

Volumen 3, N.º 1
Febrero 1987

PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

Microbiología



¡Por fin!

TASO-MATIC 4

**FR, PCR, ASLO Y ESTAFILOLISINA
AUTOMÁTICAMENTE
EN UN SOLO APARATO.**



- Sin diluciones previas.
- Resultados cuantitativos.
- Resultados impresos.
- Método cinético.



Solicite una demostración

387 00 92



MENARINI
DIAGNOSTICI

Alfonso XII, 587 - Tel. 387 00 92 - Télex:
08912 BADALONA (ESPAÑA)

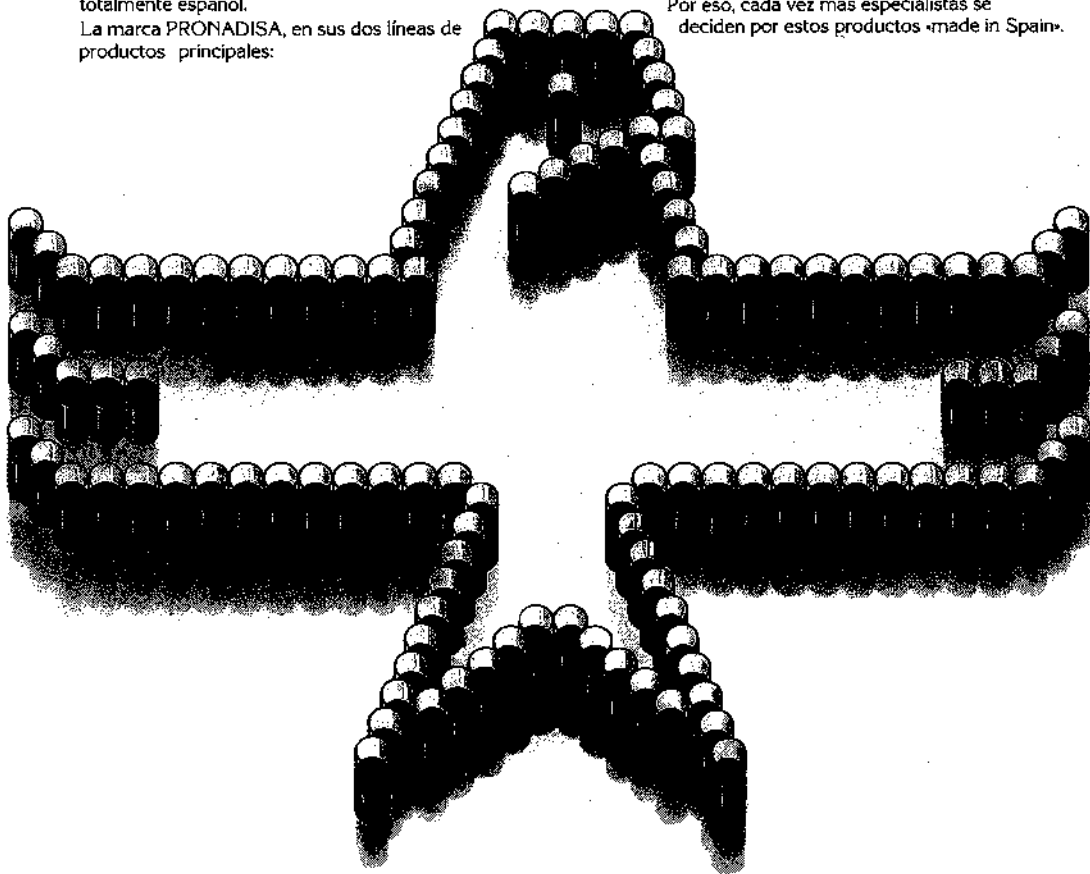
PRONADISA: Reactivos de calidad internacional "made in Spain"

En efecto, gracias a la elevada tecnología -100% española- de los laboratorios HISPANLAB y a un estricto control de las materias primas utilizadas, se consiguen los productos PRONADISA, competitivos en calidad con los mejores importados. Pero a un precio totalmente español.

La marca PRONADISA, en sus dos líneas de productos principales:

Imunohematología -reactivos para banco de sangre- y Microbiología -medios de cultivo deshidratados, placas, tubos y frascos preparados, y hemocultivos- representa un continuo esfuerzo de superación en calidad, rigor científico y adecuación a las necesidades del usuario.

Por eso, cada vez más especialistas se deciden por estos productos "made in Spain".

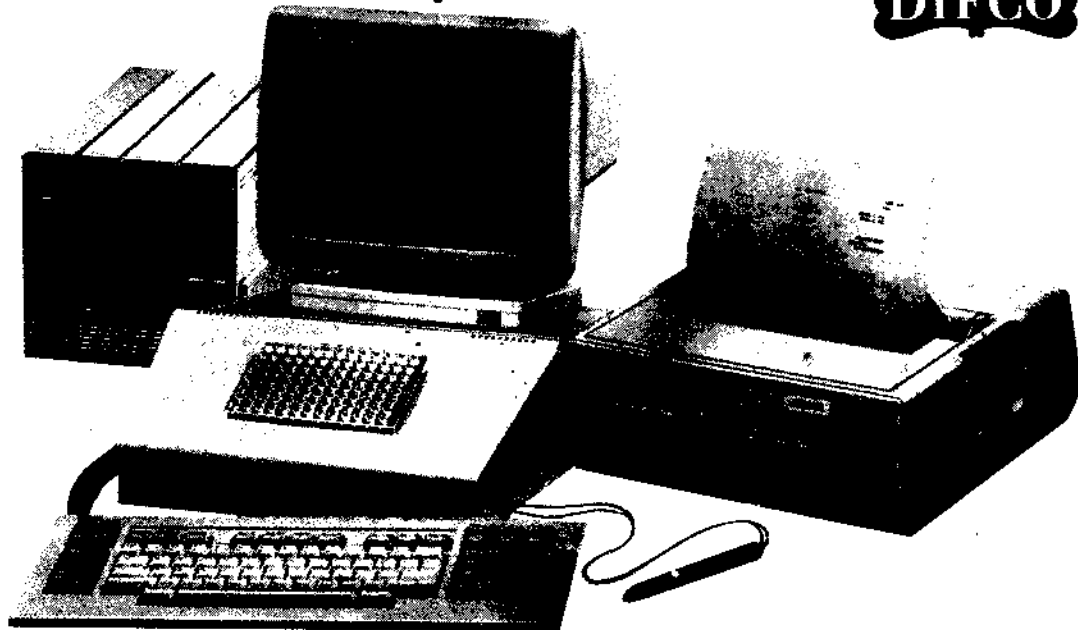


HISPANLAB, S.A.

C/ Cañada, 11. Polígono Procoinsa
Torrejón de Ardoz. Madrid.
Tels: 675 17 30 - 675 13 61
Télex: 22299

Si Ud. cree que la automatización disminuye su propio control...

...Sistema Pasco para ID/CMI de **DIFCO**



desarrollado por y para microbiólogos, que automatiza sus propias decisiones

Ud. mismo: establece las decisiones sobre el punto final de las diferentes reacciones.

Ud. mismo: controla la información sobre la susceptibilidad, con una completa flexibilidad y fácil interpretación.



INOCULADOR

desechable de 104 pocillos. Sin ajuste de turbidez del inóculo.

VERSATILIDAD

Proceso de datos diseñado por y para microbiólogos de gran versatilidad. Ordenador NCR de gran capacidad para almacenamiento de datos.

PANELES

Panel de 104 pocillos. Análisis de 33 agentes antimicrobianos. No requiere rehidratación.

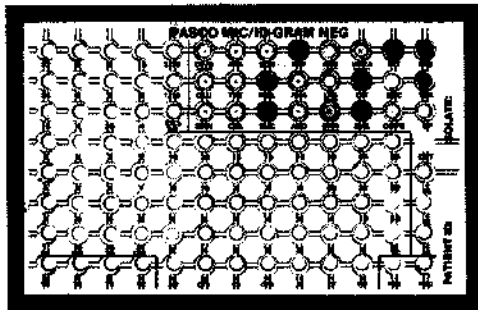
DATOS

Dosificación recomendada en base a niveles alcanzables en suero o tejido blando.

280 mg. por vía intravenosa (IV) o intramuscular (IM)

Cada 8 horas.

Dosis de 4 mg. por kg.



FRANCISCO SORIA MELGUIZO, S.A.

Caramuel, 38 - Tfno. 464 94 50 - 464 36 00 - Telex 43766 FSOR E - 28011 MADRID

MICROBIOLOGIA SEM

Publicación de la Sociedad Española de Microbiología
Con la colaboración del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CONSEJO EDITORIAL

Editor-Coordenador

Rubens López, Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, 28006 Madrid.

Area de Bioquímica y Fisiología Microbianas

Germán Larriba, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Extremadura, Badajoz.

Area de Ecología Microbiana

Ricardo Guerrero, Departamento de Microbiología e Instituto de Biología Fundamental, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

Area de Genética Microbiana

Ernesto García, Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, 28006 Madrid.

Area de Microbiología Alimentaria

Juan Antonio Ordóñez, Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid.

Area de Microbiología Clínica

Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología, Hospital La Fe, Valencia.

Area de Microbiología Industrial

María Josefa Elena Fernández, Instituto de Fermentaciones Industriales, Arganda del Rey, Ctra. de Valencia, km. 24,400, Madrid.

Area de Morfología y Ultraestructura

Manuel Benjamín Manzanal, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Area de Taxonomía Bacteriana

Antonio Ventosa, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla.

Area de Virología

Esteban Domingo, Instituto de Biología Molecular (C.S.I.C./U.A.M.), Canto Blanco, 28049 Madrid.

Dirección: Sociedad Española de Microbiología. Vitruvio, 8.
28006 Madrid. (España). Tel. (91) 261 98 00, Ext. 211.

