOADLEY and B. J. DUTKA (eds.). *Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water*, 131-138. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
7. MARA, D. D., and ORAGUI, J. I. 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 349-57.

8. MCFETERS, G. A.; CAMERON, S. C., and LE-CHEVALLIER, M. W. 1982. Influence of diluents, media and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ Microbiol.*, 43, 97-103.
9. MOSSEL, D. A. A. 1958. The suitability of bifidobacteria as part of a more extended bacterial association indicating faecal contamination of foods. VII Int. Congr. Microbiol. Abstr. Pap., 440-41.
10. RESNICK, I. G., and LEVIN, M. A. 1981a. Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 427-32.
11. RESNICK, I. G., and LEVIN, M. A. 1981b. Assessment of bifidobacteria as indicators of human faecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 433-38.
12. RODIER, J. 1981. Investigación y recuento de los gérmenes indicadores de una contaminación fecal. En: *Análisis de Aguas*, 697-717. Editorial Omega, Barcelona.
13. SARTORY, D. P. 1980. A note on the sensitivity of chlorine-stressed bifidobacteria to nalidixic acid. *J. Appl. Bacteriol.*, 49, 291-93.
14. SCARDOVI, V. 1981. The Genus *Bifidobacterium*. En: P. STAR (ed.). *The Prokaryotes*, 1951-61. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; New York.

REGENERACION DE *ASPERGILLUS NIGER* 44. ESTUDIO DE DIFERENTES MEDIOS DE ESPORULACION (*)

R. GOMEZ, I. SCHNABEL y J. GARRIDO

UEI de Tecnología de las Fermentaciones y Bioingeniería, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Arganda del Rey (Madrid)

(Aceptado: 12 de abril de 1985)

RESUMEN

Se estudia la influencia de diferentes medios de esporulación sobre la posterior producción de ácido cítrico por la cepa *Aspergillus niger* 44. Los medios ensayados han sido: 36 medios sintéticos, resultantes de modificaciones en el medio E-1, variante del Czapek-Dox; el medio patata-glucosa-agar (PGA), y el mismo adicionado de 5 g/l de CaCO_3 . Los medios sintéticos se diferencian en la concentración de sacarosa, NaH_2PO_4 , MgSO_4 , K_2SO_4 ; presencia de FeCl_3 , ZnSO_4 y/o CaCO_3 , y naturaleza de la fuente nitrogenada.

Los medios con 20 g/l de sacarosa, FeCl_3 , ZnSO_4 o CaCO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 o KNO_3 de fuente nitrogenada, son los sintéticos que dieron mejores resultados, aunque no se consiguió con ellos la regeneración de *Aspergillus niger* 44. La cepa recuperó la productividad primitiva después de 8 pases sobre los medios PGA y PGA-Ca, produciendo ya mayor cantidad de ácido cítrico desde el segundo pase de adaptación a ellos. Estos medios, además, conservan la capacidad productora de ácido cítrico de *Aspergillus niger* 44, incluso en el caso de almacenar las esporas desarrolladas sobre ellos, durante 6 meses, a 4 °C, sin darles pases.

SUMMARY

The influence of different sporulation media on *Aspergillus niger* 44 later production of citric acid is studied. The media tested are: 36 kinds of synthetic media, produced by modifying the E-1 medium, an altered Czapek-Dox; the potato-dextrose-agar medium (PGA); and this last medium with de addition of 5 g/l of CaCO_3 (PGA-Ca). In the synthetic media the effects of varying the concentration of sac-

(*) Con este trabajo se inicia una serie de artículos sobre los factores que afectan a la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*.

charose, NaH_2PO_4 , MgSO_4 , K_2SO_4 , have been studied; and also the effects of adding FeCl_3 , ZnSO_4 , and/or CaCO_3 , and of substituting $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ by NH_4NO_3 or KNO_3 .

The synthetic media containing 20 g/l of saccharose, FeCl_3 , ZnSO_4 , or CaCO_3 obtain the best results, though they do not regenerate *Aspergillus niger* 44. The strain re-establishes the original productivity after 8 transfers on PGA and PGA-Ca media, producing a greater quantity of citric acid as from the second adaptation transfer to these media. These media maintain also the citric acid production capacity in strain sporulated in them, even when it is kept at 4 °C for 6 months without having any transfers.

INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es producido, generalmente, por cepas de *Aspergillus niger*, que utilizan carbohidratos como sustrato, siempre que la composición del medio de fermentación sea la adecuada (3, 7-8, 10-11, 13, 15). Su almacenamiento prolongado produce degeneración de los conidios, con la consiguiente disminución en la producción de ácido cítrico. Para evitarlo es necesario dar pases a las cepas frecuentemente (4), y utilizar los medios de esporulación adecuados (12).

La esporulación de *Aspergillus niger* está determinada por la concentración y naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo (14), y está favorecida por las sales de hierro, zinc y calcio (1). El hongo esporula si su crecimiento vegetativo está limitado, aunque no siempre después del cese de crecimiento tiene lugar la esporulación, y si la autólisis, si la fuente de carbohidrato es el factor limitante del crecimiento (9).

La composición del medio de esporulación puede tener un efecto marcado sobre el número de esporas desarrolladas/cm² de medio y sobre la conversión de carbohidratos a ácido cítrico en la fermentación posterior. De la presencia de 0,1 ppm de sales de manganeso en este medio, resulta un

inóculo que produce bajo rendimiento en ácido cítrico (12). Este efecto indeseable es eliminado en algunas cepas si el medio contiene también sales de zinc o de hierro.

En este trabajo se estudia la posible regeneración de *Aspergillus niger* mediante subcultivos sobre 36 medios sintéticos, el medio patata-glucosa-agar, y el mismo adicionado de CaCO_3 . Los medios sintéticos resultan al añadir FeCl_3 , ZnSO_4 y CaCO_3 al medio E-1, variante del Czapeck-Dox, y/o variarle la concentración de sacarosa y la fuente nitrogenada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa productora de ácido cítrico *Aspergillus niger* 44, conservada en el medio sólido: extracto concentrado de malta, diluido a 6 °Be, y 2% de agar (medio M-A); o en los medios que se estudian en este trabajo, que son los siguientes: medios sintéticos, patata-glucosa-agar (PGA) (6), y el mismo adicionado de 5 g/l de CaCO_3 . Los primeros son modificaciones del medio E-1, variante del Czapeck-Dox (4). Estas han sido: aumento de la sacarosa inicial a 20 y 50 g/l; adición de FeCl_3 , ZnSO_4 o/y CaCO_3 ; sustitución

del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por NH_4NO_3 ó KNO_3 , como fuente de nitrógeno en el medio E-1, con 10, 20 y 50 g/l de sacarosa, sin/con FeCl_3 , ZnSO_4 o/y CaCO_3 .

Se dieron 2 pases sucesivos de adaptación a la cepa, conservada hasta ahora en cuñas de medio M-A, sobre los medios M-A, los 36 medios sintéticos, medio PGA y PGA-Ca. En el texto y tablas se las denomina Esporas I. Después, los cultivos fueron almacenados a 4 °C durante 6 meses, dándoles pases mensuales en los mismos medios de los que procedían (Esporas III), que fueron almacenadas otros 6 meses a 4 °C, sin darles pases, a las procedentes de los medios M-A, E-15, PGA y PGA-Ca. El inóculo se preparó suspendiendo cada tipo de esporas en 50 ml de agua desionizada estéril, con bolitas de vidrio. Después de agitar durante 2 min en un sacudidor de frascos para homogeneizar las suspensiones, difícil por la tendencia de las esporas a flotar, se inóculo 2,5 ml de cada suspensión a 25 ml del medio de fermentación (M-2).

Los ensayos de fermentación se realizaron en cultivo superficial sobre el medio M-2, cuya composición es la siguiente: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,40 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,35 g/l; K_2SO_4 , 0,22 g/l; NH_4NO_3 , 3,0 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l; FeCl_3 , 0,16 g/l; sacarosa, 140 g/l; pH 4,5. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 25 ml del medio M-2, durante 12 d de incubación en estático, a 28 °C. Los resultados mostrados en las tablas son la media de 4 matraces.

Determinaciones analíticas

El ácido cítrico se determina por acidez total valorando con NaOH 0,1 N, usando como indicador fenolftaleína. También se ha determinado cualitativamente la presencia de los ácidos

málico, cítrico, succínico y oxálico, mediante cromatografía en capa fina con: soporte, placas de celulosa MN 300; eluyente, n-butanol-ácido fórmico-agua (1:1:2); reveladores, azul de bromofenol (80 mg de bromofenol, 100 mg de acetato sódico, 10 ml de agua, en 200 ml de etanol), o verde de bromocresol (0,5% en etanol).

Los azúcares residuales se determinaron por el método Shaffer-Somogyi (2), previamente neutralizados los medios fermentados.

El crecimiento se determinó pesando los micelios después de secos a 100 °C durante 24 h. Previamente se separaron del medio por filtración y fueron lavados con agua desionizada, hasta que el filtrado no dio reacción ácida. Los papeles de filtro fueron tarados de la misma manera antes de utilizarlos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tradicionalmente, en nuestro laboratorio se utilizaba el medio de esporulación sólido extracto concentrado de malta, diluido a 6 °Be (M-A), para conservar las cepas de hongos. Se observó que muchas de las cepas de *Aspergillus niger*, y entre ellas *A. niger* 44, después de almacenar sus cultivos a 4 °C durante 2 años, habían disminuido su producción de ácido cítrico y esporulaban pobremente al darles pase de nuevo sobre este medio, aunque previamente se cultivaron en agitación en el medio líquido extracto concentrado de malta, diluido a 6 °Be.

Se ensayaron los medios de esporulación que a continuación se detallan con la cepa *Aspergillus niger* 44, con el fin de regenerarla, ya que fue una de las que más había degenerado durante su almacenamiento al disminuir su producción de ácido cítrico desde 85,5

a 50,4 g/l, y el rendimiento en ácido cítrico sobre azúcar utilizado del 81 al 69%.

Medios sintéticos de esporulación

La composición de estos medios se detalla en las *tablas 1, 3 y 5*, y los resultados obtenidos con *Aspergillus niger* 44, después de 2 (Esporas I), y 8 pases sucesivos (Esporas III) sobre ellos, se muestran en las *tablas 2, 4 y 6*.

Los pases sucesivos sobre estos medios sintéticos aumentan la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* 44, obteniéndose los mejores resultados con los que contienen 20 g/l de sacarosa. Estos, en general, desarrollan esporas que producen mayor cantidad de ácido cítrico (*tablas 4 y 7*) que las procedentes de los medios con 10 ó

50 g/l de sacarosa (*tablas 2 y 6*), y del medio M-A, en especial los medios que también contienen FeCl_3 , ZnSO_4 o CaCO_3 , ya sea la fuente nitrogenada $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 o KNO_3 (*tabla 4*). Cabe destacar que el KNO_3 de fuente nitrogenada en el medio de esporulación, que favorece la conidiación de *Aspergillus niger* (14), disminuye la posterior producción de ácido cítrico de las esporas de *A. niger* 44, si aquel medio no contiene los metales mencionados anteriormente.

Se atribuye la menor acidez producida en el cultivo inoculado con esporas del 8º pase sobre el medio M-A, en relación a los inoculados con las desarrolladas en los medios sintéticos con 20 g/l de sacarosa, a que es también menor la cantidad de micelio produci-

Tabla 1. Medios sintéticos de esporulación (*) con 10 g/l de sacarosa

Modificaciones en el medio E-1	Medios											
	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-8	E-9	E-10	E-11	E-12
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ g/l	0,23	0,23	0,23	0,23	0	0	0	0	0	0	0	0
NH_4NO_3 g/l	0	0	0	0	0,14	0	0,14	0,14	0,14	0	0	0
KNO_3 g/l	0	0	0	0	0	0,35	0	0	0	0,35	0,35	0,35
CaCO_3 g/l	0	0	5,0	5,0	0	0	0	5,0	5,0	0	5,0	5,0
FeCl_3 g/l	0	0,16	0	0,16	0	0	0,16	0	0,16	0,16	0	0,16
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g/l	0	0,05	0	0,05	0	0	0,05	0	0,05	0,05	0	0,05

(*) Composición: sacarosa, 10 g/l; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/l; K_2SO_4 , 0,015 g/l; agar, 20 g/l; y en cada caso, las sales que se indican en esta tabla.

Tabla 2. Producción de ácido cítrico (g/l) (*) por *A. niger* 44, después de 2 y 8 pases sucesivos sobre los medios de esporulación malta-agar y sintéticos

Inóculos	Medios de esporulación												
	M-A	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-8	E-9	E-10	E-11	E-12
Esporas I	50,4	56,2	59,2	62,1	62,1	59,8	57,4	60,3	63,2	60,9	61,5	63,8	60,9
Esporas III	53,3	63,2	63,2	68,5	67,4	62,1	60,9	62,7	68,5	66,2	60,9	65,6	65,0

(*) Cultivo superficial a 28 °C en el medio M-2 (utilizado en la selección de cepas): sacarosa inicial, 140 g/l; pH inicial, 4,5; periodo de incubación, 12 d. Inóculo: Esporas I, procedentes del 2.º pase en los medios detallados en la *tabla 1*. Esporas III, procedentes del 8.º pase en los mismos medios.

Tabla 3. Medios sintéticos de esporulación (*) con 20 g/l de sacarosa

Modifica- ciones en el medio E-13	M e d i o s											
	E-13	E-14	E-15	E-16	E-17	E-18	E-19	E-20	E-21	E-22	E-23	E-24
(NH ₄) ₂ SO ₄ g/l	0,47	0,47	0,47	0,47	0	0	0	0	0	0	0	0
NH ₄ NO ₃ g/l	0	0	0	0	0,28	0	0,28	0,28	0,28	0	0	0
KNO ₃ g/l	0	0	0	0	0	0,70	0	0	0	0,70	0,70	0,70
CaCO ₃ g/l	0	0	5	5	0	0	0	5	5	0	5	5
FeCl ₃ g/l	0	0,16	0	0,16	0	0	0,16	0	0,16	0,16	0	0,16
ZnSO ₄ · ·7H ₂ O g/l	0	0,05	0	0,05	0	0	0,05	0	0,05	0,05	0	0,05

(*) Composición: sacarosa, 20 g/l; NaH₂PO₄·2H₂O, 0,04 g/l; MgSO₄·7H₂O, 0,04 g/l; K₂SO₄, 0,03 g/l; agar, 20 g/l; y en cada caso, las sales que se indican en esta tabla.

Tabla 4. Producción de ácido cítrico (g/l) (*) por *A. niger* 44, después de 2 y 8 pases sucesivos sobre los medios de esporulación malta-agar y sintéticos con 20 g/l de sacarosa

Inóculos	Medios de esporulación												
	M-A	E-13	E-14	E-15	E-16	E-17	E-18	E-19	E-20	E-21	E-22	E-23	E-24
Esporas I	50,4	60,5	63,3	64,5	65,0	63,3	61,5	61,5	62,7	62,7	63,3	63,3	60,9
Esporas III	53,3	69,7	65,5	77,3	75,6	70,3	65,6	71,5	75,0	76,2	65,6	72,0	71,5

(*) Cultivo superficial a 28 °C en el medio M-2 (utilizado en la selección de cepas): sacarosa inicial, 140 g/l; pH inicial, 4,5; período de incubación, 12 d. Inóculo: Esporas I, procedentes del 2.º pase en los medios detallados en la *tabla 3*; Esporas III, procedentes del 8.º pase en los mismos medios.

Tabla 5. Medios sintéticos de esporulación (*) con 50 g/l de sacarosa

Modifica- ciones en el medio E-25	M e d i o s											
	E-25	E-26	E-27	E-28	E-29	E-30	E-31	E-32	E-33	E-34	E-35	E-36
(NH ₄) ₂ SO ₄ g/l	1,15	1,15	1,15	1,15	0	0	0	0	0	0	0	0
NH ₄ NO ₃ g/l	0	0	0	0	0,70	0	0,70	0,70	0,70	0	0	0
KNO ₃ g/l	0	0	0	0	0	1,80	0	0	0	1,80	1,80	1,80
CaCO ₃ g/l	0	0	5	5	0	0	0	5	5	0	5	5
FeCl ₃ g/l	0	0,16	0	0,16	0	0	0,16	0	0,16	0,16	0	0,16
ZnSO ₄ · ·7H ₂ O g/l	0	0,05	0	0,05	0	0	0,05	0	0,05	0,05	0	0,05

(*) Composición: sacarosa, 50 g/l; NaH₂PO₄·2H₂O, 0,010 g/l; MgSO₄·7H₂O, 0,010 g/l; K₂SO₄, 0,07 g/l; agar, 20 g/l; y en cada caso, las sales que se indican en esta tabla.