Aparecen tres números al año (1987), que se integran en un volumen.

Precio de suscripción anual: España, 5.000 ptas.; extranjero, 8.000 ptas.

IMPRIME: COIMPRES, S. A.
DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985
ISSN: 0213-4101

CONTENTS

	<u>Page</u>
Gene conversion in <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Sicard, A. M.....	5
The structure of the mycelial wall of <i>Agaricus bisporus</i> . Novaes-Ledieu, M. (*), Martínez, J. A. and García-Mendoza, C.....	13
Antigenic relationships among several <i>Naegleria</i> strains. Zubiaur, E. and Alonso, P. (*).....	25
Isolation of a mutant of <i>Trichoderma pseudokoningii</i> with enhanced cellulase production. Zaldívar, M., (*) Steiner, J., Musalen, M. and Contreras, I.....	33
An effective mutagenic method in <i>Azotobacter vinelandii</i> . Luque, F., Santero, E., Medina, J. R. (*) and Tortolero, M.....	45
Study of the APH(3')-II phosphotransferase by Western Blotting. Rivera, M. J. (*), Pulido, D., Grasa, B. and Gómez-Lus, R.....	51

(*) Corresponding author.

INDICE

	<u>Página</u>
Conversión génica en <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Sicard, A. M.....	5
Estructura de la pared micelial de <i>Agaricus bisporus</i> . Novaes-Ledieu, M. (*), Martínez, J. A. y García-Mendoza, C.....	13
Relaciones antigénicas entre varias estirpes de <i>Naegleria</i> . Zubiaur, E. y Alonso, P. (*).....	25
Aislamiento de un mutante de <i>Trichoderma pseudokoningii</i> hiperproductor de celulasas. Zaldívar, M. (*), Steiner, J., Musalem, M. y Contreras, I.....	33
Un método mutagénico eficaz para <i>Azotobacter vinelandii</i> . Luque, F., Santero, E., Medina, J. R. (*) y Tortolero, M.....	45
Estudio de la fosfotransferasa APH(3')-II mediante transferencia de proteínas (Western Blotting). Rivera, M. J. (*), Pulido, D., Grasa, B. y Gómez-Lus, R.....	51

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

Gene conversion in *Streptococcus pneumoniae*

A. Michel Sicard

Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires du C.N.R.S.,
118 route de Narbonne - 31062 Toulouse France.

(Received December 10, 1986)

Summary

In pneumococcus, correction of mutations by the repair of mismatched bases results in gene conversion, i.e. transfer of genetic information from one strand of DNA to the other. Three different correction systems act upon a variety of mutations: 1) A long-patch process (a few Kb) is efficient in the elimination of transitions, *mostly* ± 1 base-pair mutations and less efficient in eliminating some transversions without affecting fairly long deletions. Neighboring sequences may interfere with this process. It is directed by at least two genes. 2) A localized conversion system acts on a six base-pair heteroduplex structure such as 5'ATTAAT/3'TAAGTA by specifically converting the mutated A base to the wild type C base. Modifications of this configuration by site-directed mutagenesis lead to reduced conversion. 3) Fairly long deletions are eliminated during recombination by events that extend several scores of bases around the heterologous region. Although only the first conversion system has been shown to participate efficiently in protecting *Streptococcus pneumoniae* against spontaneous mutation, the two other processes may also eliminate mutations of different natures.

Key-words: Transformation, recombination, mutation-repair, site-directed mutagenesis.

Resumen

En neumococo la reparación de bases mal apareadas creadas por el emparejamiento de un mutante y un alelo de tipo salvaje es la causa de la conversión génica, esto es la transferencia de información genética de una cadena a la otra. Tres sistemas correctores pueden actuar sobre varios tipos de mutaciones:

1) Un proceso de reparación largo (algunas Kb) es capaz de eliminar eficientemente transiciones, la mayoría de las mutaciones ± 1 par de bases y menos eficientemente, algunas transversiones, sin afectar a las deleciones bastante largas del DNA. Las secuencias vecinas pueden interferir con este proceso. Está controlado al menos por dos genes.

2) Un sistema de conversión localizada, que actúa sobre una estructura heteroduplex de seis pares de bases, tal como 5'ATTAAT/3'TAAGTA convirtiendo específicamente la base mutada A en la base de tipo salvaje C. Modificaciones de esta configuración por mutagénesis dirigida conducen a una conversión reducida.

3) Las deleciones medianamente largas son eliminadas durante la recombinación mediante procesos que cubren varias decenas de bases alrededor de las zonas heterólogas. Aunque sólo el primer sistema de conversión se ha demostrado que participa eficientemente contra las mutaciones espontáneas, los otros dos procesos pueden eliminar también mutaciones de diferente naturaleza.

Pneumococcus, officially known today as *Streptococcus pneumoniae* is not especially remarkable among bacteria. However, it has preoccupied bacteriologists since at the turn of the century when pneumonia, due to this bacteria, was the leading cause of death. A major advance in attempts to protect individuals from infection by using antiserum was the discovery, in *Pneumococcus* in the early twenties by Heidelberger and Avery that the specific antigenic material within the bacterial capsule was not a protein but a polysaccharide (22). The discovery in the early forties by the Rockefeller bacteriologists, Avery, MacLeod and McCarty working on *Pneumococcus* that DNA was the biological substance which transmits genetic information opened the modern field of molecular genetics (1). Almost twenty years later, in the same organism, it was first found that mutations can be eliminated by a process of correction at the heteroduplex stage. More recently, additional correction systems were described in this organism. We will review here all these processes that imply transfer of information from one strand of DNA to another one i.e. *gene conversion* in *Streptococcus pneumoniae*. An extended review of one of these correction processes, long-patch conversion, has recently been published (4).

Long-patch conversion of mismatched bases

The most extensively studied process of gene conversion is the long-patch conversion of mismatched bases. An efficient way to create mismatched bases is by the bacterial transformation system. *Pneumococcus* is especially suited to experimental study since all cells are able to incorporate fragments of transforming DNA efficiently. Using cloned DNA, up to 80 % of a population can be transformed for a given marker (6). One strand at random penetrates the cell and pairs with the homologous region of the recipient DNA. If the transforming DNA carries a mutation, the sequences will be mismatched along the non-complementary heteroduplex. It was first observed independently by several authors (19, 23, 32, 36), that the nature of the mutation will affect the transformation frequency. In this regard it was found that point mutations fall into four distinct classes with respect to their efficiency of transformation, defined by the ease with which they can be recombined into or out of a chromosome (16, 26). The differences can be as much as ten-fold between High Efficiency (HE) and Low Efficiency (LE) classes while a few mutants belong to an Intermediate Efficiency (IE) and a Very High Efficiency (VHE) class.

H. Ephrussi-Taylor and T.C. Gray postulated that the poorly transforming heteroduplexes (LE) are recognized specifically and that this process eliminates the genetic material originating from the donor DNA (15). Although donor genetic material is destroyed preferentially, in about one tenth of the events the recipient genetic material is destroyed instead. A repair would then reestablish a double-stranded structure, copying from the *remaining* single strand. This excision-repair would transfer genetic information from one strand to the other, thus being a gene conversion.

On the contrary, VHE markers are not excised at all and they are integrated. They can replicate, becoming homoduplex after one cell division. This type of transformation does not involve gene conversion. For HE markers, only one of the two heteroduplexes is excised and converted. Several predictions from this model have been fulfilled, 1) LE markers are destroyed by excision-repair (46), 2) LE markers are transmitted to all daughter cells about one cell division earlier than HE markers (14, 54), 3) Phenotypic expression of LE markers is faster than for HE or VHE markers (14, 11) because for LE markers both strands contain the genetic information, 4) the frequency of mixed and pure clones after transformation by LE or HE markers is consistent with a fast transmission of LE information to both strands (39), 5) the frequency of double unlinked LE-LE transformants is as expected for a fast transmission of information to both strands (40).

The length over which this conversion occurs has been estimated by genetic analysis of revertants at a locus that confers resistance to amethopterin (*amiA*). Some *amiA* revertants result from a substitution to a base different from that of the original wild-type. When used as a recipient in transformation these revertants reduce the recombination frequency of HE markers in proportion to the map distance separating the revertant site and the marker. It has been found that the conversion event concerns an average of at least 2000 to 3000 base-pairs (45, 47). Similar results were obtained by Lacks using double HE-LE mutants at the *mal M* locus (26), and by Gray and Ephrussi-Taylor at the *amiA* locus (18). Biochemical evidence for excision of a long sequence (several kb) of DNA triggered by a LE mismatch was recently obtained by Mejean and Claverys (42) using a cloned fragment of the *amiA* gene and re-extraction of the integrated fragment from the chromosome.

Support for an enzymatic process to excise and repair LE mismatched bases has come from the isolation of hex mutants, in which all single-site markers are transformed at the highest efficiency (27). At least two genes (*hexA* and *hexB*) control this system (10, 41). They have been cloned (3, 41, 44) and the purification of the gene products is in progress. An interesting property of *hex* genes is their anti-mutator effect. G. Tiraby and coworkers demonstrated that the mutation rate of *hex* strains is higher than *hex*⁺ strains (50, 53). The increase of spontaneous reversions of mutations corresponding to transition (LE) can be as high as a hundred-fold (28). Therefore it is likely that an enzymatic complex highly specific for some mismatched heteroduplexes is able to correct DNA by excising several thousand nucleotides around the recognized mismatch which serves as a signal.

The mechanism of preferential elimination of donor information by the Hex system is still obscure. Guild and Shoemaker (20) proposed that, once triggered by a mismatched base-pair, the Hex-dependent complex would search for nicks and would degrade the donor DNA. Another model implying a double-strand break resulting from the conversion process (51) has been excluded (20, 30).

Identification of the mismatched bases which are recognized and converted by the Hex system has been achieved by cloning and sequencing several mutants, wild type or revertants first at the *amiA* locus (7, 8, 9) and then at the *mal M* locus (28). Taken together, efficiency of transformation can be correlated to all possible mismatches. Among single base changes, all transition mutations belong to the LE class, both mismatches A/C and G/T being equally poorly efficient due to excision and repair. Transversion mutations never belong to the LE class because one or both mismatches are not well eliminated by the Hex system. When efficiency of individual strands could be measured (9), it was found that A/A and T/T mismatches are both partially excised. The majority of A/G and C/C mismatches are not at all excised, while some T/C and all G/G are excised (HE class). However the neighbouring sequences may modulate the efficiency of some transversion mutations. For example two VHE markers and one IE marker resulted from the transversion G/C \rightarrow T/A, whereas the same transversion at four other sites yielded, five HE configurations (9, 28, Gasc, A.M., Claverys, J.P. and Sicard A.M., unpublished results).

The transforming ability of heterologies due to deletions depends on their length: small deletions, i.e. 93 base-pairs at the *mal M* locus (28), 34 base-pairs at the *amiA* locus (7), 6 base-pairs at the *sul-d* locus (37), or 5 base-pairs at the *amiA* locus (García, P., Gasc, A.M. and Sicard, A.M., unpublished results), are transformed at the highest frequency (VHE). Four and 3 base-pair deletions have an intermediate efficiency (García, P., Gasc, A.M. and Sicard A.M., unpublished results). Five mutants obtained by quinacrine mutagenesis resulting from a ± 1 base-pair change (17) or a 2 base-pair insertion (9) belong to the LE class. Again neighboring sequences may modulate the efficiency of ± 1 base-pair mutants because a spontaneous deletion of C/C gave an intermediate efficiency (28) and the same deletion at the autolysine locus belongs to the VHE class (38). No simple rules such as G/C content or Z-DNA can explain the neighbor effect.

Localized conversion

We have studied an aberrant marker, *amiA36* that enhances recombination frequency when crossed with any other allele of the *amiA* gene. This effect is especially apparent for distances as short as 27 base-pairs where we observed 20 % wild-type recombinants instead of the expected 1 % (31). The mutation results from a C/G to A/T transversion in the sequence 5'...ATTCAT \rightarrow 5'...ATTAAT. This hyper-recombination is due to a conversion of *amiA36* to wild-type. This has been demonstrated in three-point crosses where it was found that the frequency of recombinants between outside markers is not increased when *amiA36* is in one of the molecules (48). Since conversion can occur even for 27 base-pairs, the observed hyper-recombination suggests that there is no co-conversion of these closely linked alleles (48). To estimate the length over which this event occurs we have isolated two mutants located 5 bases away on either side and one mutant 17 bases away from *amiA36*. Hyper-recombination almost completely disappears for the 5 base markers and is maintained at half the usual value for the marker located 17 bases away from *amiA36*. This shows that the converting system acts upon very few base-pairs (between 17 and 27 base-pairs).

Localized conversion does not require the action of either *hexA* or *hexB* active genes (31). In an *hex*⁺ recipient, when a nearby LE marker is crossed to *amiA36*, localized conversion is drastically depressed (31). This further suggests that localized conversion occurs at the heteroduplex stage since the long-patch process also acts at this level.

If localized conversion indeed occurs at the heteroduplex stage of recombination, we can ask the following question: are the two possible heteroduplexes equally able to induce conversion? Using separated and cross-reannealed DNA strands, artificial heteroduplexes were constructed. It was found that only one heteroduplex is preferentially converted. The localized conversion acts upon 5'...A.../3'...G... changing A to C (48). The reciprocal event, i.e. wild-type 5'...C to mutant 5'...A does not occur (Mostachfi, P. and Sicard, A.M., *Mol. Gen. Genet.*; in. press).

To determine the sequence required to trigger this conversion, site-specific mutagenesis has been used to create the same 5'ATTAAT mutation on another part of the *amiA* gene. Two-point crosses with nearby markers also show a high level of conversion (García, P. and Sicard, M., unpublished results). Thus this 6-base pair configuration is a sufficient signal for localized conversion. Changing individual bases within this segment results in decreased conversion frequencies to levels that depend on the mutations. Therefore localized conversion is not restricted to the original 6-base pair configuration, but can be induced by related sequences although at variable frequencies.

Nothing is known about the molecular process leading to localized conversion. It could be the result of excision of a few bases close to the mutation. This model would be similar to the short-patch repair system of pyrimidine dimers after U.V. irradiation of DNA. However, the U.V. repair system does not convert *amiA36* mutations since pneumococcal strains deficient in this process are still fully competent for conversion (Kyriakidis, X., and Sicard, A.M., unpublished results). An alternative hypothesis is that conversion results from the replacement of the mutant strand by the wild type strand of the same polarity (48).

Elimination of deletions

Deletions are neither recognized by the Hex system (26) nor by the localized conversion process. Is there another way to eliminate them during recombination? An answer to this question comes from the following observation: when fairly long deletions (more than a few hundred bases long) are carried on donor DNA to transform a recipient containing a linked point mutation, wild type recombinants occur in large excess (5). The frequency of these recombinants is the sum of recombinants expected from the distance between markers, plus a 20 % value. Such hyper-recombination disappears when a mismatched base in the cross induces the Hex —directed long-patch conversion process. This suggests that long heterologies resulting from deletions are processed during the pairing steps (29). As it has been found that co-conversion occurs when markers are very close to the deletion, it appears that the elimination event extends several scores of bases on both sides of the heterology (29). One can propose that potential spontaneous deletions may often be eliminated by a similar process. It seems that very short deletions (less than 34 base-pairs) escape this repair process.

Significance of conversions

The long-patch conversion system directed by *hex* genes acts in all natural pneumococcal isolates tested (52) and in *Haemophilus influenzae* (2). Studies based on transfection assays with phage heteroduplexes first on *Bacillus subtilis* (49) and then on *Escherichia coli* (43, 56, 57) show that an analogous process to the pneumococcal conversion is acting in those strains. Although the *E. coli* system requires the recognition of methylated sequences, it shares many similarities with the Hex system since the base specificity is nearly the same (13, 24). The mismatch specificity in two yeasts is also similar to the pneumococcal Hex system (25, 55). Therefore, longpatch conversion is widespread. It is likely that it has been created and preserved during evolution to eliminate spontaneous point mutations such as ± 1 base mutations and transitions because pneumococcal and *H. influenzae hex* mutants behave as mutator alleles (2, 50, 53) as do the homologous *E. coli* genes *mut L*, *mut S* and *mut H* (12). The discarded mutations are precisely the same ones that are converted to wild type during recombination.

The localized conversion process described in pneumococcus has been found in several independent strains (García, P. and Sicard, A.M., unpublished results). Moreover there is an analogous system in bacteriophage lambda recombination (33, 34). Although the signal sequence is quite different, most of the other properties are shared by the two systems, suggesting that these more recently discovered systems may be widespread. The ability of localized conversion to specifically convert mutant to wild type in families of related sequences may indicate a role in preventing these mutations. Likewise conversion of fairly long heterologies is not restricted to pneumococcus since it has been observed in fungi (21) and may explain stimulation of recombination in lambda-phage crosses (35).

Acknowledgments

This work has been supported by a CNRS grant: ATP «Organisation et expression du génome». I thank B. Stevens for her kind help in editing this manuscript.

References

1. Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exptl. Med.* **79**, 137-158.
2. Bagci, H. L. and Stuy, J. H. (1979). A hex mutant of *Haemophilus influenzae*. *Mol. Gen. Genet.* **175**, 175-179.
3. Balganesb, T. S. and Lacks, S. A. (1985). Heteroduplex DNA mismatch repair system of *Streptococcus pneumoniae*: cloning and expression of the *hexA* gene. *J. Bacteriol.* **162**, 979-984.
4. Claverys, J. P. and Lacks, S. (1986). Heteroduplex DNA base mismatch repair in bacteria. *Microb. Rev.* **50**, 133-165.
5. Claverys, J. P., Lefèvre, J. C. and Sicard, A. M. (1980). Transformation of *Streptococcus pneumoniae* with *S. pneumoniae* λ phage hybrid DNA: induction of deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3534-3538.
6. Claverys, J. P., Louarn, J. M. and Sicard, A. M. (1981). Cloning of *Streptococcus pneumoniae* DNA: its use in pneumococcal transformation and in studies of mismatch repair. *Gene* **13**, 65-73.
7. Claverys, J. P., Méjean, V., Gasc, A. M., Galibert, F. and Sicard, A. M. (1981). Base specificity of mismatch repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2267-2280.
8. Claverys, J. P., Méjean, V., Gasc, A. M. and Sicard, A. M. (1982). Relationship between base mismatches and integration efficiency in transformation of *Streptococcus pneumoniae*, p. 248-252. In D. Schlessinger (ed.), *Microbiology* - 1982. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