Tabla 6. Producción de ácido cítrico (g/l) (*) por *A. niger* 44, después de 2 y 8 pases sucesivos sobre los medios de esporulación malta-agar y sintéticos con 50 g/l de sacarosa

Inóculos	Medios de esporulación												
	M-A	E-25	E-26	E-27	E-28	E-29	E-30	E-31	E-32	E-33	E-34	E-35	E-36
Esporas I	50,4	55,0	57,4	61,5	60,9	51,5	54,5	57,4	60,9	60,3	56,8	59,1	61,5
Esporas III	53,3	55,0	57,4	62,1	61,5	56,2	54,5	57,4	61,5	60,4	59,1	59,1	62,1

(*) Cultivo superficial a 28 °C en el medio M-2 (utilizado en la selección de cepas): sacarosa inicial, 140 g/l; pH inicial, 4,5; período de incubación, 12 d. Inóculo: Esporas I, procedentes del 2.º pase en los medios detallados en la tabla 5; Esporas III, procedentes del 8.º pase en los mismos medios.

Tabla 7. Producción de ácido cítrico (*) en cultivos inoculados con Esporas III de *A. niger* 44, procedentes del 8.º pase sobre los diferentes medios de esporulación

Medios de esporulación	Acido cítrico g/l	Materia seca/micelio g	Materia reductora consumida g/l	Rendimiento (**) %
M-A	53,3	0,1800	79,0	67
E-13	69,7	0,3211	94,8	73
E-14	70,3	0,3102	92,0	76
E-15	75,6	0,3000	97,7	76
E-16	68,5	0,3010	92,9	73
E-17	71,4	0,3004	94,8	75
E-18	65,6	0,2221	99,6	65
E-19	77,3	0,3036	99,6	77
E-20	75,0	0,3100	97,7	76
E-21	72,0	0,3240	92,9	77
E-22	75,5	0,2910	97,7	77
E-23	76,1	0,3100	99,6	76
E-24	71,4	0,2513	100,6	74

(*) En cultivo superficial en el medio M-2. (**) Rendimiento en ácido cítrico sobre azúcar utilizado.

da en aquél (tabla 7), ya sea por necesitarse mayor periodo de adaptación al medio de fermentación M-2, o por contener aquel inóculo menor número de esporas, lo cual parece lo más probable al observarse visualmente que el moho esporulaba pobremente en el medio M-A, aunque sería necesario comprobarlo mediante recuento de esporas.

También se comprobó con esporas del 8º pase sobre los medios M-A y E-15 (tabla 8), que *Aspergillus niger* 44 conservaba su capacidad productora

de ácido cítrico si durante su almacenamiento se le daba pase cada 30 d sobre el mismo medio de procedencia, ya fuera éste el M-A o E-15. De lo contrario, y en ambos casos, la cepa disminuye su producción de ácido cítrico, observándose también menor producción de micelio en estos cultivos.

Medio de esporulación patata-glucosa-agar

Se ensayaron los medios patata-glucosa-agar, que es uno de los mu-

Tabla 8. Producción de ácido cítrico (*) en cultivos inoculados con Esporas III de *A. niger* 44, según las condiciones de almacenamiento de éstas

Condiciones de almacenamiento	Medios de esporulación	Acido cítrico g/l	Materia seca/micelio g
No almacenadas	M-A	53,3	0,1800
	E-15	75,6	0,3000
6 meses a 4 °C	M-A	38,6	0,1018
	E-15	57,4	0,2400
6 meses a 4 °C con pase mensual	M-A	51,3	0,1800
	E-15	75,0	0,3134

(*) Cultivo superficial sobre el medio M-2.

chos referidos en la bibliografía para conservar hongos, y el mismo adicinado de CaCO_3 (PGA-Ca), al comprobar que los medios sintéticos con 20 g/l de sacarosa, aunque aumentaron la productividad de *Aspergillus niger* 44 después de 8 pases sobre ellos, no le regeneraron, y tampoco conservaron la capacidad productora de ácido cítrico de las esporas del moho, desarrolladas y almacenadas sobre ellos, si no se las daba pase cada 30 d.

Aspergillus niger 44 recupera la productividad primitiva con 8 pases sobre los medios PGA y PGA-Ca. Ya desde el 2º pase de adaptación a ellos se ob-

serva mayor producción de ácido cítrico en los cultivos inoculados con esporas procedentes de estos medios (tabla 9), que en los inoculados con esporas desarrolladas en los medios M-A, y sintéticos con 20 g/l de sacarosa (tablas 2 y 7). Los medios PGA y PGA-Ca, además de ser buenos medios de esporulación, en los que *A. niger* 44 esporula abundantemente, conservan la capacidad productora de ácido cítrico de la cepa, aún en el caso de almacenar las esporas desarrolladas sobre ellos durante 6 meses sin darlas pases (tabla 9).

Tabla 9. Producción de ácido cítrico (*) de *A. niger* 44 después de 2 (Esporas I) y 8 pases (Esporas III) sobre los medios de esporulación M-A, PDA y PDA-Ca. Influencia de las condiciones de almacenamiento.

Inóculo	Medios de esporulación	Acido cítrico g/l	Materia seca/micelio g	Materia reducida consumida g/l	Rendimiento %
Esporas I	M-A	50,4	0,1799	68,0	69
	PGA	74,4	0,3000	94,5	78
	PGA-Ca	79,1	0,2804	96,8	81
Esporas III (**)	M-A	38,6	0,1018	61,2	63
	PGA	70,3	0,2711	94,8	74
	PGA-Ca	74,4	0,2809	92,6	80
Esporas III	M-A	53,3	0,1800	79,0	67
	PGA	80,3	0,2910	104,0	77
	PGA-Ca	85,5	0,3004	110,0	77

(*) Cultivo superficial sobre el medio M-2. (**) Inóculo directo de esporas que, después del 8º pase sobre los medios de esporulación detallados en esta tabla, han sido almacenadas sobre los mismos medios a 4 °C, 6 meses.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDERSON, J. G., and SMITH, J. E. 1971. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (Microcycle conidiation). J. Gen. Microbiol., 69, 185-97.
2. BROWN Y ZERBAN. 1941. Sugar analysis, 846-849, Ed. Wiley y Sons. Inc. New York.
3. CLARK, D. S.; ITO, K., and HORITSU, H. 1966. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation on molases. Biotechnol. Bioeng., 8, 465-71.
4. DOELGER, W. P., and PRESCOTT, S. C. 1934. Citric acid fermentation. Ind. Eng. Chem., 26, 1142-61.
5. GALBRAITH, J. C., and SMITH, J. E. 1969. Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. J. Gen. Microbiol., 59, 31-45.
6. HARRIGAN, W. F., and McCANCE. 1976. Methods in Food and Dairy Microbiology, 360. Ed. Academic Press.
7. JERNEJC, K.; CMERMAN, A., and PERDIH, A. 1982. Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 24-33.
8. KUBICEK, C. P., and ROHR, M. 1977. The influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 4, 167-75.
9. N. G., A. M. L.; SMITH, J. E., and MC INTOSH, A. F. 1973. Conidiation of *Aspergillus niger* in continuous culture. Arch. Microbiol., 88, 119-26.
10. SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A.; CARENNO, R., and LEDEZMA, M. 1970. Effect of trace elements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol., 20, 888-92.
11. SCHWEIGER, L. B. 1961. Production of citric acid by fermentation. US Pat. 2, 970,084.
12. SHU, P., and JOHSON, M. J. 1947. Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *Aspergillus niger* in submerged culture. J. Bacteriol., 54, 161-67.
13. SHU, P., and JOHSON, M. J. 1948. The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. J. Bacteriol., 56, 577-85.
14. SMITH, J. E., and GALBRAITH, J. C. 1971. Biochemical and physiological aspects of differentiation in the fungi. Advan. Microbial Physiol., 5, 134-45.
15. WOLD, W. S. M., and SUZUKY, I. 1976. The citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: regulation by zinc of growth and acidogenesis. Can. J. Microbiol., 22, 1083-92.

ESTUDIOS GENETICOS SOBRE LA CITOCROMO-C PEROXIDASA EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: POSIBLE INFLUENCIA DE FACTORES CITOPLASMATICOS

E. VALDIVIA, M. MAQUEDA y E. MONTTOYA

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

(Aceptado: 9 de mayo de 1985)

RESUMEN

El cruce de las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, X-3 (*try*₁, *his*₃) con niveles normales de peroxidasa, y R-6 (*ade*₁, *his*₂) carente de esta enzima, da lugar a cigotos cuyos niveles enzimáticos son superiores a los de las estirpes progenitoras. Aunque el análisis de la descendencia haploide de tres de estos cigotos parecía mostrar en principio una segregación 2:2, siendo las estirpes *ade*⁻ las que presentaban niveles más bajos de peroxidasa, la adición de adenina al medio de cultivo igualó la actividad de la enzima en todas las ascosporas del mismo cigoto, no apareciendo en ningún caso el fenotipo de la estirpe parental R-6, tratándose, pues, de una segregación 4:0.

Tal segregación apunta hacia una influencia de factores genéticos citoplasmáticos reguladores de los niveles de la peroxidasa en *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMMARY

Crossing *Saccharomyces cerevisiae* strain X-3 (*try*₁, *his*₃), which has normal levels of peroxidase, with strain R-6 (*ade*₁, *his*₂) which lacks this enzyme, yields zygotes having enzymatic levels that are higher those of both parental strains.

The analysis of the haploid descendance of three of these zygotes seemed at first sight a 2:2 segregation, having the strains *ade*⁻ the lowest levels of peroxidase. However addition of adenine to the culture medium equalized the enzymatic activity obtained in all the ascospores of the same zygote, and the phenotype of the parental strain R-6 could not be detected, implying a 4:0 segregation.

Such segregation points to the influence of cytoplasmic genetic factors which could act as regulators of the peroxidase levels in *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN

La citocromo-c-peroxidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (E. C. 1.11.1.5) cataliza la reacción del ferrocitocromo-c a ferricitocromo-c en presencia de peróxido de hidrógeno.

Esta enzima, descrita por primera vez por Altschul y cols. (1) es de naturaleza inducible, siendo su biosíntesis dependiente de factores culturales, tales como tensión de oxígeno y glucosa.

El mayor volumen de trabajo llevado a cabo sobre esta peroxidasa se ha referido a la determinación de su estructura (2,7-8,13), y mecanismo de acción (4,12,17,24).

La regulación de la biosíntesis de esta enzima ha sido también abordada por diversos investigadores (3,5-6,19) e igualmente en nuestro laboratorio se ha llevado a cabo una extensa investigación en este aspecto (6,22). De resultados de todos estos trabajos podemos concluir que la citocromo-c-peroxidasa es una hemoproteína, de localización preferentemente mitocondrial, cuyos niveles están influidos positivamente por la tensión de oxígeno y desfavorablemente por la glucosa, siendo la acción de estos dos factores independiente y no pareciendo ejercerse sobre la biosíntesis de la apoproteína, la cual está presente incluso en condiciones de anoxia (6), aunque sea precisa su unión al grupo hemo, sintetizado en condiciones aeróbicas, para dar lugar a la holoenzima activa.

La citocromo-c-peroxidasa es sintetizada como un precursor codificado por el ADN nuclear, el cual es procesado proteolíticamente a su forma madura durante o tras la traslocación a la mitocondria (15), localizándose finalmente en el espacio intermembranoso de la misma.

El estudio llevado a cabo con la estirpe R-6, mutante carente de catalasa y peroxidasa, mediante cruces con estirpes con niveles enzimáticos normales, apunta hacia una influencia de genes mitocondriales en la regulación de esta enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estirpes empleadas

Han sido empleadas las siguientes razas de la colección de nuestro Departamento: F1-27, (*a*, *rho*⁺, *ade*₁, *lys*₂) y X-3 (*α*, *rho*⁺, *try*₁, *his*₃). El mutante R-6 (*a*, *rho*⁺, *ade*₁, *lys*₂) ha sido obtenido a partir de la estirpe F1-27 mediante irradiación con luz UV (11).

Medios de cultivo

El medio NG (14) ha sido empleado como medio de mantenimiento y cultivo para determinación de los niveles de peroxidasa.

Medio de conjugación (MC) preparado de acuerdo con Fowell (9).

Medio de preesporulación (MPE), con la siguiente composición: glucosa 0,5 % y extracto de levadura 0,1 %.

Medio de esporulación (ME), según Rousseau y Halvorson (18).

Medio mínimo (MM), empleado para aislamiento de cigotos y estirpes protótrofas y comprobación del genotipo de estirpes auxótrofas. Hemos seguido las recomendaciones de Wickerham (23) empleando bacto yeast nitrogen base y/o aminoacid (Difco).

Los medios sólidos se obtuvieron añadiendo agar (Difco) al 2 %.

Todos los cultivos se incubaron a 28 °C y los cultivos líquidos se airearon en un agitador orbital Gallenkamp a 140 rpm.

Procedimientos. Los cruces se llevaron a cabo en medio líquido sin aireación, siguiendo la técnica descrita por

Fowell (9), seleccionando los cigotos ρ^+ protótrofos en medio mínimo MM.

La esporulación se obtuvo de acuerdo con el método de Rousseau y Halvorson (18).

Aislamiento de ascosporas. La disección de las ascas y aislamiento de las ascosporas se realizó con la ayuda de un micromanipulador Leitz.

El factor sexual se determinó mediante cruces con estirpes de factor sexual α o α , conocido.

Los marcadores nutricionales de las ascosporas fueron determinados en medio mínimo MM adicionado de los diferentes aminoácidos y/o bases implicados.

Determinación de la actividad peroxidásica. Las estirpes fueron inoculadas (5 %) en 100 ml del medio líquido NG e incubadas a 28 °C en agitación durante un tiempo tres veces el del final de la fase logarítmica. Las células, recogidas por centrifugación, fueron resuspendidas en 10 ml de tampón fosfato sódico-disódico 0,01 M pH 6,0, y posteriormente rotas por ultrasonidos en un emisor Branson Sonic Power B-12. La actividad peroxidásica de los homogeneizados se determinó espectrofotométricamente mediante la técnica de Valdivia y cols. (2) usando o-dianisidina como donador de electrones y expresando finalmente

dicha actividad en unidades de peroxidasa/g de peso seco del homogeneizado. (UP/g).

Actividad peroxidásica de las estirpes progenitoras R-6 y X-3 y de los cigotos obtenidos por cruce entre ellas

En la *tabla 1* se exponen los resultados obtenidos con las estirpes R-6 y X-3 y con sus cigotos 16-5, 2g y 3p, cuya capacidad respiratoria y genotipo se muestran igualmente.

Se ha empleado la estirpe R-6 por tratarse de un mutante carente de catalasa y peroxidasa, con un fenotipo típico de ρ^- incapaz de crecer en medios con fuente de carbono no fermentables, si bien, de acuerdo con su comportamiento en cruces con ρ^- de los que se originan cigotos ρ^+ , se deduce que posee un genotipo ρ^+ .

Actividad peroxidásica de la progenie haploide obtenida de los cigotos 16-5, 2g y 3p

De cada uno de los tres cigotos seleccionados se han aislado mediante micromanipulación dos series de ascosporas, determinándose la actividad peroxidásica junto con la auxotrofia y capacidad respiratoria de cada una de ellas. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 2*.

Tabla 1. Contenido en peroxidasa, genotipo y capacidad respiratoria de las estirpes progenitoras R-6 y X-3 y de los cigotos obtenidos por cruce entre ellas

Estirpe	Genotipo	Capacidad respiratoria	Contenido en peroxidasa UP/g
X-3	<i>try₁, his₃</i>	N	11,5
R-6	<i>ade₁, lis₂</i>	B	0,0
16-5	protótrofo	N	17,2
2g	protótrofo	N	15,4
3p	protótrofo	N	13,2

N, capacidad respiratoria normal. B, capacidad respiratoria baja.

Tabla 2. Contenido en peroxidasa, genotipo y capacidad respiratoria de los cigotos 16-5, 2g y 3p, y de sus ascosporas

Cigoto	Ascospora	Genotipo	Capacidad respiratoria	Contenido en peroxidasa UP/g
16,5		Protótrofo	N	17,2
	1-1	<i>ade₁, try₁</i>	N	10,1
	1-2	<i>lis₂, his₃</i>	N	11,9
	1-3	<i>ade₁, lis₂, try₁</i>	N	6,3
	1-4	<i>his₃</i>	N	12,0
	2-1	<i>ade₁, lis₂, try₁, his₃</i>	N	6,8
	2-2	protótrofo	N	15,3
	2-3	<i>ade₁, lis₂, try₁</i>	N	7,7
	2-4	<i>his₃</i>	N	15,2
2g		Protótrofo	N	15,4
	4-1	<i>ade₁, lis₂, try₁</i>	N	5,9
	4-2	<i>ade₁, try₁</i>	N	7,1
	4-3	<i>lis₂, his₃</i>	N	12,7
	4-4	<i>his₃</i>	N	11,6
	5-1	<i>lis₂, ade₁</i>	N	5,9
	5-2	<i>try₁</i>	N	12,9
	5-3	<i>ade₁, his₃</i>	N	7,0
	5-4	<i>lis₂, try₁, his₃</i>	N	12,2
3p		Protótrofo	N	13,2
	7-1	<i>lis₂, try₁, his₃</i>	N	14,1
	7-2	<i>ade₁, lis₂</i>	N	6,6
	7-3	<i>ade₃, his₃</i>	N	7,3
	7-4	<i>try₁</i>	N	13,7
	8-1	<i>ade₁, lis₂, his₃</i>	N	6,0
	8-2	<i>try₁</i>	N	11,9
	8-3	<i>ade₁, his₃</i>	N	7,7
	8-4	<i>lis₂, try₁</i>	N	9,7

N, capacidad respiratoria normal.