9. Claverys, J. P., Méjean, V., Gasc, A. M. and Sicard, A. M. (1983). Mismatch repair in *Streptococcus pneumoniae*: relationship between base mismatches and transformation efficiencies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5956-5960.
10. Claverys, J. P., Prats, H., Vasseghi, H. and Gherardi, M. (1984). Identification of *Streptococcus pneumoniae* mismatch repair genes by an additive transformation approach. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 91-96.
11. Claverys, J. P., Roger, M. and Sicard, A. M. (1980). Excision and repair of mismatched base pairs in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 191-201.
12. Cox, E. C. (1976). Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.* **10**, 135-156.
13. Dohet, C., Wagner, R. and Radman, M. (1985). Repair of defined single base-pair mismatches in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 503-505.
14. Ephrussi-Taylor, H. (1986). Genetic recombination in DNA-induced transformation of pneumococcus. IV. The pattern of transmission and phenotypic expression of high and low efficiency donor sites in the *amiA* locus. *Genetics* **54**, 211-222.
15. Ephrussi-Taylor, H. and Gray, T. C. (1966). Genetic studies of recombining DNA in pneumococcal transformation. *J. Gen. Physiol.* **49** (part 2) 211-231.
16. Ephrussi-Taylor, H., Sicard, A. M. and Kamen, R. (1965). The problem of relative efficiency of transforming factors. *Genetics* **51**, 455-475.
17. Gasc, A. M. and Sicard, A. M. (1986). Frameshift mutants induced by quinacrine are recognized by the mismatch repair system in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 269-273.
18. Gray, T. C. and Ephrussi-Taylor, H. (1967). Genetic recombination in DNA-induced transformation of pneumococcus. V. The absence of interference and evidence for the selective elimination of certain donor sites from the final recombinants. *Genetics* **57**, 125-153.
19. Green, D. M. (1959). A host specific variation affecting relative frequency of transformation of two markers in pneumococcus. *Exptl. Cell Res.* **18**, 466-480.
20. Guild, W. R. and Shoemaker, N. B. (1976). Mismatch correction in pneumococcal transformation: donor length and *hex*-dependent marker efficiency. *J. Bacteriol.* **125**, 125-135.
21. Hamza, H., Kalogeropoulos, A., Nicolas, A. and Rossignol, J. L. (1986). Two mechanisms for directional gene conversions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7386-7390.
22. Heidelberger, M. and Avery, D. T. (1923). Soluble specific substance of pneumococcus. *J. Exptl. Med.* **38**, 73-79.
23. Hotchkiss, R. D. and Marmur, J. (1954). Double marker transformation as evidence of linked factors in deoxyribonucleate transforming agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**, 55-60.
24. Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H. J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**, 879-887.
25. Kohli, J., Munz, P., Aebi, R., Amstutz, M., Gysler, C., Heyer, W. D., Lehmann, L., Schuchert, P., Szankasi, P., Thuriaux, P., Leupold, U., Bell, J., Gamulin, V., Hottinger, H., Pearson, D. and Söll, D. (1984). Intrallelic and intergenic conversion in three serine tRNA genes of *Schizosaccharomyces pombe*. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* **49**, 31-40.
26. Lacks, S. (1966). Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**, 207-235.
27. Lacks, S. (1970). Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation. *J. Bacteriol.* **101**, 373-383.
28. Lacks, S. A., Dunn, J. J. and Greeberg, B. (1982). Identification of base mismatches recognized by the heteroduplex DNA repair system of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell* **31**, 327-336.
29. Lefevre, J. C. (1986). Mise en évidence et étude de deux phénomènes d'hyperrecombinaison chez *Streptococcus pneumoniae*. Thèse d'Etat, Université Paul Sabatier, Toulouse France.
30. Lefevre, J. C., Claverys, J. P. and Sicard, A. M. (1979). Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. *J. Bacteriol.* **138**, 80-86.
31. Lefevre, J. C., Gasc, A. M., Burger, A. C., Mostachfi, P. and Sicard, A. M. (1984). Hyperrecombination at a specific DNA sequence in pneumococcal transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5184-5188.
32. Lerman, L. S. and Tolmach, L. J. (1957). Genetic transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta.* **26**, 68-82.
33. Lieb, M. (1983). Specific mismatch correction in bacteriophage lambda crosses by very short patch repair. *Mol. Gen. Genet.* **191**, 118-125.

34. Lieb, M. (1985). Recombination in the lambda repressor gene: evidence that very short patch (VSP) mismatch correction restores a specific sequence. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 465-470.
35. Lieb, M., Tsai, M. M. and Deonier, R. C. (1984). Crosses between insertion and point mutations in λ gene *cI*: stimulation of neighboring recombination by heterology. *Genetics* **108**, 277-289.
36. Litman, R. M. and Ephrussi-Taylor, H. (1959). Inactivation et mutation des facteurs génétiques de l'acide desoxyribonucléique du pneumocoque par l'ultraviolet et par l'acide nitreux. *Compt. Rend.* **249**, 838-840.
37. López, P., Espinosa, M., Greenberg, B. and Lacks, S. (1984). Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Abstr. 7th Europ. Meet. on Genetic Transformation*, Paris 63-65.
38. López, R., Sánchez-Puelles, J. M., García, E., García, J. L., Ronda, C. and García, P. (1986). Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 237-242.
39. Louarn, J. M. and Sicard, A. M. (1968). Transmission of genetic information during transformation in *Diplococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 683-689.
40. Louarn, J. M. and Sicard, A. M. (1969). Identical transformability of both strands of recipient DNA in *Diplococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 101-109.
41. Martin, B., Prats, H. and Claverys, J. P. (1985). Cloning of the *hexA* mismatch repair gene of *Streptococcus pneumoniae* and identification of the product. *Gene* **34**, 293-303.
42. Méjean, V. and Claverys, J. P. (1984). Effect of mismatched base pairs on the fate of donor DNA in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 467-471.
43. Nevers, P. and Spatz, H. C. (1975). *Escherichia coli* mutants *uvrD* and *uvrE* deficient in gene conversion of lambda heteroduplexes. *Mol. Gen. Genet.* **139**, 233-243.
44. Prats, H., Martin, B. and Claverys, J. P. (1985). The *hexB* mismatch repair gene of *Streptococcus pneumoniae*: characterization, cloning and identification of the product. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 482-489.
45. Sicard, A. M. and Ephrussi-Taylor, H. (1966). Recombinaison génétique dans la transformation chez le pneumocoque. Etude des réversions au locus *amiA*. *C. R. Acad. Sci.* **262**, 2305-2308.
46. Shoemaker, N. and Guild, W. (1974). Destruction of low efficiency markers is a slow process occurring at a heteroduplex stage of transformation. *Mol. Gen. Genet.* **128**, 283-290.
47. Sicard, M., Lefevre, J. C., Mostachfi, P., Gasc, A. M., Méjean, V. and Claverys, J. P. (1985). Long- and short-patch gene conversions in *Streptococcus pneumoniae* transformation. *Biochimie* **67**, 377-384.
48. Sicard, M., Lefevre, J. C., Mostachfi, P., Gasc, A. M. and Sarda, C. (1985). Localized conversion in *Streptococcus pneumoniae* recombination: heteroduplex preference. *Genetics* **110**, 557-568.
49. Spatz, H. C. and Trautner, T. A. (1970). One way to do experiments on gene conversion? Transfection with heteroduplex SPP1 DNA. *Mol. Gen. Genet.* **109**, 84-106.
50. Tiraby, G. and Fox, M. S. (1973). Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3541-3545.
51. Tiraby, G. and Fox, M. S. (1974). On the mechanism of the *hex* function in mutation and transformation of pneumococcus, p. 225-236. In R. Grell (ed.), *Mechanisms in recombination*. Plenum Press, New York.
52. Tiraby, G., Fox, M. S. and Bernheimer, H. (1975). Marker discrimination in DNA-induced transformation of various pneumococcus strain. *J. Bact.* **121**, 608-618.
53. Tiraby, G. and Sicard, A. M. (1973). Integration efficiencies of spontaneous mutant alleles of *amiA* locus in pneumococcal transformation. *J. Bacteriol.* **116**, 1130-1135.
54. Tiraby, G. and Sicard, A. M. (1973). Integration efficiency in DNA-induced transformation of pneumococcus. II. Genetic studies of mutant integrating all the markers with a high efficiency. *Genetics* **75**, 35-48.
55. White, J. H., Fogel, S. and Lusnak, K. (1985). Mismatch-specific postmeiotic segregation frequency in yeast suggests a heteroduplex recombination intermediate. *Nature* **315**, 350-352.
56. White, R. L. and Fox, M. S. (1974). On the molecular basis of high negative interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1544-1548.
57. Wildenberg, J. and Meselson, M. (1975). Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2202-2206.

The structure of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*

Monique Novaes-Ledieu*, Julio Alberto Martínez Cobo y Concepción García Mendoza

Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Velázquez, 144, 28006 Madrid, Spain.

(Received June 13/September 30, 1986)

Summary

The chemical composition of fractions extracted from the mycelial walls of *Agaricus bisporus* was studied. Attempts were made to locate these materials «in situ» by comparing electron micrographs of shadowed and sectioned cell walls. There are at least two chemically distinct species of carbohydrate polymers: one yielding mainly glucose with lower amounts of mannose, galactose and xylose and amino acids, and the other yielding chiefly N-acetylglucosamine with some glucose and amino acids. It was shown that none of these polymers constituted a completely physically distinct layer, but there do seem to be two regions at the outer and inner surfaces with apparently different properties. Materials which react with MnO_4K to produce an electron-dense material are located throughout the wall, but tend to be concentrated in the outer and inner regions. It was shown that fibers constitute one important fraction of the original wall material.

Key words: *Agaricus bisporus*, cell wall, polysaccharides.

Resumen

Se ha efectuado el estudio de la composición química de las fracciones extraídas de las paredes celulares de micelio de *Agaricus bisporus*. Se ha intentado localizar estos materiales «in situ», comparando las fotografías al microscopio electrónico de las paredes celulares sombreadas o seccionadas. Hay por lo menos dos clases químicamente distintas de polímeros de carbohidratos, una compuesta principalmente por glucosa con menores cantidades de manosa, galactosa y xilosa y aminoácidos y la otra formada mayoritariamente por N-acetilglucosamina con algo de glucosa y aminoácidos. Se ha podido comprobar que ninguno de estos polisacáridos constituye una capa física completamente distinta pero parecen existir dos regiones en la superficie externa e interna con propiedades aparentemente diferentes.

Los materiales que reaccionan con MnO_4K para producir zonas densas a los electrones se localizan en toda la pared pero parecen estar concentrados en las regiones externa e interna. Se ha podido comprobar que las fibras constituyen una fracción importante del material original de la pared.

* Corresponding author.

Introduction

The cell wall of fungi is a complex multilayered structure composed of at least two major polysaccharides and lesser quantities of proteins and lipids (6). The location of these compounds within the wall been studied by different techniques and researchers (15, 19) and striking correlations have been established between this composition and taxonomy, differentiation and morphogenesis.

The composition and structure of mycelial walls of several Basidiomycetes are now known (4, 9, 12, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 32) but little work has been carried out on the common mushroom *Agaricus bisporus* (13, 22, 25). We present here a chemical and structural study of the hyphal wall of vegetative mycelium of this fungus in order to relate it to the existing information in the Basidiomycetes.

Materials and methods

Organism and growth conditions

Agaricus bisporus CECT 2009 (ATCC 38258) was grown as described by Hanseler et al. (14).

Cell wall preparation and fractionation

The harvested mycelium at a concentration of 0.5 g wet weight/ml was disintegrated in an Omni-mixer homogenizer Ivan Sorvall (Mod. 17106, Newtown, Conn. USA) for 10 min at full speed, which has shown to preserve the loosely bound polysaccharide mucilage of the wall (3). After this treatment practically all the hyphae were disrupted as determined by phase contrast microscope examination. The hyphal wall fragments were further purified by repeated centrifugations and washes with distilled water until the wall material was completely clean as determined by phase contrast microscopic examination and no protein was detected in the supernatants.

Cell wall polysaccharides other than chitin were fractionated as follows: the cell walls (approximately 600 mg) were extracted with 300 ml distilled water at 60° C for 40 h and the residual walls washed twice with cold water. The supernatant and washes were concentrated in a vacuum to one-tenth of their original volume and dialyzed for 24 h against distilled water constituting the fraction I.

The residual walls were then extracted with 300 ml of N KOH at 20° C for 30 min and after centrifugation the walls were washed twice with N KOH, combining extract and washes. The solubilized material was acidified with acetic acid until pH 5 and left at 4° C overnight. The precipitate obtained was washed once with 0.5 N acetic acid and then washed with distilled water to remove acid (fraction II) and the supernatant obtained after acidification precipitated again with two volumes of 96 % ethanol at 4° C overnight. This precipitate was washed with the mixture ethanol: distilled water (2:1 v/v) (fraction III).

The residue from the previous treatment was extracted with 300 ml of N KOH at 60° C for 30 min, washed twice with N KOH and the collected supernatants precipitated

after neutralization with 96 % ethanol (2 v/v) at 4° C overnight. This precipitate was washed with the same mixture ethanol: distilled water (fraction IV).

The residual walls were extracted again with 300 ml N KOH at 60° C for 48 h and washed with alkaline solution. Extracts and washes were precipitated with alcohol as described above (fraction V) leaving an appreciable residue (fraction VI).

Chemical estimations of individual components of cell walls and fractions

Total hexose content of walls and fractions was determined by the anthrone method (11) using glucose as a standard. Total protein was measured by the method of Lowry et al. (18) using bovine serum albumin as a standard on hot alkaline extracts (N NaOH, 2 h at 100° C) of walls and on solubilized fractions. The aminosugar content was evaluated by the method of Chen & Johnson (10) on hydrolysates (6 N HCl at 105° C for 6 h in sealed evacuated ampoules) after removal the neutral sugars and amino acids according to Novaes-Ledieu & Garcia Mendoza (24) and also by a Biotronik amino acid analyzer LC 7000. Total lipids of walls were estimated gravimetrically after successive solvent extractions (7).

Analysis of the fractions

For identification of monosaccharides in the fractions the samples were hydrolysed (H₂SO₄ at different concentrations and times at 105° C in sealed evacuated ampoules and neutralized with barium hydroxide). After centrifugation reducing sugars were determined with a copper reagent (31) and the arsenomolibdate chromogen of Nelson (23) the optimal hydrolysis conditions being selected. The sugars converted into the corresponding alditol acetates (17) were identified by gas liquid chromatography on 3 % SP-2340 on 100/200 Supelcoport, 2 m × 2 mm glass column at 200° C to 230° at 10°/min with 3 min initial hold and 6 min final temp., flow rate 30 ml/min N₂, flame-ionization detector, sensitivity 10⁻¹⁰, sample size 4 μ in a Perkin-Elmer-Sigma 3 Gas Chromatograph. Peak assignments were made on the basis of sample coincidence with the relative retention times of standards.

Periodate oxidation was performed according to Aspinall & Ferrier (2). Smith degradation was carried out as reported by Sietsma & Wessels (28) and hydrolyzed in the optimal conditions selected previously. The resulting hydrolysate was again reduced with sodium borohydride, converted into the corresponding alditol acetates (17) and identified by GLC as described for neutral sugars.

Infrared (IR) spectra were obtained by the KBr technique on a Perkin Elmer 457 infrared spectrophotometer.

Electron microscopy

Purified whole and successive residual walls were fixed in 2 % potassium permanganate for 2.5 h at room temperature. The samples were then washed with water several times to eliminate the residual fixative. Dehydration was done in graded series of acetone, contrasted with 2 % uranyl acetate and embedded in araldite (Fluka, Switzerland). Thin sections of samples were cut with a glass knife in a Reichert Omu 2 Ultramicrotome and the specimens stained with lead citrate and examined in a Philips EM 300.

For shadowing the samples were placed into carbon-coated forward grids, shadowed with Au-Pd and examined in the same electron microscope.

Results

Chemical composition of mycelial walls of Agaricus bisporus

As a result of the chemical analysis of the whole walls it was found that neutral sugars were the main components (65-68 %) followed by aminosugars (11-13 %) and low quantities of proteins and lipids (7-9 and 6-9 %) respectively (Table 1).

TABLE 1

CHEMICAL COMPOSITION OF MYCELIAL WALLS OF *AGARICUS BISPORUS*.

Components	% dry weight cell wall
Neutral carbohydrates (Chung & Nickerson, 1954)	65-68
Hexosamines (Chen & Johnson, 1983)	11-13
Proteins (Lowry et al., 1951)	7- 9
Lipids (Bartnicki-Garcia & Nickerson, 1962)	6- 9

Glucosamine values obtained colorimetrically after hydrolysis have been corrected for their respective acetyl content.

Chemical composition and characterization of fractions

Extraction with distilled water at 60° C for 40 h removed a polysaccharidic fraction (14.1 % w/w) consisting of 50.2 % neutral sugars, 38.7 % protein and a small amount of glucosamine (3.2 %). Identification of monosaccharides in fraction I by gas-liquid chromatography is shown in Table 2. Glucose was the most abundant monomer, but mannose, galactose and xylose were also present. The gas chromatograms of the alditol acetates obtained after periodate oxidation and Smith degradation are presented in Table 3. About 50 % of alditol acetates corresponded to erythritol indicating that glucose is mainly linked in 1-4, together with some linkages in 1-3 and 1-6. Galactose and mannose were preferently 1-4 and 1-6 linked, whereas xylose was mainly in 1-3. The infrared spectrum of this fraction showed an absorption band at 890 cm⁻¹ characteristic of β -linked polysaccharides (5) (Fig. 1).

TABLE 2

MOLAR RATIO OF THE SUGARS DETECTED AS ALDITOL ACETATES BY GLC OF *A. BISPORUS* WALL FRACTION.

Alditol acetates	μmol				
	F I	F II	F III	F IV	F V
Xylitol	3.16	24.40	10.09	11.67	4.15
Mannitol	8.57	13.59	1.44	2.30	0.98
Galactitol	11.14	0	4.01	2.72	3.11
Glucitol	77.13	62.01	84.46	83.31	91.76

The cold alkali-soluble material precipitated by acidification corresponded to the fraction II which represented 8.9 % (w/w) and amounted to 82.3 % neutral carbohydrate, 5.8 % protein and traces of glucosamine. The composition of this fraction determined by gas liquid chromatography is shown in Table 2, showing glucose as the main sugar with considerable amounts of xylose and mannose. Gas liquid chromatography after Smith degradation revealed the major presence of glucitol together with mannitol, xylitol and glycerol (Table 3) which indicated the 1-3 as main type of linkage for glucose and mannose together with some 1-4 belonging to xylose. The spectrum of this fraction shows an absorption band at 850 cm^{-1} characteristic of polysaccharides having the α configuration (5) (Fig. 1).

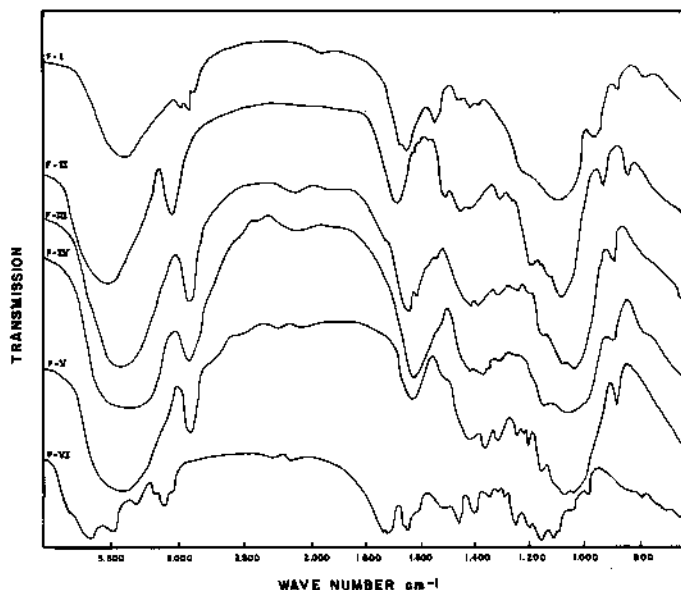


Fig. 1. Infrared spectra of the different fractions obtained from *A. bisporus* mycelial walls.