Influencia de la adenina en los medios de cultivo sobre la biosíntesis de peroxidasa en las estirpes auxótrofas para esta base

A la vista de los resultados mostrados en la *tabla 2* se puede comprobar que en todos los casos, de las 4 ascosporas procedentes de cada asca, las dos que son auxótrofas para la adenina presentan un contenido en peroxidasa sensiblemente inferior a las otras dos. Esta particularidad nos hizo pensar que las necesidades de adenina de las ascosporas *ade⁻* influyen en su capacidad biosintética de la peroxidasa.

Para verificar este punto, en primer

lugar se determinaron las concentraciones de adenina que había que adicionar al medio NG para que las ascosporas *ade⁻* creciesen en condiciones en que esta base no actuara como factor limitante del crecimiento.

Esta determinación se hizo en base a la particularidad que tienen los mutantes *ade⁻* de *Saccharomyces cerevisiae* de formar colonias de color rosa cuando crecen en medios deficientes en adenina, como consecuencia de la acumulación del intermediario de su biosíntesis allí donde está interrumpida la ruta biosintética, y de formar colonias blancas cuando crecen en me-

dios ricos en adenina, la cual actúa como inhibidor de la ruta biosintética en su primer paso, impidiendo así la acumulación de este pigmento de color rosado.

La determinación se hizo sembrando la estirpe F1-27, progenitora de la R-6, en placas de Petri con medio NG sólido adicionado de concentraciones crecientes de adenina, y determinando la concentración mínima que da lugar a la aparición de colonias de color blanco. Esta concentración fue de 40 µg/ml en el medio de cultivo.

Calculada esta concentración, se procedió a hacer una experiencia previa estudiando los niveles de peroxidasa de las estirpes X-3, F1-27 y R-6 cultivadas en las condiciones descritas anteriormente en medio NG, y después en medio NG adicionado de uno o dos de los marcadores correspondientes de cada estirpe, a la concentración de 20 µg/ml, excepto en el caso de la adenina que se adicionó a la concentración de 40 µg/ml.

Como se muestra en la *tabla 3*, mientras la adición de aminoácidos triptófano o histidina a la estirpe X-3 y la

adición de lisina a la estirpe F1-27 no afectó a los niveles de peroxidasa, la adición de adenina a esta última dio lugar a un incremento en su contenido en peroxidasa. Por el contrario, la adición al medio de cultivo de adenina o lisina no alteró los niveles indetectables de peroxidasa de la estirpe R-6.

Determinación del contenido en peroxidasa en los cigotos y ascosporas aislados del cruce entre las estirpes X-3 y R-6, cultivados en presencia de adenina

Vistos los resultados expuestos en la *tabla 3*, se procedió a determinar de

Tabla 4. Contenido en peroxidasa de los cigotos 16-5, 2g y 3p, y de sus ascosporas cultivadas en presencia de adenina

Cigoto	Ascosporas	Contenido en peroxidasa UP/g
16,5		17,2
	1-1	13,2
	1-2	11,9
	1-3	13,4
	1-4	12,0
	2-1	15,0
	2-2	15,3
	2-3	10,6
2g	2-4	15,2
		15,4
	4-1	14,1
	4-2	12,3
	4-3	12,7
	4-4	11,6
	5-1	11,5
	5-2	12,9
3p	5-3	11,6
	5-4	12,2
		13,2
	7-1	14,1
	7-2	16,6
	7-3	16,5
	7-4	13,7
	8-1	15,3
	8-2	11,9
	8-3	16,2
	8-4	9,7

Tabla 3. Contenido en peroxidasa de las estirpes X-3, F1-27 y R-6 cultivadas en medio NG adicionado de uno o dos de los marcadores correspondientes a cada estirpe

Estirpe	Marcador adicionado al medio	Contenido en peroxidasa UP/g
X-3	try, his	11,4
X-3	try	12,5
X-3	his	12,1
X-3		12,4
F1-27	ade, lis	12,3
F1-27	ade	12,6
F1-27	lis	9,7
F1-27		9,6
R-6	ade, lis	0,0
R-6	ade	0,0
R-6	lis	0,0
R-6		0,0

nuevo los niveles de peroxidasa en los cigotos y ascosporas aisladas del cruce entre las estirpes X-3 y R-6. La determinación se hizo en las mismas condiciones descritas anteriormente, con la única salvedad de que los medios en que se cultivaron las estirpes *ade*⁻ fueron adicionados de adenina a la concentración de 40 µg/ml.

El resultado fue que el contenido en peroxidasa de todas las ascosporas con fenotipo *ade*⁻ aumentó en esta segunda valoración, como se comprueba en la *tabla 4*, en la que se observa que ha desaparecido la segregación 2:2 de las 4 ascosporas de cada cigoto mostradas en las primeras determinaciones para alcanzar valores similares. Además, esta actividad es igual o mayor que la que presenta la estirpe progenitora X-3, sin que en ningún caso se haya encontrado el fenotipo de la estirpe progenitora R-6.

DISCUSIÓN

La citocromo-c-peroxidasa de *Saccharomyces cerevisiae* se localiza mayoritariamente en el espacio intermembranoso de las mitocondrias.

Esta enzima codificada por ADN nuclear es sintetizada como una precursora (15) de mayor tamaño, que es procesada a su forma madura durante o después de su traslado a la mitocondria.

Recientemente, Gasser *et al* (10) han propuesto un mecanismo de procesamiento en dos etapas, según el cual dicho precursor se une transitoriamente a la membrana interna de la mitocondria donde ocurre una primera proteólisis, siendo después liberada al espacio intermembranoso mediante una segunda proteólisis.

Aunque está demostrada la naturaleza nuclear de la citocromo-c-peroxi-

dasa, sin embargo no podemos descartar la influencia del genoma mitocondrial en la regulación de su biosíntesis, puesto que resultados obtenidos en nuestro laboratorio (20) revelan que los niveles de la enzima en células *rho*⁻, deficientes respiratorias, son sensiblemente menores que los de las células hermanas *rho*⁺, y aunque se puede inducir su síntesis, nunca se alcanzan valores semejantes.

Para profundizar en la naturaleza de esta regulación se han llevado a cabo las experiencias de cruce y análisis de las progenies expuestas en el capítulo anterior.

Cuando el mutante R-6 se cruzaba con una estirpe *rho*⁺, todos los cigotos mostraban una capacidad respiratoria normal y sus niveles de peroxidasa eran incluso superiores a los de las estirpes progenitoras. En la descendencia haploide de estos cigotos, ambos caracteres segregan en todos los casos en forma 4:0, segregación típicamente citoplasmática. Parece ser, por tanto, que, al menos en este mutante, la capacidad biosintética de la peroxidasa está regulada por factor(es) citoplasmático(s), determinante(s) en alguna forma de la capacidad respiratoria.

Ya en el terreno de la especulación, podríamos sugerir varios niveles de actuación para estos factores mitocondriales, bien regulando la síntesis del precursor de la apoproteína, o bien a nivel de la etapa proteolítica del precursor inactivo para dar la proteína madura. E incluso, a la vista del similar comportamiento de la estirpe R-6 respecto a los niveles de catalasa (11) y peroxidasa, y dado que ambas enzimas son de naturaleza hemoproteica, se podría pensar que la mutación de la estirpe R-6 pudiera afectar a la síntesis de dicho grupo hemo, o bien la incorporación de éste en la apoenzima, para dar la enzima activa.

En cuanto al incremento de actividad peroxidásica detectado al adicionar al medio de cultivo adenina a concentraciones a las que desaparece el color rosado de las células, podemos sugerir la siguiente explicación: la pigmentación rosada de las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* auxótrofas para la adenina, se debe al acúmulo de un intermediario de la síntesis de ésta, el polirribosilaminoimidazol. Este compuesto se acumula debido, probablemente, a que el medio, a pesar de ser completo, presente una cierta carencia en adenina; esto motivará que la ruta biosintética de esta base se encuentre activada permanentemente, ya que al verse interrumpida dicha ruta, no se obtiene su producto final: la adenina. Pensamos que esta circunstancia hace que, por una parte, el crecimiento de la población sea menor, como ocurre de hecho, y por otra, que la célula se vea privada de la glicocola que se gastará en este proceso y que es necesaria en otros muchos, tales como la biosíntesis del grupo hemo, molécula imprescindible en la síntesis de hemoproteínas, entre las que se encuentra la citocromo-c-peroxidasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALTSCHUL, A. M.; ABRAMS, R., and HOGNESS, T. R. 1940. Cytochrome-c-peroxidase. J. Biol. Chem., 136, 777-94.
2. ASAKURA, T.; KOBAYASHI, T., and CHANCE, B. 1974. Kinetic studies on the reaction between apocytochrome-c-peroxidase and protoporphyrin IX. J. Biol. Chem., 249 (6), 1799-1805.
3. AVERS, C. J. 1967. Distribución of cytochrome-c-peroxidase activity in wild-type and petite cells of baker's yeast grown aerobically and anaerobically. J. Bacteriol., 94 (4), 1225-35.
4. BEETLESTONES, J. 1960. Oxidation of cytochrome-c by cytochrome-c-peroxidase. Arch. Biochem. Biophys., 89, 35-40.
5. CHANTRENNE, H. 1955. Peroxidase induites par l'oxigen chez la levure. Biochim. Biophys. Acta, 18, 58-62.
6. DJAVADI-OHANIAN, L.; RUDIN, Y., and SCHATZ, G. 1978. Identification of enzymically inactive apocytochrome-c-peroxidase in anaerobically grown *S. cerevisiae*. J. Biol. Chem., 253 (12), 4402-07.
7. ELLFOLK, N. 1967 a. Cytochrome-c-peroxidase. II. The size and shape of cytochrome-c-peroxidase of baker's yeast. Acta Chem. Scand., 21, 1921-24.
8. ELLFOLK, N. 1967 b. Cytochrome-c-peroxidase. III. The aminoacid composition of cytochrome-c-peroxidase of baker's yeast. Acta. Chem. Scand., 21, 2736-42.
9. FOWELL, R. R. 1969. Sporulation and hybridization of yeast. En: A. H. ROSE and J. S. HARRISON. (eds.). The Yeasts. 1, 303-76. Academic Press, New York.
10. GASSER, S. M.; OHASHI, A.; DAUM, G.; BOHNI, P. C.; GIBSON, J.; REID, G. A.; YONETANI, R., and SCHATZ, G. 1982. Imported mitochondrial proteins cytochrome b_2 and cytochrome c_1 are processed in two steps. Proc Nat. Acad. Sci. US., 79, 267-71.
11. GONZÁLEZ, M. T., and MONTOYA, E. 1978. Preliminary studies on an (ρ^+) acatalasic strain of *S. cerevisiae*. Microbios Lett., 4, 205-10.
12. KANG, C. H.; SHELANGH, F. M., and MARGOLIASH, E. 1977. Steady state kinetics and binding of eucariotyc cytochrome-c with yeast cytochrome-c-peroxidase. J. Biol. Chem., 252(3), 919-26.
13. LEONARD, J., and YONETANI, T. 1974. Interaction of cytochrome-c-peroxidase with cytochrome-c. Biochemistry, 13(7), 1465-68.
14. LINDEGREEN, C. C.; NAGAI, S., and NAGAI, H. 1958. Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, cooper, cobalt and nickel. Nature, 182, 446-48.
15. MACCECCHINI, M. L.; RUDIN, I., and SCHATZ, G. 1979. Transport of protein across the mitochondrial outer Membrane. J. Biol. Chem., 254 (16), 7468-71.
16. MARTÍNEZ, J.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; ORTEGA, J. M., and MONTOYA, E. 1983. Regulation of catalase and peroxidase in *S. cerevisiae*. A plausible site of action of an intracellular regulatory factor. FEMS Microbiol. Lett. 18, 19-24.
17. MOCHAN, E., and NICHOLLS, P. 1971. Complex formation between cytochrome-c and cytochrome-c-peroxidase. Equilibrium and

- titration studied. Biochem. J., 121 (1), 69-82.
18. ROUSSEAU, P., and HALVORSON, H. O. 1969. Preparation and storage of single spores of *S. cerevisiae*. J. Bacteriol., 100, 1426-27.
 19. SELS, A., and COCRIAMONT, C. 1968. Induced conversion of a protein precursor into cytochrome-c-peroxidase during adaptation of yeast to oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 194-98.
 20. VALDIVIA, E. 1980. Estudios sobre las peroxidasas presentes en células de *S. cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
 21. VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ, J.; ORTEGA, J. M., and MONTOYA, E. 1983. Effect of 3-amine-1-2-4 triazole on the catalase activity of *S. cerevisiae*: a new procedure for cytochrome-c-peroxidase assay. Microbios, 37, 29-36.
 22. VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ, J.; ORTEGA, J. M., and MONTOYA, E. 1983. Control of catalase and peroxidase biosynthesis by carbon source and oxygen in the yeast *S. cerevisiae*. Can. J. Microbiol., 29, 1200-04.
 23. WICKERHAM, L. J. 1946. A critical evaluation of the nitrogen assimilation of test commonly used in the classification of yeast. J. Bacteriol., 52, 299-301.
 24. YONETANI, T., and RAY, G. S. 1966. Cytochrome-c-peroxidase III. Kinetics of the peroxidation oxidation of ferrocytochrome-c catalyzed by cytochrome-c-peroxidase. J. Biol. Chem., 241, 700-06.

EFFECT OF GLUCOSE ON TREHALOSE MOBILIZATION IN *CANDIDA UTILIS*

J. C. ARGÜELLES, J. VICENTE and M. GACTO

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia

(Aceptado: 6 de marzo de 1985)

SUMMARY

Exponentially growing cells of *Candida utilis* contain less endogenous trehalose than stationary phase cells. The lower levels of stored trehalose in actively growing cells are due not only to decreased trehalose synthesis but also to increased catabolism of the reserve disaccharide. Glucose appears to be involved in the regulation of the two pathways that determine net trehalose accumulation: this sugar inhibits trehalose synthase activity (EC 2.4.1.15) *in vitro* and simultaneously activates trehalose hydrolase activity (EC 3.2.1.28) *in vivo*.

RESUMEN

Células exponenciales de *Candida utilis* contienen menos trehalosa endógena que células estacionarias. El descenso de trehalosa acumulada en células exponenciales se debe, no sólo a una menor síntesis de este disacárido, sino también a un mayor catabolismo. La glucosa parece regular simultáneamente las dos rutas que determinan la acumulación neta de trehalosa: esta hexosa inhibe la trehalosa-sintetasa (EC 2.4.1.15) *in vitro* y activa la trehalasa (EC 3.2.1.28) *in vivo*.

INTRODUCTION

The non reducing disaccharide trehalose is the main carbohydrate reserve in yeast and filamentous fungi (8, 11). Various physiological processes, such as initiation of growth, are associated to the utilization of this endogenous sugar by yeast cells (11). It was

firstly suggested that the accumulation of trehalose mainly occurs in the non proliferative stages of growth when there is a limitation of carbon source in the medium (9). More recently, however, it has been shown that the intracellular synthesis of trehalose is a general mechanism in response to any

nutritional limitation in the culture medium (3, 11).

The *in vivo* storage of trehalose depends upon the balance in the activities of two key enzymes: trehalose synthase and trehalose hydrolase (trehalase). In some yeast species a cryptic and an activated trehalase have been described which are reversible, interconvertible forms through a process of phosphorylation and dephosphorylation (7, 11). These alternative forms show different catalytic properties and regulation (5, 7). Although many studies deal with the control of trehalase function very few is known, in contrast, on the trehalose synthase activity in yeast cells (1).

In this study trehalose mobilization has been analyzed during the growth of *Candida utilis* and evidences are presented on the existence of a regulatory mechanism which might simultaneously control the synthetic and degradative pathways of this reserve carbohydrate.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strain, culture conditions and enzyme preparations

Candida utilis CECT 1061 was obtained from the Colección Española de Cultivos Tipo and cultured in liquid Winge's medium (2 % glucose; 0.3 % yeast extract) by incubation at 30 °C and 150 rpm in a Lab-Line orbital shaker. Growth was followed by measuring optical density at 600 nm or by cell counting with a haemocytometer.

To prepare cell extracts the cells were collected at different stages of growth washed twice in distilled water and resuspended in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.6. The cell suspensions were disrupted for 1 min with

glass beads (0.45-0.60 μm) in a Braun MSK homogenizer with coupled cooling to minimize enzyme inactivation. More than 90 % of the cells were broken by this procedure as judged by phase contrast microscopy. The cell extracts were centrifuged at 18,000 $\times g$ during 20 min in a Sorvall RC-5B centrifuge and the removed supernatants were directly used for enzyme determinations. Neither trehalose synthase nor trehalase activities were present at significant levels in the particulate fractions that were discarded.