The cold alkali-soluble material precipitated with ethanol or fraction III (12.1 % w/w) accounted for 80.5 % neutral sugars, 7.9 % protein and traces of glucosamine. Gas liquid chromatography after hydrolysis showed that this fraction was mainly formed by glucose with some xylose and small amounts of galactose and mannose (Table 2). The molar ratio of the alditol acetates after periodate oxidation and Smith degradation are presented in Table 3. The main peak of this fraction was glucitol followed by glycerol and variable amounts of mannitol, galactitol, xylitol, erythritol thus indicating that glucose is mainly linked in 1-3 and 1-6 with some linkages in 1-4; galactose and mannose, little represented, are linked in the same way as glucose, and xylose is linked preferentially in 1-3. The infrared spectrum of this fraction is characteristic of a β -glucan with absorption band at 890 cm^{-1} , lacking the 850 cm^{-1} band characteristic of α -linked polysaccharides (5) (Fig. 1).

The hot alkali-soluble material (30 min) precipitated with ethanol corresponding to the fraction IV (6.8 % w/w) was composed of 78.5 % neutral carbohydrates, 9.9 % protein and traces of glucosamine. The detailed analysis of this fraction appears in Table 2, showing that glucose was the major component with a substantial amount of xylose and small proportions of galactose and mannose. Smith degradation and gas chromatography revealed the major presence of glycerol and glucitol besides xylitol, erythritol, threitol, mannitol and galactitol revealing that this fraction is linked similarly to the previous one. The infrared spectrum also resembles that obtained in fraction III and is characteristic of β -linked polysaccharides (5) (Fig. 1).

1N KOH at 60° C for 48 h followed by ethanol precipitation extracted the fraction V (18.1 % w/w) which amounted to 61.5 % neutral sugars, 5.2 % protein and 22.0 % glucosamine. Gas liquid chromatography of the hydrolysates of this fraction revealed once more that glucose was the most abundant sugar monomer, and in addition small quantities of mannose, galactose and xylose were detected (Table 2). The gas chromatograms of the alditol acetates obtained after periodate oxidation and Smith degradation are shown in Table 3. The presence of the same alditol acetates encountered before but in different proportions, showed that this fraction is mainly linked in (1-3), although also present are some 1-4 and 1-6 linkages. The infrared spectrum of this fraction is characteristic of a glucan having the β -configuration, absorption band at 890 cm^{-1} and lack of the 850 cm^{-1} (5) (Fig. 1).

TABLE 3

MOLAR RATIO OF THE SUGARS DETECTED AS ALDITOL ACETATES BY GLC AFTER SMITH DEGRADATION OF *A. BISPORUS* WALL FRACTIONS

Alditol acetates	μmol				
	FI	FII	FIII	FIV	FV
Glycerol	20.51	21.35	35.20	39.40	12.64
Erythritol	51.96	0	11.61	6.40	2.64
Threitol	3.68	0	4.36	2.54	1.55
Xylitol	2.03	5.01	9.65	12.37	2.91
Mannitol	1.47	13.04	0.91	1.60	0.98
Galactitol	3.80	0	0.52	1.18	1.55
Glucitol	16.55	60.60	37.75	36.51	75.53

The residual wall after the extractions described above represents 15.1 % of the initial wall and is formed by 19.8 % total neutral carbohydrates, 61.2 % glucosamine with traces of galactosamine and 2.8 % protein. A more detailed analysis of neutral sugars in this fraction has not been carried out because of its enrichment in chitinous material. The spectrum of this fraction showed absorption bands at 1550 and 1650 cm^{-1} characteristic of the-CO-NH-linkage of the chitin. It can be concluded that this cell wall fraction consists of a complex of a residual glucan plus chitin (Fig. 1).

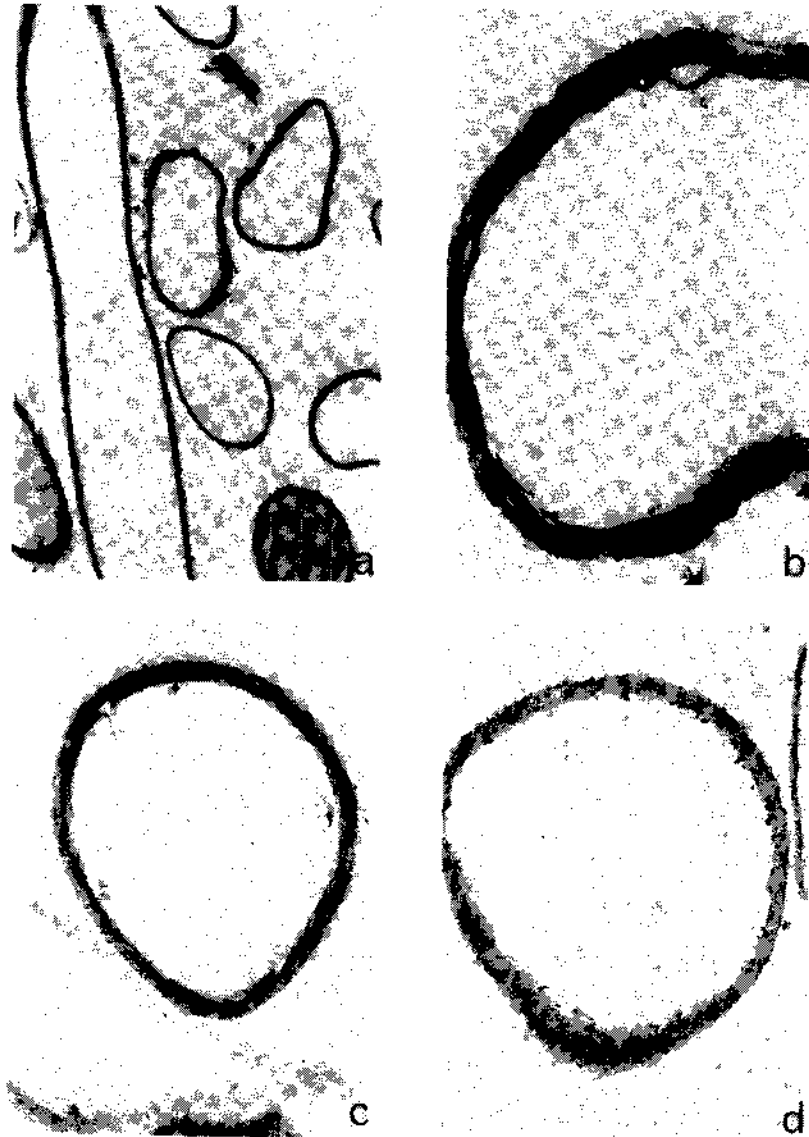


Fig. 2. Fine structure of *A. bisporus* mycelial walls (a x 3030) and residues from successive extractions: after hot distilled water (b x 10460); after cold and hot (30 min) KOH (c x 8560); after hot (48 h) KOH (d x 9630).

Electron microscopy

Sections of whole cell walls fixed with potassium permanganate show the presence of at least three different regions in the cell wall (Fig. 2b and c), an outer electron-dense region and an inner electron-dense region separated by a relatively less electron dense

region. The dimensions of these regions can vary from cell to cell but the overall thickness of the wall varies little from 80-100 nm. The external surface of the wall appears covered by a smooth layer (Fig. 2a).

Treatment of the walls with distilled water at 60° C for 40 h removes the water-soluble mucilaginous glucan whose chemical composition was determined as described above. Sections of walls after this treatment show that the loosely bound outermost layer practically disappeared (Fig. 2b).

When the pretreated walls were extracted for a short time with 1N KOH at 20° C and at 60° C some disturbance through the wall seems to occur, varying with the width of the regions (Fig. 2c). The material extracted corresponds mainly to α and β cementing glucans located from the surface towards the middle wall region.

Treatment of the residual walls with 1N KOH at 60° C for 48 h removes most of the material which was characterized as β glucan, leaving a residual wall with small dots covering all the preparation resembling fibers (Fig. 2d).

Shadow-cast preparations of the surface of control walls present a somewhat granular, amorphous appearance (fig. 3a). When mucilage is removed by hot water, shadow-cast preparations of walls presented clear microfibrillar architecture (Fig. 3b). When a short cold and hot alkali treatment is employed some irregularly roughened appearance could be distinguished on the surface of the walls having lost the previous fibrillar structure (Fig. 3c). A long hot alkali treatment resulted in the practical disappearance of the cementing material, remaining the chitin fibrillar network more tightly packed and damaged at the edges (Fig. 3d).

Discussion

Chemical analysis of mycelial cell walls of *Agaricus bisporus* showed that neutral sugars were the main components (65-68 %), followed by amino sugars (11-13 %), proteins (7-9 %), and lipids (6-9 %) on the basis of dry weight. These results resemble in some way those reported for commercial *A. bisporus* mycelial wall (22), *Agaricus bisporus* fruiting body walls (25) and are in good agreement with the basic pattern described for *Schizophyllum commune* (15, 28, 32).

Ultrastructural studies on the mycelial *A. bisporus* cell wall parallel to the chemical characterization of the isolated fractions can be related to the location of the different polysaccharides in the hyphal wall. The fraction I or mucilage appears to be loosely bound to the wall and can be removed easily from it during the isolation procedure. This polysaccharide has been isolated by means of a soft homogenization procedure (3) and characterized mainly as β (1-4) (1-3) (1-6) glucan on the basis of acid hydrolysis and periodate oxidation plus Smith degradation followed by liquid gas chromatography and infrared spectrophotometry. Similar results have been reported in *Schizophyllum commune* by Wessels et al. (32) and Sietsma & Wessels (28).