Enzyme determinations

Trehalose synthase activity was determined by the method of Cabib and Leloir (1). Essentially, the reaction mixtures contained in a final volume of 0.2 ml: 0.5 μmol UDP-glucose, 1 μmol glucose-6-P, 0.6 μmol MgCl_2 , 5 μmol 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and the appropriate amount of the cell free supernatant (1-1.5 mg protein). After incubation at 30 °C for various lengths of time the reactions were stopped by adding 50 μl of 1 N HCl and heating at 100 °C for 15 min. The acid hydrolyzed samples were then subjected to alkaline treatment by adding 0.3 ml of 2 % NaOH and heating again at 100 °C for 15 min. Under the stated conditions trehalose is the only soluble carbohydrate component that does not result chemically degraded (2). The remaining carbohydrate was thereafter measured as sugar by the anthrone method according to Stewart (10).

A unit of trehalose synthase activity was defined as the amount of enzyme able to form 1 nmol of trehalose/min under the assay conditions. Controls to account for the endogenous trehalose present in the enzyme preparations at zero time were also analyzed.

Trehalase activity was estimated by measuring the glucose released from trehalose by the glucose oxidase method (4). Standard assays contained in a final volume of 0.5 ml: 50 μ moles trehalose, 50 μ moles 100 mM acetate buffer pH 5.6 and enzyme preparation (1-1.5 mg protein). The assays were incubated at 30 °C and the reactions stopped at various times by placing the samples for 2 min in a boiling water bath. Permeabilized cells, instead of cell free supernatants, were used as source of trehalase in some experiments; in these cases, the cell suspensions were treated with 10 % toluene-ethanol (1:9, v/v) prior to the enzyme assays. Trehalase activity in whole permeabilized cells was about 30 % of that obtained by the cell breakage method.

A unit of trehalase was able to release 1 nmol of glucose/min under the stated conditions. In all instances, controls were run to determine potential autohydrolysis or interference in the analyzed reactions.

Other assays

Glucose concentration in the culture fluids was measured by the glucose oxidase method as indicated above. Protein measurement was performed by the method of Lowry *et al* (6) using bovine serum albumin as standard. Endogenous trehalose was extracted from the cells and measured as described by Stewart (10).

Chemicals

Glucose oxidase (EC 1.1.3.4), peroxidase (EC 1.11.1.7), o-dianisidine and 2-deoxyglucose were obtained from Sigma Chemical Co. UDP-glucose and glucose-6-P were from Boehringer Mannheim. All other products from commercial origin were of analytical grade.

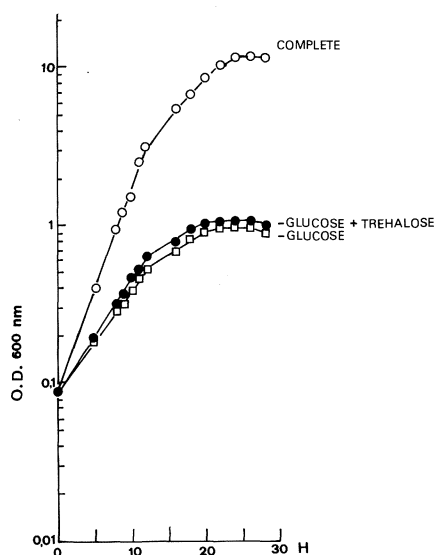


Figure 1. Growth of *C. utilis* in complete Winge's medium (O; 2% glucose, 0.3% yeast extract), in the same medium without glucose plus 2% trehalose (●) and in medium containing only 0.3% yeast extract (□)

RESULTS

Whole cells of *Candida utilis* lack periplasmic trehalase activity when assayed as indicated in Materials and Methods. In addition, these cells do not grown on exogenous trehalose as sole external carbon source (figure 1). Since trehalase activity becomes quite apparent when cell extracts of broken cells are assayed instead of intact cells, it seems that the inability to use external trehalose is due to the fact that the disaccharide is not efficiently transported into the cells.

In contrast, the cells are able to carry out intracellular synthesis and accumulation of trehalose. The amount of endogenous disaccharide varies as a function of the growth stage in the

Table 1. Trehalose content and specific activities of trehalose synthase and trehalase in exponential and stationary-phase cells of *C. utilis*

Phase cells	Glucose in the medium (*)	Trehalose (**)	Trehalose-synthase ⁺ (***)	Trehalase (***)
Exponential-phase cells (O. D. = 3.0)	16.6	67.7	2.8	21.5
Stationary-phase cells (O. D. = 11.0)	2.9	182.7	19.9	5.3

(*) mg glucose/ml. (**) nmol/10¹⁰ cells. (***) units/mg protein.

culture, as shown in table 1. When the trehalose content is determined in exponentially growing cells and compared to that of stationary phase cells the results indicate that the concentration of this sugar increases as the cells enter the stationary phase of growth. Trehalose accumulation occurs in parallel to a decline of glucose concentration in the culture medium.

Table 1 also shows the results obtained on trehalose synthase and trehalase activities both in exponentially and stationary phase cells. These data reveal that the decreased glucose levels in the culture medium at the stationary phase correlate with a notable increase of the trehalose synthase activity and with a concomitant decrease of trehalase in the cells. Conversely, the high glucose levels at the log phase of growth appear to determine a low synthase activity and a high hydrolase activity which, in turn, strongly influence the amount of stored trehalose.

Since the above observations suggested that a glucose effect might be responsible for the control of trehalose mobilization, the influence of that hexose on the enzymatic synthesis and hydrolysis of trehalose was separately analyzed. To establish the effect on the trehalose synthase activity, assays were performed in the presence of various glucose concentrations added

to the reaction mixtures as indicated in the Materials and Methods section. The addition of glucose significantly inhibited the incorporation of the precursors UDP-glucose and glucose-6-P into trehalose (figure 2), irrespective of whether the enzyme preparations were obtained from growing or non growing yeast cells.

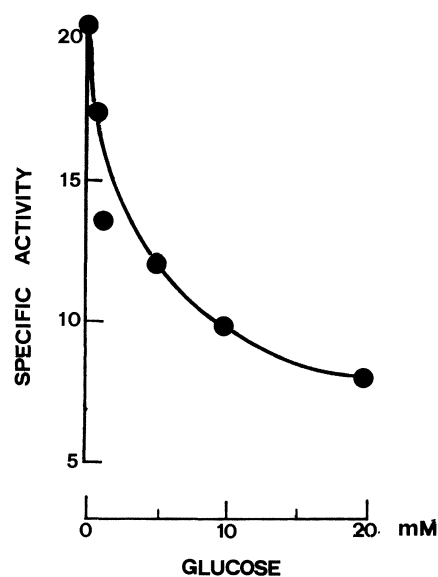


Figure 2. Effect of glucose on the trehalose synthase activity of stationary-phase cells. Enzyme assays were performed as indicated in Materials and methods. Ordinate scale is labelled as specific activity (enzyme units/mg protein) under assay conditions at various glucose concentrations

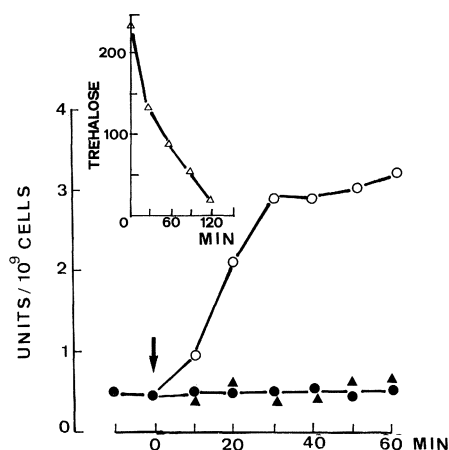


Figure 3. Effect of the addition of glucose and the analogue 2-deoxyglucose on the trehalase activity of stationary-phase cells. One 300 ml stationary culture was divided into three flasks and maintained at 30 °C with no addition (●), addition of 1% glucose (○) or 1% 2-deoxyglucose (▲) in the presence of cycloheximide, 50 µg/ml. At various times after addition (arrow) the enzyme was assayed in toluenized cells. Upper insert shows trehalose mobilization (Δ) in nmol/10¹⁰ cells after glucose addition

On the other hand, the addition of glucose to resting cultures prompted a marked increase in the trehalase activity of the cells which was accompanied by a rapid *in vivo* decrease of the trehalose accumulated (figure 3). This activation by glucose was evident even in nitrogen-deficient medium and under conditions in which protein synthesis by the cells was blocked by the presence of cycloheximide. Trehalase activation, however, was not achieved by the sugar analogue 2-deoxyglucose.

DISCUSSION

The results summarized above fit into the model proposed in figure 4 in which glucose activates trehalase through a covalent modification and simultaneously inhibits trehalose syn-

thase in a direct fashion. This interpretation is in agreement with observations made by other authors and explain that trehalose concentration is lower in growing cells as compared to resting cells (11).

Trehalose synthase forms trehalose-6-P according to the initial reaction shown in the proposed scheme. The primary product of trehalose synthase activity is subsequently dephosphorylated to trehalose (1-2). Although in other biological systems GDP-glucose acts as a glucose donor alternative to UDP-glucose, its involvement in trehalose synthesis by yeast cells as never been demonstrated (2). The hydrolytic cleavage of the stored trehalose by action of the trehalase enzyme mobilizes in certain physiological conditions the reserve carbohydrate to yield glucose. Those conditions are, among others, trehalase activation by glucose.

It has been previously shown that glucose can activate trehalase by phosphorylation of the enzyme mediated by ATP and a protein kinase which is

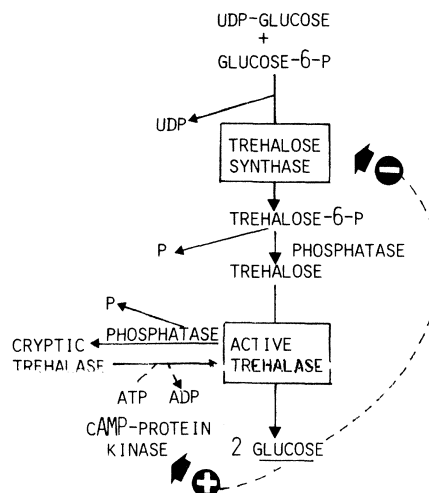


Figure 4. Regulation of trehalose mobilization by glucose. +, indirect activation. -, direct inhibition. For more explanation, see text

dependent on cAMP (5, 7, 11-12). Addition of glucose to resting cells raises the intracellular level of cAMP and allows cellular protein kinase to activate trehalase. In our conditions, the increase shown in trehalase activity by addition of glucose is not due to a parallel increase in cell number because the Winge's medium employed for these studies becomes depleted of nitrogen source after the log phase of culture and this deficiency is the limiting factor for cell growth. Moreover, trehalase activation by glucose does not require *de novo* synthesis of protein since the levels of enzyme activity are increased in the presence of cycloheximide. Therefore, it seems that trehalase activation by glucose is in fact due to a postranslational modification of a preformed, cryptic enzyme.

It is interesting to remark that the lower concentration of trehalose in exponentially growing cells is not only the consequence of trehalase activation but also of a decreased synthesis. The results in *table 1* and those in *figures 2-3* indicate that both mechanisms appear to be simultaneously operative. The partial inhibition of trehalose synthase activity by glucose had not been mentioned earlier as a mechanism underlying the control of trehalose mobilization in yeast cells (11).

Our results do not exclude existence of other regulatory systems superimposed to that described, such as catabolite repression of the trehalose synthase by glucose or modification of the studied activities by other effectors. Rather, they suggest that other nutrients with common pathways to glucose might probably develop the same effect on trehalose activation by generating a common intermediate (cAMP?); if so, as a consequence of trehalase activation, the intracellular glucose released from the endogenous

reserve would, in turn, locally restrain, at least in part, the resynthesis of the disaccharide by trehalose synthase inhibition. 2-deoxyglucose, a glucose analogue which is not metabolized as the original hexose, fails to induce trehalose mobilization (*figure 3*).

In summary, it appears that when glucose concentration in the culture medium of yeast cells is high the trehalase remains mainly in its activated form while trehalose synthase is partially blocked. Then, as the cultures grow, glucose decreases and the previous state is in part reversed; trehalose synthase becomes more functional and trehalase is being converted to its cryptic form by cellular phosphatases. Consequently, the intracellular trehalose content is low in the presence of glucose, during the log phase, and later increases at the stationary phase as long as the culture nutrients are able to maintain the precursor pools needed for the synthesis of the disaccharide.

REFERENCES

1. CABIB, E., and LELOIR, L. F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.*, 231, 259-75.
2. ELBEIN, A. D. 1967. Carbohydrate metabolism in streptomycetes. II. Isolation and enzymatic synthesis of trehalose. *J. Bacteriol.*, 94, 1520-24.
3. LILLIE, S. H., and PRINGLE, J. R. 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.*, 143, 1384-94.
4. LLOYD, J. B., and WHELAN, W. J. 1969. An improved method for enzymic determination of glucose. *Anal. Biochem.*, 30, 467-70.
5. LONDESBOROUGH, J., and VARIMO, K. 1984. Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.*, 219, 511-18.
6. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. Protein mea-

- surement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-75.
7. ORTIZ, C. H.; MAIA, J. C. C.; TENAN, N. N.; BRAZPADRAO, G. R.; MATTOON, J. R., and PANEK, A. D. 1983. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. J. Bacteriol., 153, 644-51.
 8. PANEK, A. D. 1962. Synthesis of trehalose in baker's yeast. Arch. Biochem. Biophys., 98, 349-55.
 9. PANEK, A. D., and MATTOON, J. R. 1977. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys., 183, 306-16.
 10. STEWART, P. R. 1975. Analytical methods for yeasts. In: D. M. PRESCOTT (ed.). Methods in Cell Biology, 12, 111-147. Academic Press, New York.
 11. THEVELEIN, J. M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev., 48, 42-59.
 12. THEVELEIN, J. M., and JONES, K. A. 1983. Reversibility characteristics of glucose induced trehalase activation associated with the breaking of dormancy in yeast ascospores. Eur. J. Biochem., 136, 583-87.

CRITERIOS DE SELECCION DE CEPAS DE LEVADURA PARA UN PROCESO CONTINUO DE FERMENTACION ALCOHOLICA

J. TABERA, M. A. IZNAOLA, I. SCHNABEL y J. GARRIDO

U.E.I. de Tecnología de las Fermentaciones y Bioingeniería, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Arganda del Rey (Madrid)

(Aceptado: 25 de abril de 1985)

RESUMEN

Se estudian 8 cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* para su utilización en un proceso continuo de fermentación alcohólica con reciclado de biomasa por sedimentación. Se evalúan las cepas atendiendo a su capacidad de floculación y su velocidad de fermentación, estableciendo un criterio específico para su aplicación en procesos continuos.

SUMMARY

Eight different strains of *Saccharomyces cerevisiae* for a continuous process of alcoholic fermentation with cell recycle by sedimentation were studied. Strains were evaluated taking into account their flocculation ability and fermentation rate, thus a specific criterion for application in continuous processes was established.

INTRODUCCIÓN

Un proceso de fermentación alcohólica alimentado continuamente con mosto fresco y de cuyo efluente, también continuo, se separa la mayor parte de la levadura para introducirla de nuevo en el fermentador, se denomina fermentación alcohólica continua con reciclado de biomasa. La sedimentación es una de las posibles alternativas para separar la levadura y, en este

caso, la elección de una cepa adecuada para un proceso de tal naturaleza ha de contemplar, tanto su velocidad de fermentación, que condicionará la alimentación, como su capacidad de floculación, factor clave para el reciclado.

La selección de cepas atendiendo a la velocidad de la fermentación se realiza habitualmente mediante ensayos en discontinuo. La cepa de mayor velocidad de fermentación será aquella

que transforme el substrato en alcohol en menos tiempo, y su curva, concentración de etanol-tiempo de cultivo, será la de mayor pendiente global. Este es el criterio que se viene utilizando para la selección (1, 5, 10, 15), aún cuando la levadura se vaya a utilizar en proceso continuo.

El tiempo empleado por una levadura para alcanzar una determinada concentración de alcohol es fundamental en procesos discontinuos, pero irrelevante en uno continuo, para el cual lo que cuenta es qué velocidad de fermentación va a tener en el intervalo de concentración de alcohol característico del mismo. En estos casos habrá que utilizar un criterio de selección distinto del citado, basado en los mismos ensayos de fermentación en discontinuo, pero restringiendo el estudio comparativo de las cepas al intervalo de concentración de alcohol propio del continuo con que se va a trabajar. Lo que ocurra fuera de este intervalo carece de interés para nuestro proceso.

El efecto inhibidor del alcohol sobre la cinética de la fermentación se ha estudiado en numerosos trabajos (2-3, 7, 14), en los que se establecen expresiones matemáticas que relacionan la velocidad de formación de alcohol con su concentración. Estas expresiones incluyen unas constantes de ajuste, características de cada levadura, que hacen que las curvas de fermentación de dos cepas, aún conservando el mismo aspecto general, sean diferentes. Como consecuencia, el hecho de que una levadura tenga mayor velocidad de fermentación que otra para una determinada concentración de alcohol, no garantiza que sea así para otras concentraciones; la diferente tolerancia al etanol puede invertir el orden de las pendientes haciendo que las curvas se corten, lo que justifi-

ca lo dicho en el párrafo anterior.