The cold alkali-soluble glucan is located at the outside of the hyphal wall and from the chemical studies carried out it can be suggested that two different components are associated in fraction II: an α (1-3) glucan and a xylomannan. The presence of α -glucan has been demonstrated in several fungal walls (4, 26, 32) showing a rodlet structure and

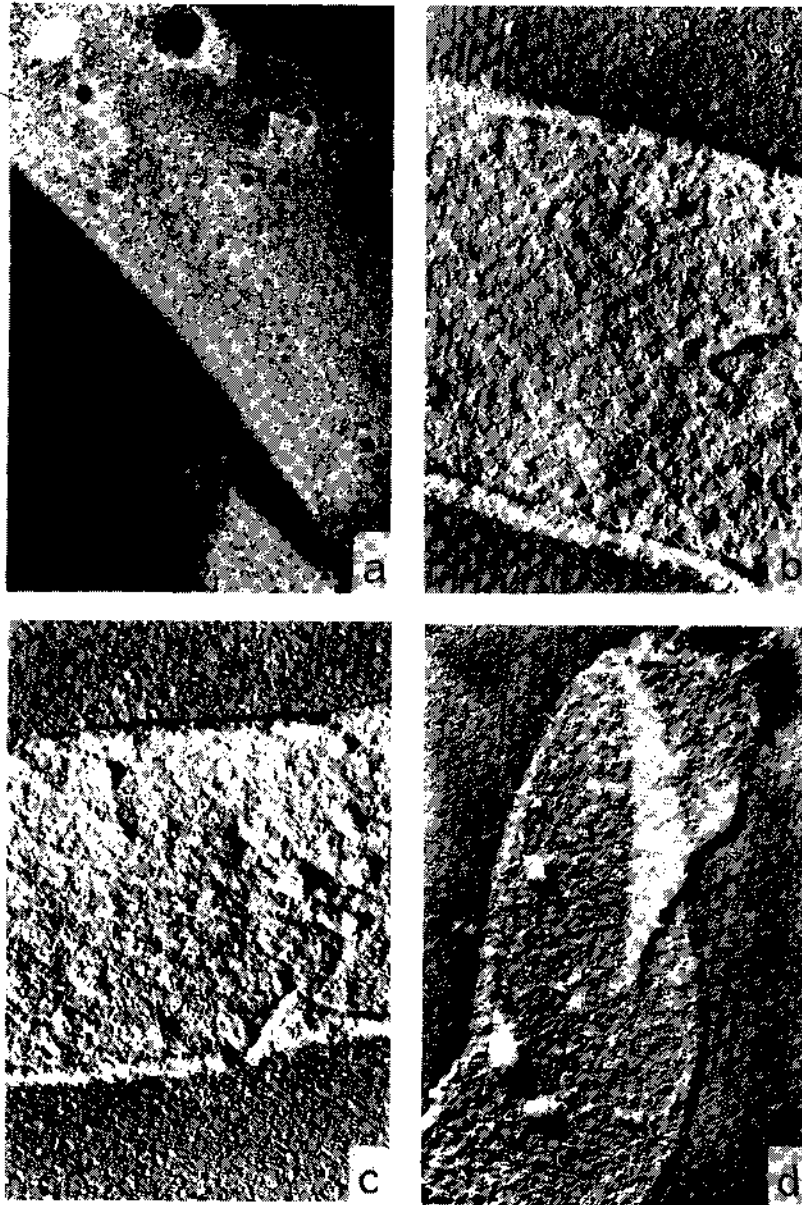


Fig. 3. Shadowed electron micrographs of *A. bisporus* mycelial walls (a x 7550) and residues from successive extractions: after hot distilled water (b x 9730); after cold and hot (30 min) KOH (c x 7040); after hot (48 h) KOH (d x 6680).

located at the surface of the wall. Xylomannan has been described as a component of the alkali-soluble cell wall fraction of *Poliporus tumulosus* (1), *Armillaria mellea* (8) and *Coprinus cinereus* (16). Another cold alkali-soluble glucan of hyphal walls of *Agaricus*

bisporus (fraction III) has been isolated in close association with the two polysaccharides described above and characterized as β (1-3) (1-6) (1-4) linked glucan.

The alkali soluble polysaccharide extracted at 60° C for a short time (fraction IV) is shown to be located from the surface towards the middle wall region and has been characterized also as β (1-3) (1-6) (1-4) linked glucan, whereas the alkali-soluble glucan extracted at the same temperature but for a long time (48 h; fraction V) is mainly β (1-3) and also (1-6) linked. The presence of β (1-3) (1-6) linked glucan is almost ubiquitous in the cell wall of fungi, only differing in the degree of branching. The residual material (fraction VI) corresponds to microfibrils of chitin embedded in a residual glucan matrix substance, probably with the same type of linkage β (1-3) (1-6).

The results of our work show quite clearly that changes in the procedure for extraction of cell walls with alkali can lead to considerable variations in the proportions of the various components which are extracted. It seems likely that different treatments with alkali promote varying degrees of hydrolysis of polysaccharide constituents and also that more than one chemically distinct entity is involved.

Cold KOH treatment has shown to reduce the thickness of the isolated walls and it appears to act on the outer surface of the wall fragments leaving it invariably rough while the inner surface remains smooth. Only a long KOH at 60° C treatment removes the major part of the glucan matrix in the fibrillar chitinous layer which on one side forms the compact inner surface of the wall but is looser and uneven on the outer wall side, probably interdigitating with the overlying outer KOH-soluble layer. The presence of sugar components other than glucose e-(especially mannose and xylose) may provide an extra wall resistance.

All these findings indicate that the *Agaricus bisporus* mycelial wall is structurally very similar to that of *S. commune* and other described Basidiomycetes and can be considered as the pattern in the higher fungi.

Acknowledgements

We thank A. Conde and M.A. Corrales for their skilful technical assistance and E. Blanco and M.D. Guirao in the electron microscope work. This research was supported by a grant from the CAICYT.

References

1. Angyal, S. J., Bender, V. J. and Ralph, B.J. (1974). Structure of polysaccharides from the *Polyporus tumulosus* cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 175-187.
2. Aspinall, G. O. and Ferrier, R. J. (1957). A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrate. *Chem. Ind.* 1216.
3. Avelán, M. A., Garcia Mendoza, C. and Novaes-Ledieu, M. (1986). Relationship between the presence of wall mucilage and the cellular disruption method employed in *Agaricus bisporus* tertiary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**, 101-104.
4. Bacon, J. S. D., Jones, D., Farmer, V. C. and Webley, D. M. (1968). The occurrence of α (1-3) glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 313-315.

5. Barker, S. A., Bourne, E. J. and Whiffen, D. M. (1956). Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods Biochem. Anal.* **3**, 213-245.
6. Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 87-108.
7. Bartnicki-Garcia, S. and Nickerson, W. J. (1962). Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 102-119.
8. Bouveng, H. O., Fraser, R. N. and Lindberg, B. (1967). Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholometaceae). Part II. Water-soluble mycelium polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **4**, 20-31.
9. Bush, D. A. and Horisberger, M. (1972). Structure of β -D-glucan from the mycelial wall of Basidiomycete QM 806. *Carbohydr. Res.* **22**, 361-367.
10. Chen, G. C. and Johnson, B. R. (1983). Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wooddecay fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 13-16.
11. Chung, C. W. and Nickerson, W. J. (1954). Polysaccharide synthesis in growing yeasts. *J. Biol. Chem.* **208**, 395-407.
12. Crook, E. M. and Johnston, I. R. (1962). The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. *Biochem. J.* **83**, 325-331.
13. Garcia Mendoza, C., Leal, J. A. and Novaes-Ledieu, M. (1979). Studies of the spore walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris*. *Can. J. Microbiol.* **25**, 32-39.
14. Hanseler, E., Nyhlen, I. E. and Rast, D. M. (1983). Isolation and properties of chitin synthetase from *Agaricus bisporus* mycelium. *Exp. Mycol.* **7**, 17-30.
15. Hunsley, D. and Burnett, J. H. (1970). The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* **62**, 203-218.
16. Kamada, T. and Takemaru, T. (1983). Modifications of cell-wall polysaccharide during stipe elongation in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 703-709.
17. Laine, R. A., Esselman, W. J. and Sweeley, C. C. (1972). Gas-Liquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymol.* **28**, 156-167.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. O., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
19. Mahadevan, P. R. and Tatum, E. L. (1967). Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. *J. Cell. Biol.* **35**, 295-302.
20. Manocha, M. S. (1965). Fine structure of the *Agaricus* carpophore. *Can. J. Bot.* **43**, 1329-1333.
21. Marchant, R. (1978). Wall composition of monokaryons and dikaryons of *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* **106**, 195-199.
22. Michalenko, G. O., Hohl, H. R. and Rast, D. (1976). Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **92**, 251-262.
23. Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method to the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
24. Novaes-Ledieu, M. and Garcia Mendoza, C. (1970). Biochemical studies on walls synthesized by *Candida utilis* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **61**, 335-342.
25. Novaes-Ledieu, M. and Garcia Mendoza, C. (1981). The cell walls of *Agaricus bisporus* and *Agaricus campestris* fruiting body hyphae. *Can. J. Microbiol.* **27**, 779-787.
26. O'Brien, R. W. and Ralph, B. J. (1966). The cell wall composition and taxonomy of some Basidiomycetes and Ascomycetes. *Ann. Bot.* **30**, 831-843.
27. Schaefer, H. P. (1977). An alkali-soluble polysaccharide from the cell walls of *Coprinus lagopus*. *Arch. Microbiol.* **113**, 79-82.
28. Sietsma, J. H. and Wessels, J. G. H. (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* **496**, 225-239.
29. Sietsma, J. H. and Wessels, J. G. H. (1979). Evidence for covalent linkages between chitin and β -glucan in a fungal wall. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 99-104.
30. Sietsma, J. H. and Wessels, J. G. H. (1981). Solubility of (1-3)- β -D/(1-6)- β -D-glucan in fungal walls: Importance of presumed linkage between glucan and chitin. *J. Gen. Microbiol.* **125**, 209-212.
31. Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
32. Wessels, J. G. H., Kreger, D., Marchant, R., Regensburg, B. A. and De Vries, O. M. H. (1972). Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* **273**, 346-358.