Por otra parte, una levadura con una buena capacidad de floculación facilitará su recuperación por sedimentación, base del reciclado. La determinación de la capacidad de floculación debería realizarse en las mismas condiciones que van a existir en el proceso continuo, dado que aquélla se ve notablemente afectada por numerosos factores, tanto de tipo microbiológico como ambiental (4, 6, 9, 17). Cuando esto no sea posible, habrá que recurrir a métodos normalizados para la determinación de la floculencia (8, 13).

El objetivo de este trabajo es seleccionar una levadura adecuada para el proceso de fermentación alcohólica continua con reciclado de biomasa por sedimentación, que estamos desarrollando en el Instituto de Fermentaciones Industriales (16), estableciendo unos criterios que puedan ser válidos para procesos similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se han utilizado 8 cepas de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales: 87, 159, 556, LV, MC, SV, V-1 y V-2.

Medios de cultivo

a) Para obtención de biomasa:

a1) Mosto de melaza de remolacha con 60 g/l de sacarosa Clerget, suplementado con 0,5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y ajustado a pH 4,5 con H_2SO_4 .

a2) Medio sintético constituido por 20 g/l de glucosa anhidra, 5 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de terramicina.

b) Para ensayos de velocidad de fermentación:

Mosto de melaza de remolacha con 120 g/l de sacarosa Clerget, suplementado con 0,5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y ajustado a pH 4,5 con H_2SO_4 . Es el mismo mosto utilizado en el proceso continuo IFI.

Desarrollo celular

Se lleva a cabo en recipientes agitados y aireados, esterilizados en autoclave, 20 min a 1 atm, junto con el medio de cultivo. Se utiliza el medio de cultivo a1 ó a2, según que la levadura obtenida se vaya a emplear en ensayos de velocidad de fermentación o capacidad de floculación respectivamente. El cultivo se realiza a 30 °C durante 72 h, al cabo de las cuales se recoge la biomasa, en forma de pasta, por centrifugación en condiciones estériles, 20 min a 3.000 rpm. Después de un lavado con solución Ringer, se realiza una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Sobre las pastas de levadura así obtenidas, se hacen determinaciones de humedad para establecer la relación materia seca-materia húmeda.

Métodos analíticos

a) Sacarosa Clerget: método de la doble polarización de Clerget-Hertzfeld (12).

b) Concentración de etanol: determinación del grado alcohólico (%v/v) con el alcohómetro de Gay-Lussac (12).

c) Humedad de las pastas: en un pesasustancias, previamente tarado, se toman aproximadamente 0,3 g de pasta húmeda. Se pesa en balanza de precisión y se mantiene en estufa a 105

°C durante 12 h. Se enfría en desecador y se vuelve a pesar. Con las diferencias entre los pesos y la tara se establece la relación materia seca-materia húmeda.

Ensayos de velocidad de fermentación

En matraces de 1.000 ml de capacidad se ponen 500 ml de medio de cultivo b, esterilizándolos en autoclave a 1 atm durante 20 min. Se inoculan los matraces, en condiciones estériles, con 1 g/l (materia seca) de levadura, se tapan con válvulas Mueller, se pesan en granatario y se mantienen en estufa de cultivo, sin agitación, a 30 °C. Se sigue el desarrollo de la fermentación pesando los matraces a intervalos regulares de tiempo y determinando el CO_2 desprendido por diferencia entre el peso del matraz recién inoculado y el obtenido en cada pesada, ΔW . De acuerdo con la ecuación de Gay-Lussac, el peso de CO_2 desprendido está en relación directa con la concentración de alcohol alcanzada.

Se realizan 6 ensayos de velocidad de fermentación, en idénticas condiciones, para cada una de las 8 cepas.

Ensayos de capacidad de floculación

Se ha seguido el método de Helm y cols. modificado (13) que consiste en seguir la evolución con el tiempo del volumen de la zona clarificada de una suspensión de levadura de 1,15 g/l (materia seca) tamponada a pH 4,8 y mantenida a 20 °C. Con cada una de las cepas se realizan 2 ensayos en idénticas condiciones, leyéndose los volúmenes de líquido clarificado cada 30 min durante un total de 3 h. Se representa volumen frente a tiempo, siendo el coeficiente de floculación la pendiente inicial de la curva.

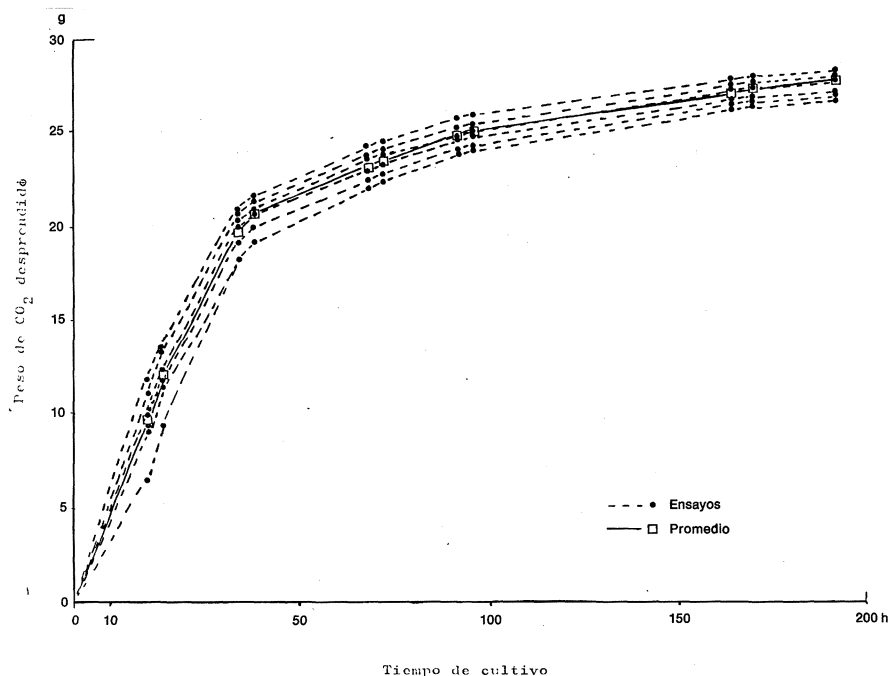


Figura 1. Curvas de fermentación de la cepa 556

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Velocidad de fermentación

En la figura 1 se representan, frente al tiempo de cultivo, los pesos de CO_2 desprendido (ΔW) a lo largo de las 6 pruebas de fermentación realizadas con la cepa 556. También se representa la curva de fermentación promedio, construida con los valores medios de ΔW y que se considera representativa de la cepa.

Procediendo del mismo modo con las demás cepas se obtienen las 8 curvas de fermentación promedio que constituyen la figura 2. Sobre estas curvas se aplicaría el criterio habitual de selección, considerando más rápida la cepa que consiga llegar a la concen-

tración de alcohol deseada en menos tiempo. Como consecuencia de los diferentes comportamientos individuales puede observarse que se producen varios cruces entre las curvas, por lo que resulta necesario definir la concentración de alcohol para la que se va a establecer la comparación.

De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos para el proceso IFI (16), el intervalo de concentración de etanol 6,1-7,1 °GL resulta adecuado para estudiar la velocidad de fermentación de las cepas a utilizar en él. Para relacionar concentración de etanol con peso de CO_2 desprendido se han realizado 18 determinaciones de grado alcohólico en los matraces de fermentación de las distintas cepas, llegándose a la relación $^{\circ}\text{GL}/\Delta W = 0,254$,

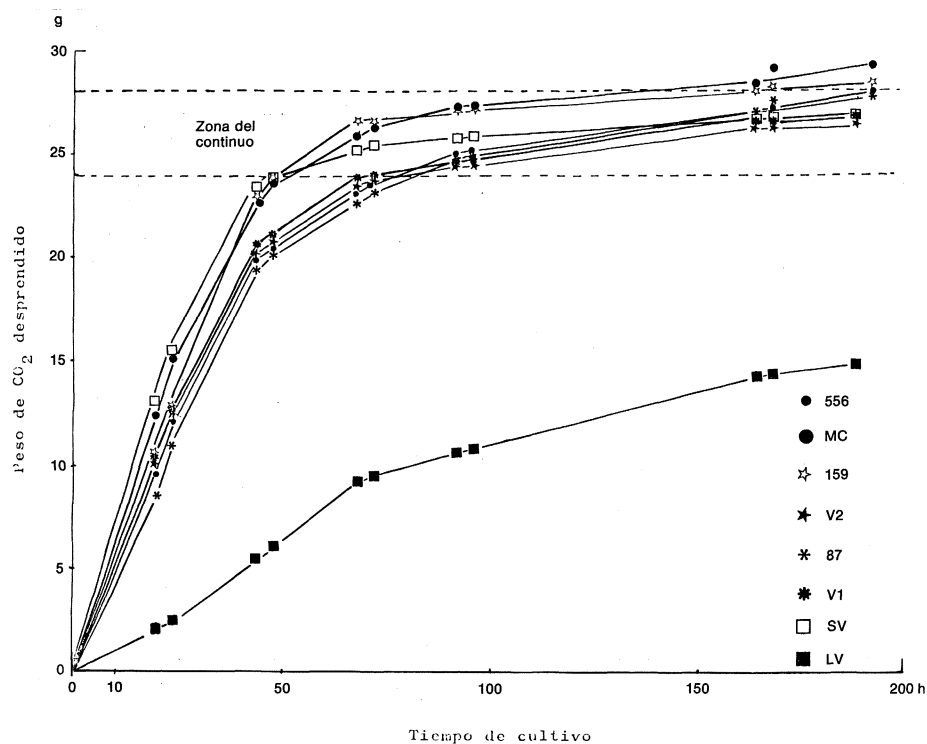


Figura 2. Curvas de fermentación promedio de las ocho cepas ensayadas

con desviación típica 0,0096 y coeficiente de variación 3,8 %, lo que indica muy poca dispersión en los datos. Según esta relación, el intervalo de estudio 6,1-7,1 °GL, corresponde a $\Delta W = 24-28$ g que está marcado en la figura 2 con dos líneas horizontales.

De acuerdo con todo lo anterior, la cepa más rápida en llegar al principio de la zona del continuo sería la 159, seguida de la SV y la MC, circunstancia que, como ya se dijo, carece de significado para el proceso continuo. La velocidad de fermentación depende de la concentración de alcohol existente en el medio y deberá ser considerada en función de ésta y no del tiempo de cultivo. En un cultivo en discontinuo,

ambas variables evolucionan conjuntamente, pero esto no ocurre en un continuo, para el que es necesario relacionar directamente velocidad de fermentación y concentración de alcohol.

Esto puede hacerse con notables ventajas si se dispone de una expresión analítica para las curvas de fermentación. Para ello se ha utilizado un programa de cálculo por ordenador (11) que realiza el ajuste de una curva teórica a una distribución de datos experimentales modificando, en aproximaciones sucesivas, los valores de los parámetros de la curva teórica. Los mejores resultados con las 8 curvas de fermentación se obtienen para

Tabla 1. Valores de los parámetros de ajuste para las distintas cepas

Parámetros	Cepas							
	159	MC	556	87	V1	V2	SV	LV
b_1	2,34	2,08	1,26	1,13	1,59	1,49	3,19	0,21
b_3	0,076	0,066	0,040	0,035	0,054	0,051	0,113	0,009

una ecuación del tipo:

$$\Delta W = b_1 t / (1 + b_2 t) \quad [1]$$

donde t es el tiempo de cultivo y b_1 y b_2 son los parámetros de ajuste de la curva teórica, propios de cada cepa, cuyos valores se dan en la tabla 1.

Como ejemplo de la precisión obtenida en el ajuste se comparan, en la

figura 3, las curvas experimental y teórica para la cepa 556.

Derivando la ecuación 1 respecto al tiempo resulta:

$$d\Delta W/dt = b_1 / (1 + b_2 t)^2 \quad [2]$$

de la que podemos obtener, despe-

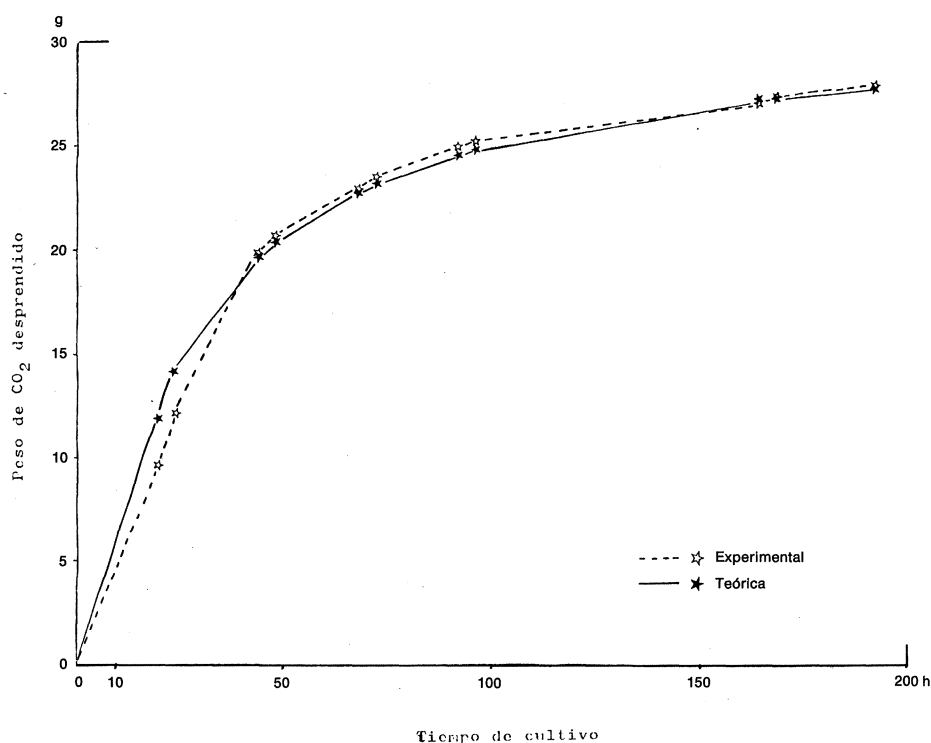


Figura 3. Ajuste de los datos experimentales de la cepa 556 a la ecuación 1. $b_1 = 1,26$; $b_2 = 0,040$

jando t en la ecuación 1 y sustituyendo:

$$\frac{d\Delta W}{dt} = b_1 + \Delta W[(b_2/b_1)\Delta W - 2b_2] \quad [3]$$

ecuación que, utilizando la relación $^{\circ}\text{GL}/\Delta W = 0,254$, queda como:

$$\frac{dP}{dt} = 0,254b_1 + P[(b_2/b_1)3,937P - 2b_2] \quad [4]$$

que describe la cinética de la formación de alcohol en función de la concentración de éste, y donde P es la concentración de alcohol expresada en $^{\circ}\text{GL}$.

Representando esta ecuación para cada cepa dentro del intervalo de concentración de alcohol que nos interesa estudiar, obtenemos las curvas de velocidad de fermentación de la figura 4. No existe curva para la LV, desechada por no tener suficiente poder fermenta-

tativo, como se deduce de la figura 2, donde puede verse que no llega a alcanzar la zona del continuo. En la figura 4, las velocidades de fermentación ya no están representadas por las pendientes, sino por las ordenadas de los puntos considerados. Ahora la comparación entre cepas puede hacerse más fácilmente. Obsérvese que al principio de la zona de continuo ($P=6,1^{\circ}\text{GL}$), la máxima velocidad de fermentación corresponde a la cepa MC, seguida de la 159 y la 87, orden distinto del que se dedujo de la figura 2, aplicando el criterio habitual. Esto es consecuencia de haber sustituido el tiempo de cultivo por la concentración de alcohol como base de comparación con más claro significado fisiológico.

También se manifiesta con mucha claridad en la figura 4 el efecto inhibi-

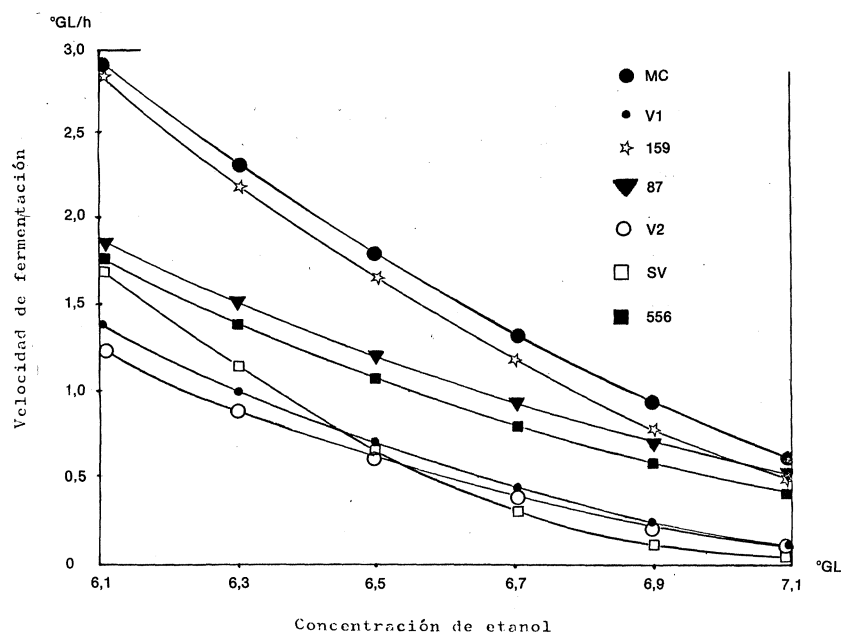


Figura 4. Velocidades de fermentación calculadas mediante la ecuación 4. Zona del continuo

dor del alcohol, distinto para cada cepa y que puede obligar a una redefinición de la zona de trabajo. Así, la cepa SV es más rápida que la V1 al principio de la zona, situación que se invierte al final de la misma como consecuencia de una mayor inhibición (pendiente más acusada) sobre SV. Es evidente que la zona 6, 1-7, 1 °GL no es adecuada para elegir entre ambas cepas. En caso de tener que hacerlo, habría que reconsiderar el intervalo de trabajo situando uno de sus límites en el punto de corte de ambas curvas.

El criterio de selección así establecido es más riguroso y seguro que el habitual y puede ser válido para otros procesos continuos.

De todo lo anterior concluimos que la cepa más adecuada, atendiendo a su velocidad de fermentación, para el proceso de fermentación continua del IFI es la MC, seguida de la 159.

Capacidad de floculación

Inicialmente se procedió a su determinación para las distintas cepas en el mismo medio y con las mismas condiciones de cultivo existentes en el proceso IFI. La fermentación de los azúcares del medio originó abundante desprendimiento de CO₂, que impidió detectar diferencias entre las cepas.

Dada la necesidad de disponer de algún criterio para evaluar el comportamiento de las cepas en la operación de reciclado y la imposibilidad de establecerlo en las condiciones reales,

se decidió utilizar un método normalizado para medir la capacidad de floculación. Este es el método de Helm y cols. modificado (13), ya descrito anteriormente.

La figura 5 recoge los resultados de los ensayos de capacidad de floculación. Se representan volúmenes de la zona clarificada frente a tiempo.

Cuantitativamente puede describirse la mayor o menor floculencia de las cepas mediante el coeficiente de floculación, definido como ml/h, que es la pendiente de las curvas en los primeros 60 min. Los valores del coeficiente de floculación, F, se dan en la tabla 2.

Un coeficiente de floculación F0,3 ml/h indica que la cepa en cuestión puede considerarse floculenta. Puede observarse en la tabla 2 que, a excepción de la SV, todas las cepas ensayadas son floculentas, destacándose muy especialmente la 159, como puede apreciarse en la figura 5.

Esta gran ventaja de la 159 sobre la MC en cuanto a capacidad de floculación justifica la elección de la 159 como levadura más idónea para el proceso IFI a pesar de ser la MC algo más rápida.

CONCLUSIONES

La evaluación de la velocidad de fermentación de una levadura para producción de alcohol en continuo ha de basarse en criterios específicos para este tipo de procesos, que contemplen la dependencia de la cinética de

Tabla 2. Valores del coeficiente de floculación para las 8 cepas

Coeficiente de floculación	Cepas							
	SV	LV	V1	V2	159	87	556	MC
F, ml/h	0,25	0,85	0,85	0,50	9,60	0,45	0,50	0,45

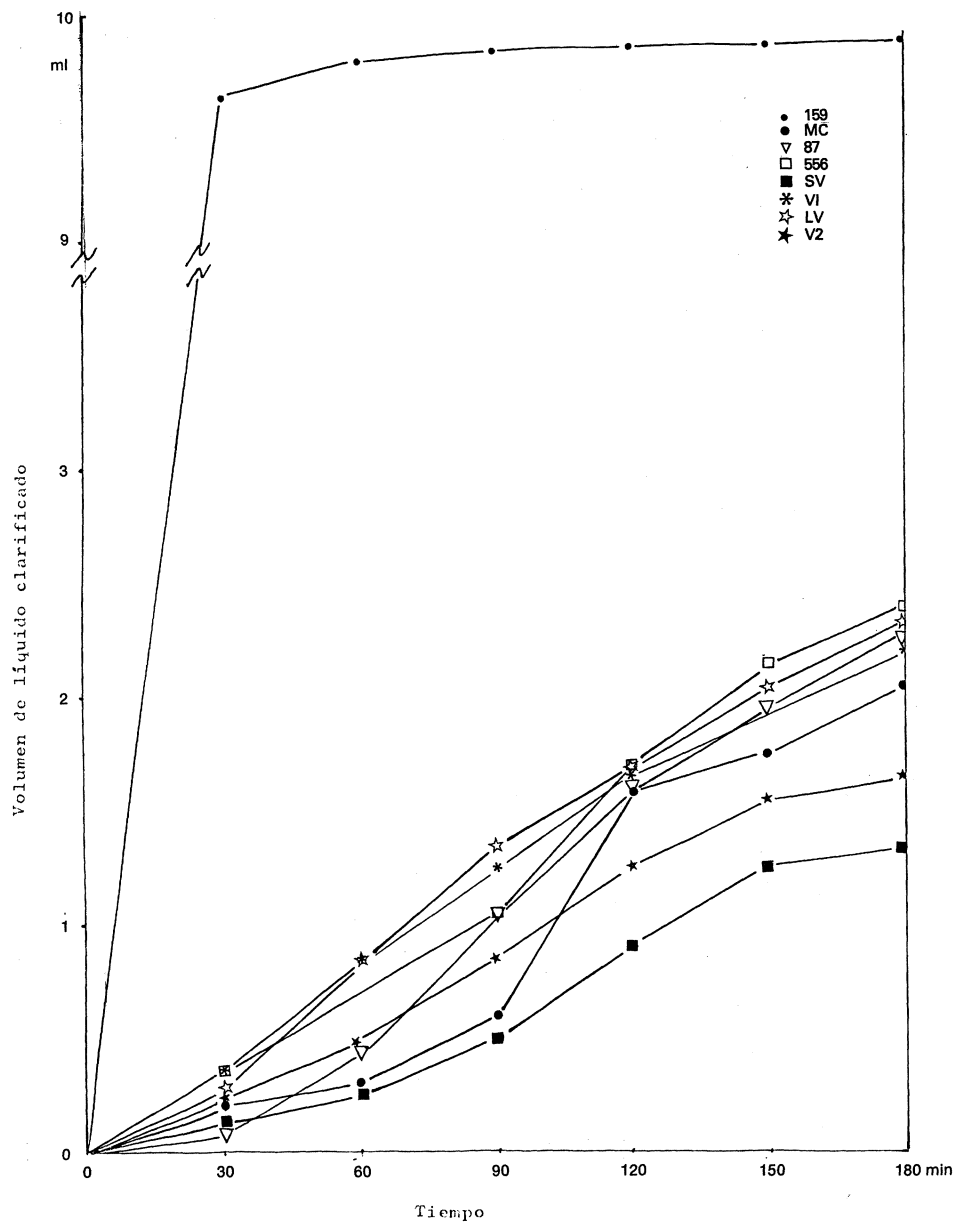


Figura 5. Capacidad de floculación de las distintas cepas

la fermentación con la concentración de etanol y no con el tiempo de cultivo, como se hace habitualmente.

La utilización de un método normalizado para determinar la capacidad de floculación de distintas levaduras puede proporcionar información comparativa más útil que la determinación en el medio real cuando existen circunstancias perturbadoras.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILERA, y DEL CASTILLO, L. 1982. Alcohol and sucrose tolerant wine yeast strains. *Cienc. Biol.*, 7, 89-94.
2. AIBA, S.; SHODA, M., and NAGATANI, M. 1977. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 854-69.
3. BAZUA, C. D., and WILKE, C. R. 1977. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 7th, 105-18.
4. CONDE, J. 1973. Variaciones en la floculación de la levadura de cultivo. *Cerveza Malta*, 37, 7-10.
5. CORNEJO, I.; LLAGUNO, C., y GARRIDO, J. 1967. Fermentación continua de melazas de remolacha para la producción de alcohol. *Rev. Cienc. Apl.*, 118, 385-404.
6. ESTEBAN, C., y KHAYAT, N. 1981. La floculación. *Cerveza Malta*, 72, 16-21.
7. GHOSE, T. K., and TYAGI, R. D. 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1401-20.
8. GREENSHIELDS, R. N.; YATES, J.; SHARP, P., and DAVIES, T. M. C. 1972. Studies in tower continuous fermentation. I. Methods for the characterization of flocculent yeasts. *J. Inst. Brew. London*, 78, 236-42.
9. HARRIS, R. H., and MITCHELL, R. 1973. Polymers in microbial aggregation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 27, 39-42.
10. JONES, R. P., and GREENFIELD, P. F. 1981. Batch ethanol production with dual organisms. *Biotechnol. Lett.*, 3, 225-30.
11. MARQUARDT, D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation on nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 11, 2.
12. PALACIO, H. 1956. Fabricación del Alcohol., 467-72 y 543-44. Editorial Salvat, Barcelona.
13. PATEL, G. B., and INGLEDEW, W. M. 1975. A flocculation test for moderately flocculent brewing yeast. *J. Inst. Brew. London*, 81, 123-26.
14. RIGHELATO, R. C.; ROSE, R., and WESTWOOD, A. W. 1981. Kinetic of ethanol production by yeast in continuous culture. *Biotechnol. Lett.*, 3, 3-8.
15. SHARMA, S., and DHAMJA, S. S. 1980. Fermentation of alcohol from cane molasses by fast fermenting yeast. *Indian J. Microbiol.*, 20, 34-38.
16. TABERA, J.; SCHANABEL, I., y GARRIDO, J. 1983. Producción de alcohol por fermentación continua de melaza de remolacha. *Común. 2.ª Reunión Cient. Microbiol. Ind.*, 11-18.
17. TAYLOR, N. W., and ORTON, W. L. 1978. Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew. London*, 84, 113-14.

RELACION ENTRE LA ESTABILIDAD RESPIRATORIA Y LA RESISTENCIA A LA SUPRESIVIDAD DE ESTIRPES RHO⁺ DE *S. CEREVISIAE*

M. MAQUEDA, E. VALDIVIA y E. MONTTOYA

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

(Aceptado: 9 de mayo de 1985)

RESUMEN

Conocida la inestabilidad respiratoria que caracteriza a algunas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* hemos realizado un estudio con dos poblaciones de las estirpes Sb-2 y SER-19, que presentan altos porcentajes de mutante rho⁻.

En los 25 clones seleccionados al azar se ha determinado el porcentaje de mutantes y de cigotos rho⁻ originados cuando se realizaron cruces con la estirpe AXp-10 supresiva. En la segunda subclonación, llevada a cabo con tres clones seleccionados en base a su estabilidad respiratoria, cabe resaltar el comportamiento homogéneo que presentan.

Los resultados obtenidos permiten establecer claramente una relación inversa entre el porcentaje de mutación de una estirpe y su resistencia a la supresividad.

SUMMARY

On the basis of the respiratory unstability which characterized some strains of *Saccharomyces cerevisiae*, we have carried out a research in two populations of the strains Sb-2 and SER-19 respectively, both of them having a high percentage of rho⁻ mutation.

We have selected, at random, 25 clones to determine the percentage of mutants and rho⁻ zygotes arising in crosses with a suppressive Axp-10 strain. In a posterior subclonation a higher homogeneity between the clones has been found.

The results obtained allow clearly to establish an inverse relationships between the number of mutants of a rho⁺ strain and its resistance to suppressiveness.

INTRODUCCIÓN

En cultivos de estirpes ρ^+ de *Saccharomyces cerevisiae* aparecen de forma espontánea y con una frecuencia que caracteriza a la estirpe, mutantes ρ^- con deficiencias respiratorias debidas a pérdida de determinados citocromos (13), además de presentar deficiencias en algunos niveles enzimáticos, como catalasa (1), peroxidasa (14) y deshidrogenasa (9).

La mutación ρ^- , con ausencia total de reversión (8), afecta al ADN mitocondrial —identificado hoy día como factor *rho*—, el cual presenta grandes alteraciones, así como excisiones (11), que se traducen físicamente en un material genético de menor tamaño (7) y de escaso grado de enrollamiento (2).

Además, algunos de estos mutantes poseen la capacidad de imponerse en los cigotos, a los que confieren un fenotipo ρ^- ; cuando se cruzan con estirpes ρ^+ son los denominados mutantes ρ^- supresivos, frente a otros que no lo hacen, o mutantes ρ^- neutros (3).

El estudio de estos mutantes se ha abordado en nuestro laboratorio, con el fin de analizar la estabilidad respiratoria de las estirpes ρ^+ y establecer la relación con la resistencia a la supresividad, mediante el análisis de clones con diferente grado de estabilidad, seleccionados al azar a partir de estirpes con alto porcentaje de mutación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se han empleado las siguientes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, procedentes de la colección de nuestro laboratorio:

Estirpes ρ^+ : SER-19 (*a*, *ade*₁, *lys*₂,

ery^R) y Sb-2 (*a*, *ade*₁, *lys*₂, *ery*^S), seleccionadas en base a la alta inestabilidad respiratoria que presentan.

Estirpes ρ^- : AXp-10 (α , *try*₁, *his*₃), seleccionada por su capacidad supresiva.

Medios y condiciones culturales

Medios de conservación y crecimiento: se ha empleado el medio recomendado por Lindegren y cols. (5), adicionado de glucosa (NG) o lactato (NL) o ambas fuentes carbonadas (NGL).

Medio mínimo de Wickerham (15): para la selección de cigotos protótrofos, adicionado de glucosa (MG) o lactato (ML) como fuente de carbono.

Medio de conjugación (MC): se ha empleado el medio descrito por Fowell (4), con 5 % de glucosa.

Todos los cultivos se han incubado a 28 °C. Los cultivos líquidos se han sometido a agitación (140 rpm). Los medios sólidos se obtuvieron adicionando agar (Difco) al 1,5 %.

Determinación del porcentaje de mutantes ρ^-

A partir de cultivos de 48 h en medio NG, se prepararon diluciones adecuadas que se diseminaron en placas de Petri con medios NG y NGL, respectivamente. Tras un tiempo de incubación adecuada para permitir el crecimiento de las colonias, se contó el número total de las mismas aparecidas, así como el de deficientes respiratorias, diferenciables por su menor tamaño en medio NGL y por la técnica de Ogur y cols. (10) en medio NG, calculando el porcentaje que estas últimas representan.

Cruce en medio líquido

Las estirpes a cruzar se hicieron crecer durante 48 h en medio NG, y a par-

tir de estos cultivos se obtuvieron suspensiones en solución salina de aproximadamente 10^7 cel/ml. Tras una noche en reposo, para dar lugar a que finalicen los procesos de gemación, se mezclaron en medio de conjugación MC en proporción 2:1 a:α. Se centrifugó la mezcla y se dejó en reposo durante 5 h a 20 °C, transcuridas las cuales, se lavó dos veces y se diseminaron diluciones adecuadas en medio MGL, que permite diferenciar los cigotos rho⁻ por su menor tamaño, y en medio MG para diferenciarlos, empleando la técnica del CTT (10).

Determinación de la supresividad de las estirpes rho⁻

Se ha seguido el método propuesto por Sherman y Ephrussi (12), en el que la supresividad viene dada por la fórmula:

$$\% S = \frac{X - Y}{100 - Y} 100$$

X representa el tanto por uno de los cigotos rho⁻ originados en el cruce de rho⁺ por rho⁻.

Y representa el tanto por uno de los mutantes rho⁻ en cultivos estacionarios de la estirpe rho⁺ empleada.

RESULTADOS

Conocida la inestabilidad respiratoria que caracteriza a algunas estirpes rho⁺ de *Saccharomyces cerevisiae* y para estudiar si existe relación entre el grado de inestabilidad y su resistencia a la supresividad de estirpes rho⁺, se han seleccionado las estirpes SER-19 y Sb-2 que presentan alto porcentaje de mutantes rho⁻ en cultivos estacionarios en NG.

1) Estudio de la estabilidad y resistencia a la supresividad de 25 clones seleccionados al azar de las estirpes SER-19 y Sb-2

A partir de cultivos en medio líquido NG, en fase estacionaria, de las estirpes SER-19 y Sb-2, que presentan un porcentaje de mutación espontánea de $16,1 \pm 0,15$ y $16,7 \pm 0,32$, respectivamente, se aislaron de cada una de

Tabla 1. Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de clones seleccionados al azar, a partir de la estirpe SER-19 (*)

Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %	Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %
SERg 1	25,7	58,42	SERg 15	38,4	76,7
SERg 2	19,0	50,75	SERg 16	16,9	88,0
SERg 3	18,7	66,52	SERg 17	19,1	57,3
SERg 4	25,0	57,00	SERg 18	37,7	84,1
SERg 5	20,2	50,63	SERg 19	25,3	52,8
SERg 6	19,8	51,75	SERg 20	19,4	53,3
SERg 7	34,6	63,30	SERg 21	29,7	55,1
SERg 8	22,2	47,80	SERg 22	29,4	60,1
SERg 9	21,0	62,40	SERg 23	27,1	91,3
SERg 10	18,5	61,80	SERg 24	24,8	68,3
SERg 11	32,2	64,70	SERg 25	23,7	42,9
SERg 12	30,5	59,50			
SERg 13	51,2	31,40	$\bar{X}$	$27,01 \pm 1,76$	$61,14 \pm 2,72$
SERg 14	41,7	76,70	O ⁻	8,39	13,72

(*) % células rho⁻ de la estirpe SER-19 %: 16,1. % R SER-19: 48,7. (**) % R = 100 - % S de AXp-10.

ellas, al azar, 25 clones denominados como SERg-1, SERg-2...SERg-25 y Sbg-1, Sbg-2...Sbg-25, cuyo fenotipo ρ^+ se determinó comprobando la capacidad para crecer en medio NL.

El grado de estabilidad respiratoria de cada clon viene expresado por el porcentaje de células ρ^- presentes en los cultivos en fase estacionaria.

Como estirpe ρ^- se eligió AXp-10, por presentar alto porcentaje de supresividad en todos los ensayos llevados a cabo en nuestro laboratorio.

En todos los cruces se ha calculado el porcentaje de cigotos ρ^- originados, para determinar la supresividad de AXp-10, valor que expresamos como resistencia a la supresividad (RS) que, a efectos numéricos, se calcula por la fórmula:

$$\% RS = 100 - \% S$$

y que expresa el porcentaje de cigotos no suprimidos en cada cruce.

Los resultados obtenidos se exponen en las *tablas 1-2*. En ellas se muestra el porcentaje de mutantes ρ^- y la resistencia a la supresividad de cada

uno de los 25 clones aislados, junto con el valor medio ($\bar{X}$) y la varianza (O^-) que se ha calculado en cada serie de datos.

2) Estudio de la variabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de subclones seleccionados al azar, de los clones SERg-13, Sbg-9 y Sbg-22

Como ampliación de la experiencia anterior, y al objeto de corroborar la gran dispersión de datos obtenida, se repitieron las mismas experiencias a partir de tres clones: Sbg-9 y Sbg-22, que son los que han presentado el mínimo y máximo de estabilidad en el caso de Sb-2, y SERg-13, el más inestable de la serie SERg, por ser ésta la característica más sobresaliente de los 25 clones estudiados.

Así pues, en idénticas condiciones descritas para las estirpes de partida, se seleccionaron en esta ocasión 20 subclones, determinándose igualmente el porcentaje de células ρ^- y la resistencia a la supresividad, así como la

Tabla 2. Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de clones seleccionados al azar, a partir de la estirpe Sb-2 (*)

Clones	Células ρ^- %	R (**) %	Clones	Células ρ^- %	R (**) %
Sbg 1	11,5	39,6	Sbg 15	14,1	36,7
Sbg 2	18,3	34,2	Sbg 16	39,2	63,0
Sbg 3	37,9	37,9	Sbg 17	11,8	37,8
Sbg 4	29,6	79,7	Sbg 18	15,1	30,5
Sbg 5	17,8	36,5	Sbg 19	24,0	44,9
Sbg 6	16,0	46,7	Sbg 20	13,5	38,3
Sbg 7	16,1	37,6	Sbg 21	16,7	40,6
Sbg 8	32,8	54,2	Sbg 22	3,0	81,1
Sbg 9	46,8	77,4	Sbg 23	14,3	37,5
Sbg 10	22,1	40,9	Sbg 24	15,8	37,7
Sbg 11	11,8	38,1	Sbg 25	14,4	36,6
Sbg 12	12,6	38,8			
Sbg 13	11,9	32,3	$\bar{X}$	19,38 $\pm$ 2	45,07 $\pm$ 3,37
Sbg 14	17,1	48,3	O^-	10,06	14,34

(*) % células ρ^- de la estirpe Sb-2:16,7. % R Sb-2:40,1. (**) % R = 100 - % S de AXp-10.

media y la varianza en cada caso. Los resultados obtenidos se exponen en las *tablas 3-5*.

DISCUSIÓN

La inestabilidad respiratoria de una estirpe bien pudiera ser una constante fisiológica de la estirpe, o el resultado medio de la estabilidad respiratoria de

cada uno de los individuos que componen la población, y, aunque el número de clones seleccionados en cada caso quizá no sea demasiado elevado, 25 y 20 respectivamente, sin embargo, constituyen una muestra representativa de la población para estudiar este carácter.

De los resultados mostrados en las *tablas 1-2* podemos deducir, en general, que los clones aislados de SER-19

Tabla 3. Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de clones rho⁺ derivados de la estirpe SERg-13 ()*

Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %	Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %
SERg 13-1	35,3	46,4	SERg 13-13	34,0	33,2
SERg 13-2	45,6	62,9	SERg 13-14	50,0	55,6
SERg 13-3	47,2	58,7	SERg 13-15	42,6	48,15
SERg 13-4	39,5	35,9	SERg 13-16	39,0	42,5
SERg 13-5	51,6	70,5	SERg 13-17	55,0	56,5
SERg 13-6	46,3	49,2	SERg 13-18	29,9	46,8
SERg 13-7	54,2	64,2	SERg 13-19	31,6	53,0
SERg 13-8	40,8	37,0	SERg 13-20	36,1	65,26
SERg 13-9	44,2	86,2			
SERg 13-10	45,7	52,4	$\bar{X}$	43,62 ± 1,76	54,32 ± 2,9
SERg 13-11	53,0	68,7	$\bar{O}$	7,48	12,68
SERg 13-12	50,8	53,26			

(*) % células rho⁻ del clon SER-13: 51,2. % R SERg-13: 31,4. (**) % R = 100 - % S de AXp-10.

Tabla 4. Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de clones derivados de la estirpe Sbg-9 ()*

Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %	Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %
Sbg 9-1	44,0	78,22	Sbg 9-13	38,4	80,1
Sbg 9-2	39,65	66,5	Sbg 9-14	39,46	71,62
Sbg 9-3	35,5	72,1	Sbg 9-15	57,1	37,1
Sbg 9-4	40,19	56,1	Sbg 9-16	39,5	83,31
Sbg 9-5	50,3	61,2	Sbg 9-17	43,0	72,4
Sbg 9-6	31,73	52,7	Sbg 9-18	45,95	60,4
Sbg 9-7	39,2	85,53	Sbg 9-19	37,5	71,1
Sbg 9-8	38,5	71,1	Sbg 9-20	47,2	79,4
Sbg 9-9	49,7	70,1			
Sbg 9-10	50,12	64,2	$\bar{X}$	43,48 ± 1,5	68,90
Sbg 9-11	45,48	87,7	$\bar{O}$	6,67	12,11
Sbg 9-12	57,2	57,2			

(*) % células rho⁻ de Sbg-9: 46,8. % R Sbg-9: 77,4. (**) % R = 100 - % S de AXp-10.

Tabla 5. Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de clones rho⁺ derivados de la estirpe Sbg-22 (*)

Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %	Clones	Células rho ⁻ %	R (**) %
Sbg 22-1	2,16	92,83	Sbg 22-12	3,0	97,13
Sbg 22-2	5,4	95,6	Sbg 22-13	5,3	94,83
Sbg 22-3	4,9	90,4	Sbg 22-14	4,38	93,11
Sbg 22-4	5,8	100,0	Sbg 22-15	6,8	96,75
Sbg 22-5	2,38	95,3	Sbg 22-16	2,68	97,44
Sbg 22-6	2,9	94,75	Sbg 22-17	3,68	96,69
Sbg 22-7	2,75	98,72	Sbg 22-18	4,9	98,8
Sbg 22-8	6,5	100,0	Sbg 22-19	2,2	95,3
Sbg 22-9	2,78	93,63	Sbg 22-20	4,3	90,6
Sbg 22-10	2,2	95,4			
Sbg 22-11	1,26	93,43			
			$\bar{X}$	3,81 ± 0,34	95,53 ± 0,61
			$\bar{O}$	1,58	2,67

(*) % células rho⁻ Sbg-22: 3,15. % R Sbg-22: 81,1. (**) % R = 100 - % S de AXp-10.

y Sb-2 poseen una gran variabilidad, y al igual que las estirpes de partida, muestran una gran inestabilidad respiratoria, con la única excepción del clon Sbg-22.

Así, el valor medio de células rho⁻, en los cultivos ($\bar{X}$) fue, en ambos casos, mayor que el de la estirpe de partida y la varianza representa el 31,06 % de la media en el caso de SER-19, y el 51,9 % en el de Sb-2. Esto nos indica, en principio, que la inestabilidad de las estirpes estudiadas es la resultante de la inestabilidad —es decir, de la habilidad para segregar células rho⁻ hijas por mitosis— de cada una de las células que componen la población.

Estos resultados se obtienen también en la segunda subclonación (tablas 3-5), pero con una gran diferencia: la varianza en ningún caso es superior al 20 % de la media, lo que demuestra una mayor homogeneidad en las poblaciones analizadas.

Sin embargo, parece contradictorio el valor medio de mutación espontánea mostrado en la tabla 1, bastante superior al de la estirpe de procedencia, SER-19. La explicación podría consistir en que ésta se habría estabili-

zado por haberse mantenido en cultivo, en el laboratorio, durante un tiempo prolongado, en el cual las células rho⁺, más competentes desde un punto de vista fisiológico, se habrían seleccionado frente a las rho⁻, hasta llegar a un equilibrio que no poseen los clones analizados inmediatamente después de su aislamiento.

Esta suposición fue verificada observando la evolución del porcentaje de células rho⁺ de varios clones, a lo largo de cuatro resiembras sucesivas, en medio NG, espaciadas por períodos de tiempo de 15 d. Los resultados se exponen en la tabla 6 y muestran cómo desciende el porcentaje de células rho⁻ hasta alcanzar, en ocasiones, valores inferiores a los de las estirpes de partida (SER-19 = 16,1 % y Sb-2 = 16,7 %).

En cuanto a la relación de estabilidad respiratoria-resistencia a la supresividad, cuyo resultado se muestra conjuntamente en las tablas 1-5, se deduce claramente, por una parte, que el grado de supresividad de una estirpe rho⁻ (AXp-10) varía entre límites muy amplios, según la estirpe rho⁺ frente a la que se determina. Por ello, pensa-

Tabla 6. Evolución del porcentaje de células ρ^- en cultivos en fase estacionaria de clones ρ^+ , sometidos a sucesivas resiembras

Clones	Células ρ^- , %			
	Resiembras			
	Ninguna	Primera	Segunda	Tercera
SERg-3	18,7	11,0	11,9	11,3
SERg-13	51,2	24,3	23,2	15,2
SERg-13-7	54,2	39,1	40,7	22,9
Sbg-9	46,8	19,6	16,09	7,3
Sbg-9-15	57,1	51,0	51,2	42,9

mos que es más correcto hablar de resistencia de la estirpe ρ^+ , de la cual va a depender en último término la supresividad de la estirpe ρ^- .

Por otra parte, si comparamos las dos columnas de valores mostrados en las tablas, podemos afirmar que existe una estrecha relación entre el grado de estabilidad de los citados clones y su resistencia a la supresividad, manifiesta en el caso del clon Sbg-22 con un porcentaje medio de mutación espontánea menor de 4 y una resistencia media a la supresividad del 95,5 % (tabla 5).

La inestabilidad respiratoria conlleva pues, en términos generales, una menor resistencia a la supresividad. Esta circunstancia se ve, además, favorecida por el diferente comportamiento que tienen los mutantes ρ^- en cruces con poblaciones mixtas (6), mostrando mayor habilidad de cruce las células ρ^- entre sí que con células ρ^+ .

Por tanto, cuando en una población ρ^+ hay un alto número de mutantes se pueden obtener, al realizar el cruce con una estirpe ρ^- , porcentajes más altos de supresividad, aunque en realidad tales valores no se correspondan en su totalidad con el de la supresividad, calculada ésta mediante la fórmula de Sherman y Ephrussi (12) que

no corrige tales diferencias en la habilidad de conjugación.

BIBLIOGRAFÍA

1. CALLAO, V., y MONTOYA, E. 1960. Actividad catalasa en mutantes de *S. cerevisiae* con deficiencia respiratoria. Laboratorio, 101-6.
2. CARNEVALI, F.; MORPURGO, G., and TECCE, G. 1969. Cytoplasmic DNA from petite colonies of *S. cerevisiae*; a hypothesis on the nature of the mutation. Science, 163, 1331-33.
3. EPHRUSSI, B.; JACOB, H., et GRANDCHAMPS, S. 1966. Etudes sur la suppressivité des mutants à déficience respiratoire de la levure. II Etapes de la mutation grande en petite, provoquée par le facteur supressif. Genetics, 54, 1-29.
4. FOWELL, R. R. 1969. En: A. H. ROSE and J. S. HARRISON (eds). The Yeasts, 1, 375. Academic Press, New York.
5. LINDEGREN, C. C.; NAGAI, S., and NAGAI, H. 1958. Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. Nature, 182, 446-48.
6. MAQUEDA, M., and MONTOYA, E. 1982. The relationship between mating ability of ρ^+ and ρ^- cells and suppressiveness in *S. cerevisiae*. Microbios, 33, 137-48.
7. MICHAELIS, G.; DOUGLAS, S.; TSAI, M. J., and CRIDDLE, R. S. 1971. Mitochondrial DNA suppressiveness of petite mutant in *S. cerevisiae*. Biochem. Genet., 5, 487-95.
8. NAGAI, S.; YANAGISHIMA, N., and NAGAI, H. 1961. Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeasts and other microorganisms. Bacteriol. Rev., 25, 404-26.

9. NÚÑEZ DE CASTRO, I. 1972. Regulación de L-glutamato deshidrogenasa en *S. cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
10. OGUR, M.; ST. JOHN, R., and NAGAI, S. 1957. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science*, 125, 928-29.
11. PRUNELL, A., and BERNARDI, G. 1974. The mitochondrial genome of wild-type yeast cell. *J. Mol. Biol.*, 86, 825-41.
12. SHERMAN, F., and EPHRUSSI, B. 1962. The relationship between respiratory deficiency and suppressiveness in yeast as determined with segregational mutants. *Genetics*, 47, 695-700.
13. SHERMAN, F., and SLONIMSKI, P. P. 1964. Respiration-deficient mutants of yeast. II Biochemistry. *Biochem. Biophys. Acta.* 90, 1-15.
14. VALDIVIA, E. 1980. Estudios sobre las peroxidasas presentes en células de *S. cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
15. WICKERHAM, L. J. 1946. A critical evaluation of the nitrogen assimilation of test commonly used in the classification of yeast. *J. Bacteriol.*, 52, 299-301.

INDUCCION POR PECTINA DE DISTINTAS ACTIVIDADES PECTICAS DEL HONGO *ALTERNARIA ALTERNATA* DURANTE SU AUTOLISIS

C. VAZQUEZ^(a), M. J. MARTINEZ^(b), R. LAHOZ^(b) y F. REYES^(b)

^(a)Colegio Universitario Integrado «Arcos de Jalón», Universidad
Complutense, Madrid

^(b)Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán» (CSIC), Madrid

(Aceptado: 22 de abril de 1985)

RESUMEN

La autólisis del hongo *Alternaria alternata*, crecido en un medio basal en el que se ha sustituido parcial o totalmente la fuente de carbono por pectina (0 al 1 %), ha sido estudiada en relación con la producción de enzimas pécticas. Todas las actividades estudiadas (poligalacturonasa, polimetilgalacturonasa, pectin y pectato-liasas y actividades endo, frente a la pectina y el poligalacturonato sódico) resultaron inducidas en presencia de este polisacárido, siendo la poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa las que presentaron una respuesta mayor. La inducción de estas enzimas no fue proporcional a las concentraciones de pectina que había en el medio, observándose una cierta inhibición para concentraciones elevadas.

El proceso autolítico fue análogo en todas las condiciones ensayadas.

SUMMARY

The production of pectic enzymes during autolysis of the fungus *Alternaria alternata* has been studied in relation with the induction of these enzymes by the presence of pectin in the culture medium (0 to 1 %). The pectic activities studied (polygalacturonase, polymethylgalacturonase, pectin and pectate lyase and endo activities) increase in presence of pectin, the highest increase corresponding to polygalacturonase and polymethylgalacturonase. The induction of these activities do not increased with an increasing concentration of pectin in the medium. At higher pectin concentration an inhibition of pectic activities was observed.

Autolysis of *Alternaria alternata* was similar in all the conditions studied.

INTRODUCCIÓN

Una de las fases de la cinética de crecimiento de los hongos filamentosos es la fase de decadencia o autólisis. En esta fase se produce un decrecimiento de las células viables, y sobreviene como consecuencia de la muerte de la célula al agotarse los nutrientes del medio, principalmente la fuente carbonada.

En esta fase, el hongo degrada primeramente sus sustancias de reserva, y después se produce una degradación tanto del citoplasma como de la pared celular, produciendo los elementos necesarios para su supervivencia. La autólisis tiene lugar por las enzimas líticas que el hongo tiene o que sintetiza (15) para llevar a cabo este proceso degradativo, con la cooperación de procesos químicos y físicos.

La infección de las plantas se produce al germinar las esporas del hongo y éste se establece en la fase de crecimiento, pero la gran acumulación de enzimas líticas que tiene lugar durante la fase degradativa o autólisis hace pensar que esta fase pudiera estar implicada, de alguna manera, en la propagación del proceso infeccioso.

La degradación de los polisacáridos de las paredes celulares de las plantas por las enzimas extracelulares de hongos y bacterias, es un aspecto importante de la patogénesis (4), aunque el papel de éstas sea solamente secundario. En términos de especificidad, su producción inicial o continuada puede determinar si la infección tiene o no tiene lugar (1, 18).

Generalmente estas enzimas son extracelulares, muy estables, se producen inductivamente y se encuentran en tejidos infectados.

La capacidad de muchos hongos patógenos de plantas para producir estas enzimas en cultivo, no es sufi-

ciente para adscribir a éstas un papel en fitopatogenicidad (5), pero el cultivo *in vitro* puede proporcionar una indicación sobre su capacidad patogénica.

Barker y Walker (2) encontraron una relación positiva entre patogenicidad y habilidad de *Pellicularia filamentosa* para producir poligalacturonasas *in vitro*.

En este trabajo se describe la producción e inducción de enzimas pécticas durante el proceso autolítico del hongo *Alternaria alternata*: este hongo es extremadamente común y cosmopolita, y se encuentra en numerosas plantas y en el suelo (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Alternaria alternata (Fr.) Keissl., cepa 105.24 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. Este microorganismo se mantiene en el laboratorio mediante resiembras en agar-patata.

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el empleado por Reyes y Byrde (14), con la siguiente composición (g/l⁻¹): glucosa (anhidra), 10; tartrato amónico, 2; K₂HPO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0,5; KCl, 0,5; extracto de levadura, 1,0, y 1 ml de una solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos contenía (mg/ml⁻¹): Na₂B₄O₇·10H₂O, 100; ZnSO₄·7H₂O, 70; FeSO₄·7H₂O, 50; CuSO₄·5H₂O, 10; MnSO₄·4H₂O, 10; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 10.

A partir de este medio basal se prepararon 5 medios, uno con glucosa como fuente carbonada y los otros cuatro sustituyendo parcial o totalmente la fuente de carbono por pectina (0,25

a 1 %) con objeto de inducir la producción de enzimas pécticas.

Alternaria alternata fue crecido a 25 °C en cultivo estacionario y matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio; cada matraz fue inoculado con 1 ml de una suspensión de esporas que contenía, aproximadamente, 10^6 esporas/ml.

Toma de muestra

A intervalos de tiempo conveniente se tomaron muestras para determinar el grado de autólisis (porcentaje de pérdida de peso seco de micelio) y las actividades enzimáticas en el líquido de cultivo. La contaminación de las muestras fue controlada al microscopio.

El líquido de cultivo fue separado del micelio por centrifugación (500 g) durante 15 min y llevado al volumen inicial con agua destilada. El micelio fue lavado con agua destilada y secado a 60 °C hasta peso constante.

Métodos analíticos

En el líquido de cultivo se determinaron sustancias reductoras, proteínas y las distintas actividades enzimáticas.

Las sustancias reductoras totales fueron determinadas por el método de Somogyi (17) y Nelson (13), utilizando glucosa como patrón.

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry (9), utilizando albúmina bovina como patrón.

Las actividades poligalacturonásicas (E.C.3.2.1.67) fueron designadas como poligalacturonasa (PG) y polimetilgalacturonasa (PMG) y analizadas por hidrólisis del substrato adecuado liberando sustancias reductoras. Los substratos utilizados fueron, respectivamente, poligalacturonato sódico (Sigma) y pectina de manzana

(Fiuka, AG., Buchs SG) (mg/ml^{-1}) en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM de pH 5,5. El incremento en las sustancias reductoras fue determinado por el método de Somogyi (17) y Nelson (13). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad necesaria para liberar 1 μmol de ácido galacturónico/min a 37 °C.

Las actividades pectiniliasa (PL) (E.C.4.2.2.10) y pectatoliasa (PAL) (E.C.4.2.2.9) se determinaron midiendo el incremento en la absorción a 235 nm producido por la acción de dichas enzimas sobre una solución de pectina de manzana o poligalacturonato sódico (mg/ml^{-1}) (7), respectivamente. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de urónidos insaturados en 1 min, basado en el coeficiente de extinción molar (4600) de los compuestos insaturados (12).

Las actividades endo (E.C.3.2.1.15) frente a la pectina de manzana y el poligalacturonato sódico fueron determinadas midiendo la disminución en la viscosidad en un viscosímetro Cannon Fenske (5354/2) a 37 °C. Se llevaron controles con enzimas inactivadas por el calor. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad necesaria para catalizar una disminución en la viscosidad de un 1% en condiciones estándar (8).

RESULTADOS

Alternaria alternata alcanzó el peso máximo de micelio el 5.º día de incubación, coincidiendo con el agotamiento de la fuente carbonada e inicio de la fase degradativa (día cero de autólisis).

La pérdida que experimenta el peso seco de micelio con el tiempo de incubación, o grado de autólisis, no pre-

senta variaciones significativas en las distintas condiciones de cultivo ensayadas (tabla 1).

Tabla 1. Variaciones en el peso seco del micelio de *A. alternata*, durante la autólisis, en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y pectina: A (glucosa 1 %, pectina 0 %); B (glucosa 0,75 %, pectina 0,25 %); C (glucosa 0,50 %, pectina 0,50 %); D (glucosa 0,25 %, pectina 0,75 %); E (glucosa 0 %, pectina 1 %)

Periodo de incubación d	Peso seco micelio/muestra, mg				
	A	B	C	D	E
5	81,0	64,1	68,7	68,0	76,1
6	76,1	62,0	65,0	64,1	72,0
13	51,4	61,4	63,4	64,0	70,0
20	52,7	55,0	53,0	63,2	68,5
27	48,0	53,1	50,1	38,3	47,2
34	46,8	53,1	47,1	39,0	41,4
41	46,2	45,3	41,6	36,0	39,1
48	46,3	39,2	38,0	40,3	40,4
55	46,0	34,5	34,7	38,7	40,2

En cada una de las condiciones establecidas, el pH inicial del medio fue de 5,5 unidades, decreciendo durante la fase de crecimiento, alcanzando valores entre 3 y 3,5 unidades, e incrementándose durante el proceso degradativo, alcanzando valores entre 6 y 8 unidades, para luego hacerse constante. Simultáneamente, el pH aumenta con la concentración de pectina en el medio (figura 1).

Las proteínas durante la fase autolítica tienden a disminuir hasta alcanzar valores constantes, siendo menores los niveles alcanzados al aumentar la concentración de pectina (figura 2).

Las distintas actividades pécticas estudiadas se encuentran representadas en las tablas 2-4. Generalmente, los niveles más altos de PG, PMG y actividades endo, se obtienen hacia la mitad del proceso degradativo. Para la

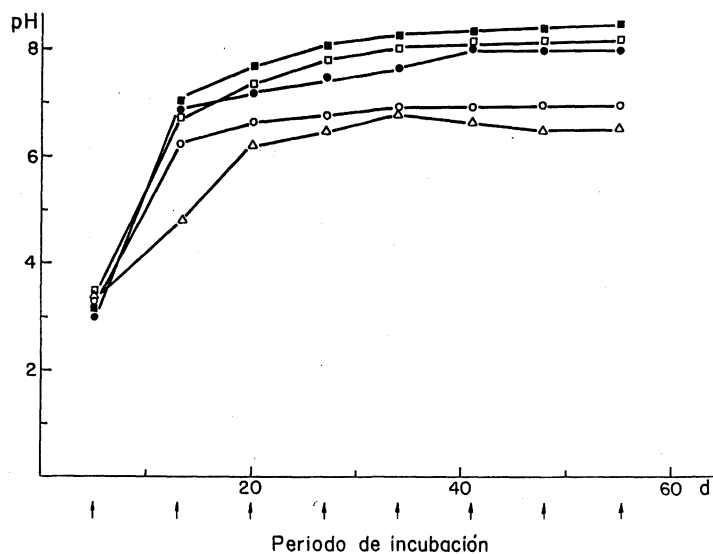


Figura 1. Variaciones del pH en el líquido metabólico de *A. alternata*, con el tiempo de incubación, en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y pectina: A (glucosa 1 %, pectina 0 %) (Δ); B (glucosa 0,75 %, pectina 0,25 %) ($\circ$); C (glucosa 0,50 %, pectina 0,50 %) ($\bullet$); D (glucosa 0,25 %, pectina 0,75 %) ($\square$); E (glucosa 0 %, pectina 1 %) ($\blacksquare$)

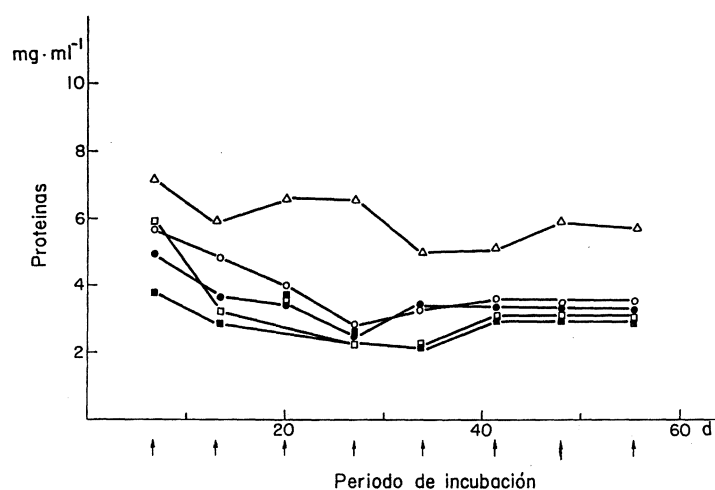


Figura 2. Variaciones de las proteínas en el líquido metabólico de *A. alternata*, con el tiempo de incubación, en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y pectina: A (Δ), B (○), C (●), D (□) y E (■)

PL y PAL los niveles mayores se alcanzan al final de esta fase.

Todos los resultados obtenidos resultan de la media de tres experimentos.

DISCUSIÓN

En este trabajo la presencia de pectina en el medio no estimula el creci-

miento del hongo *Alternaria alternata*. Resultados semejantes encuentra Mehta y cols. (10) para *A. solani* crecido sobre distintos sustratos pécticos.

Los hongos pueden producir enzimas que degradan polisacáridos inductiva o constitutivamente (11). En los resultados obtenidos para *Alternaria alternata*, las actividades pécticas

Tabla 2. Variaciones en las actividades poligalacturonasa (PG) y polimetilgalacturonasa (PMG) de *A. alternata*, durante la autólisis, en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y pectina: A, B, C, D y E

Periodo de incubación d	PG mU/mg de proteína					PMG mU/mg de proteína				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
5	19,2	543,0	798,6	531,2	914,8	17,3	332,5	241,1	459,8	680,5
6	18,0	570,0	800,5	630,0	945,0	40,0	380,0	600,5	550,0	750,0
13	57,1	643,1	832,0	1.083,5	990,1	85,7	476,2	672,0	737,1	834,2
20	54,3	839,3	956,4	913,1	793,7	75,9	640,5	759,2	274,6	341,3
27	45,4	1.182,2	1.288,9	770,6	455,2	55,1	749,3	716,1	177,8	122,5
34	43,5	972,1	814,4	450,2	443,7	82,0	697,3	241,5	83,3	183,9
41	31,2	847,3	634,9	460,5	203,8	50,1	538,4	191,2	99,8	110,9
48	36,8	714,3	405,4	227,5	110,0	59,7	374,2	143,0	75,3	75,3
55	29,2	243,5	316,6	297,6	126,5	50,4	110,5	118,2	81,8	47,6

Tabla 3. Variaciones en las actividades pectín-liasa (PL) y pectato-liasa (PAL) de *A. alternata*, durante la autólisis, en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y pectina: A, B, C, D y E

Período de incubación d	PL mU/mg de proteína					PAL mU/mg de proteína				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
5	0,79	4,00	8,20	6,90	10,80	0,59	3,80	6,00	4,40	9,80
6	0,21	8,00	10,50	8,00	13,50	0,00	6,00	3,40	6,00	10,00
13	1,47	11,60	15,00	13,80	17,50	0,50	6,10	8,50	11,70	11,60
20	1,83	10,90	15,20	21,00	11,70	0,38	6,30	9,30	10,30	11,10
27	2,64	11,60	23,70	25,60	17,00	0,79	9,00	12,30	10,00	8,00
34	2,14	15,70	19,50	25,80	22,50	1,56	8,90	9,90	16,60	13,70
41	3,92	13,10	17,40	15,90	10,60	3,10	7,40	7,30	8,40	8,40
48	7,94	10,30	12,30	10,00	11,50	6,25	5,90	9,40	5,80	7,60
55	2,20	20,30	16,30	12,80	11,10	5,50	8,40	9,60	10,20	9,00

Tabla 4. Variaciones en las actividades endo, frente a la pectina y el poligalacturonato sódico, de *A. alternata*, durante la autólisis, en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y pectina: A, B, C, D y E

Período de incubación d	Reducción de la viscosidad pectina mU/mg de proteína					Reducción de la viscosidad poligalacturonato mU/mg de proteína				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
5	50,5	248,1	79,1	87,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13	65,2	56,9	104,0	103,6	202,8	0,0	100,8	45,8	0,0	77,9
20	61,3	166,7	206,3	595,8	599,9	90,0	158,5	50,7	176,5	142,8
27	55,0	377,6	776,3	1.246,6	1.105,9	77,8	580,6	599,1	754,0	730,3
34	50,0	784,3	845,4	750,4	1.082,2	77,7	180,2	294,1	134,8	415,3
41	35,5	469,7	649,0	744,7	712,3	60,7	204,7	332,0	223,1	124,9
48	37,7	474,2	388,9	456,7	129,6	0,0	62,4	233,9	70,5	0,0
55	36,5	664,2	280,8	286,8	217,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

están presentes durante la autólisis en un medio con glucosa como única fuente carbonada, pero la respuesta a la inducción (pectina además de glucosa en el medio) es fuertemente positiva, especialmente en el caso de la PG y PGM.

Sherwood (16) señaló la asociación entre los altos niveles de PL y la condición alcalina del medio, debido fundamentalmente a la relación que existe entre el pH y esta enzima. En este trabajo, al utilizar pectina como fuen-

te de carbono, los valores del pH del medio aumentan al ir aumentando la concentración de este polisacárido; sin embargo, los cambios de pH no parecen afectar significativamente la producción de PL y PAL.

Debido a los pocos estudios que hay sobre el proceso degradativo, o autólisis, es interesante considerar que durante esta fase hay síntesis de enzimas pécticas y que, además, están inducidas por la presencia de pectina en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBERSHEIM, P.; JONES, T. M., and ENGLISH, P. D. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 7, 171-94.
2. BARKER, K. R., and WALKER, J. C. 1962. Relationship of pectolytic and cellulolytic enzyme production by strains of *Pellicularia filamentosa* to their pathogenicity. *Phytopathology*, 52, 1119-25.
3. BATEMAN, D. F., and BASHAM, H. G. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. En: R. HEITFUSS and P. H. WILLIAMS (eds.). *Physiological Plant Pathology*, 316-55. Springer Verlag, Berlin.
4. BATEMAN, D. F., and MILLAR, R. L. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 4, 119-46.
5. BYRDE, R. J. W. 1979. Role of polysaccharide-degrading enzymes in microbial pathogenicity. En: R. C. W. BERKELEY, G. W. GOODAY and D. C. ELLWOOD (eds.). *Microbial Polysaccharides and Polysaccharidases*, 417-36.
6. DOMSCH, K. H.; GAMS, W., and ANDERSON, T. H. 1981. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London.
7. HISLOP, E. C.; KEON, J. P. R., and FIELDING, A. H. 1979. Effects of pectin-lyases from *Monillinia fructigena* on viability, ultrastructure and localization of acid phosphatase of cultured apple cells. *Physiol. Plant Pathol.*, 14, 371-81.
8. KEEN, N. T., and HORTON, J. C. 1966. Induction and repression of endo-polygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microbiol.*, 12, 443-53.
9. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L., and RANDALL, S. S. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-75.
10. METHA, P.; VYAS, K. M., and SAKSENA, S. B. 1975. Production of pectolytic enzymes by *Alternaria solani* and *Alternaria tenuis* on different culture media. *J. Indian Bot. Soc.*, 54, 200-6.
11. MULLEN, J. M., and BATEMAN, D. F. 1975. Polysaccharide degrading enzymes produced by *Fusarium roseum* avenaceum in culture and during pathogenesis. *Physiol. Plant Pathol.*, 6, 233-46.
12. NAGE, C. W., and ANDERSON, M. M. 1965. Action of bacterial transeliminase on normal and unsaturated oligogalacturonic acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 322-30.
13. NELSON, H. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-80.
14. REYES, F., and BYRDE, R. J. W. 1973. Partial purification and properties of α - β -N-acetylglucosaminidase from the fungus *Sclerotinia fructigena*. *Biochem. J.*, 131, 381-88.
15. REYES, F.; LAHOZ, R., and VAL-MORENO, A. 1981. Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.*, 126, 347-53.
16. SHERWOOD, R. T. 1966. Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology*, 56, 279-85.
17. SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160, 61-73.
18. TSEG, T. C., and BATEMAN, D. F. 1968. Production of phosphatidases by phytopathogens. *Phytopathology*, 58, 1437-38.

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 alfabetizadas, 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 returned 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.