Relaciones antigénicas entre varias estirpes de *Naegleria*

Elena Zubiaur y Pilar Alonso*

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez, 144, 28006 Madrid.

(Recibido Octubre 31/Diciembre 19, 1986)

Summary

In previous papers different aspects of one strain of *Naegleria lovaniensis* (Aq/9/1/45D) and two strains of *N. gruberi* (1518/le and 1518/lf) have been studied. From the results obtained it can be concluded that each strain behaves differently; no more similarities have been found between both *N. gruberi* strains, than between each of these and *N. lovaniensis*. Such an event has prompted us to characterize their antigenic relationships by means of an immunoprecipitation assay (double diffusion in plate). Each antiserum was tested against the different antigenic extracts. For *N. lovaniensis*, besides the whole extract, two fractions (particulate and soluble) and their respective antisera were assayed separately. No reaction occurred between any of the anti-*N. lovaniensis* sera and either of the two *N. gruberi* extracts. The antiserum to *N. gruberi* 1518/lf reacted only with its homologue and with *N. lovaniensis* antigens. Both *N. lovaniensis* fractions share some antigenic components being more complex the antigenic structure of the soluble fraction. Therefore no more similarities occur between both *N. gruberi* strains than between each one and *N. lovaniensis*, rather *N. gruberi* 1518/le exhibits more antigenic relationships with *N. lovaniensis* than with 1518/lf strains. In view of such results the species *N. gruberi* should be taxonomically reconsidered, criterium shared by other authors.

Key words: *Naegleria lovaniensis*, *N. gruberi*, antigenic relationships.

Resumen

En trabajos anteriores hemos abordado el estudio de una estirpe de *Naegleria lovaniensis* (Aq/9/1/45D) y dos estirpes de *N. gruberi* (1518/le y 1518/lf) bajo diferentes aspectos. De los resultados obtenidos se deduce que cada una de las tres estirpes se comporta de manera diferente, no habiendo encontrado más analogía entre ambas estirpes de *N. gruberi*, que entre éstas y *N. lovaniensis*. Esto nos ha inducido a

* A quien se dirigirá la correspondencia.

caracterizar sus relaciones antigénicas mediante ensayos de inmunoprecipitación (doble difusión en placa), enfrentando cada uno de los antisueros con los diferentes extractos antigénicos. En el caso de *N. lovaniensis*, además del extracto completo se han ensayado separadamente una fracción particulada y otra soluble y sus correspondientes antisueros. Los sueros anti-*N. lovaniensis* aparentemente no reconocen a ningún componente antigénico de las dos estirpes de *N. gruberi*. El suero anti-*N. gruberi* 1518/lf reaccionó con todos los antígenos ensayados, y el suero anti-*N. gruberi* 1518/le sólo reaccionó con su antígeno homólogo y con los de *N. lovaniensis*. Las dos fracciones de *N. lovaniensis* poseen componentes antigénicos comunes aunque su identidad no es total, siendo más compleja la estructura antigénica de la fracción soluble. En resumen, no se ha encontrado una relación serológica más estrecha entre las dos estirpes de *N. gruberi*, que entre éstas y *N. lovaniensis*, sino que *N. gruberi* 1518/le parece estar más relacionada antigénicamente con *N. lovaniensis* que con la estirpe 1518/lf. A la vista de estos resultados la especie *N. gruberi* debería ser reconsiderada taxonómicamente, criterio compartido por otros autores.

Introducción

Al comprobar que determinadas estirpes de amebas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* eran causantes de meningoencefalitis fatales para el ser humano, se han intensificado los estudios sobre este tipo de pequeñas amebas de vida libre. No solamente se han investigado las estirpes patógenas sino también otras no patógenas estrechamente emparentadas con ellas. Prueba del interés que ha despertado este tema, son los numerosos trabajos que se han publicado en las últimas décadas, muchos de ellos recogidos en diversas revisiones (2, 3, 7, 8, 9, 12).

Desde hace varios años venimos trabajando con tres estirpes no patógenas de *Naegleria* (*N. lovaniensis* y *N. gruberi* 1518/lf y 1518/le) habiendo abordado su estudio bajo diferentes aspectos: carácter citopático y mecanismo de acción (16), intentos de estimular su posible patogenicidad (15), comportamiento frente a lectinas (17), y capacidad fagocítica en presencia de eritrocitos de diferentes tipos (1). De todos los resultados anteriores puede concluirse que no hay más similitud entre las dos estirpes de *N. gruberi* que entre éstas y *N. lovaniensis*.

En un estudio reciente sobre los aminoácidos libres de estas tres estirpes ha podido comprobarse, sin embargo, que parecen estar más relacionadas ambas estirpes de *N. gruberi* entre sí (Alonso, P. y Zubiaur, E. 1986, Res. XXV Coll. GPLF. p. 2).

A la vista de lo anteriormente indicado hemos considerado interesante estudiar en este trabajo el parentesco antigénico existente entre estas estirpes de *Naegleria*, para lo cual se ha utilizado la técnica de inmunodifusión en placa.

Materiales y métodos

Microorganismos

Se han utilizado dos estirpes de *Naegleria gruberi* (CCAP 1518/le y 1518/lf) y una de *N. lovaniensis* (Aq/9/1/45D) amablemente suministradas por el Dr. De Jonckheere. Estas tres estirpes han sido cultivadas a 30° C en medio axénico SCGYEM (15).

Preparación de antígenos

Las amebas se cultivaron en frascos Falcon que contenían 50 ml de medio. A las 96 h de cultivo, las amebas se recogieron por centrifugación a 1.500 g durante 15 min a 4° C y se lavaron tres veces con una solución de CNa 0,14 M. Una vez efectuado el recuento del número de células y ajustado a 8×10^6 células por mililitro, se obtuvieron los extractos celulares mediante ruptura por congelaciones y descongelaciones sucesivas. Los extractos antigénicos completos de cada estirpe así obtenidos se mantuvieron a -70° C hasta su uso.

En el caso de *N. lovaniensis*, además del extracto completo se obtuvieron, mediante centrifugación del homogenado a 41.000 g durante 1 h a 4° C, dos fracciones antigénicas: una soluble y otra particulada correspondientes al sobrenadante y al precipitado.

Preparación de antisueros

Para la obtención del suero específico de cada una de las tres estirpes de *Naegleria*, se utilizaron conejos albinos de 2-2,5 kg de peso.

Los sueros anti-*Naegleria* correspondientes a los extractos antigénicos completos, se obtuvieron inyectando a los conejos por vía intramuscular 0,5 ml de antígeno emulsionados con el mismo volumen de coadyuvante completo de Freund. En las sucesivas inoculaciones se inyectó el extracto antigénico emulsionado con el coadyuvante incompleto de Freund por la misma vía a intervalos semanales.

Los antisueros correspondientes a las fracciones soluble y particulada de *N. lovaniensis* se obtuvieron según el protocolo expuesto en la Tabla I.

A partir de la 3.ª semana y hasta un período de dos meses y medio, se efectuaron en todos los conejos sangrías en la vena marginal de la oreja para determinar el nivel de anticuerpos alcanzado durante la inmunización.

TABLA I

PROTOCOLO PARA LA OBTENCION DE LOS ANTISUEROS CORRESPONDIENTES A LAS FRACCIONES S Y P DE *N. LOVANIENSIS*

Fracción antigénica	Primera inoculación		Sucesivas inoculaciones	
	Dosis administrada	Vía de inoculación	Dosis administrada	Vía de inoculación
Soluble (S)	0,5 ml Ag 0,5 ml ccF*	Subcutánea	0,5 ml Ag 0,5 ml ciF**	Intramuscular
	0,5 ml Ag 0,5 ml ccF	Almohadillas plantares		
Particulada (P)	1 ml Ag	Intravenosa	1 ml Ag 1 ml ciF	Intramuscular
	1 ml Ag 1 ml ccF	Intramuscular		

*ccF. Coadyuvante completo de Freund

**ciF. Coadyuvante incompleto de Freund

Ensayo de inmunodifusión doble

Se utilizó el método desarrollado por Ouchterlony (10). Se prepararon portaobjetos cubiertos con una capa fina de agarosa al 1 % en regulador de veronal a pH 8,4, en los cuales se excavaron pocillos según la pauta mostrada en las Figs. 1 y 2. En cada uno de los pocillos centrales se colocó un antisuero y en los periféricos, los diferentes antígenos. Tanto antígenos como antisueros se utilizaron sin diluir. Los portaobjetos se incubaron a 37° C durante 24-48 h en cámara húmeda.

Resultados

Con el fin de determinar el parentesco inmunológico entre las tres estirpes de *Naegleria* estudiadas se han realizado ensayos de inmunodifusión doble enfrentando cada uno de los antisueros con los diferentes extractos antigénicos. En la Fig. 1 se muestran los resultados obtenidos al utilizar los extractos completos de cada estirpe y en la Fig. 2 se exponen los obtenidos al emplear una fracción soluble (S) y otra particulada (P) de *N. lovaniensis* en lugar del extracto completo.

Suero anti-*N. lovaniensis*

La reacción entre este antisuero y su antígeno homólogo completo dio como resultado la formación de tres bandas de precipitación anchas y bien marcadas sobre todo las dos más cercanas al pocillo del antisuero. En cambio frente a los antígenos heterólogos de ambas estirpes de *N. gruberi* no se apreció ninguna reacción (Fig. 1).

Cuando en vez del extracto completo de *N. lovaniensis* se utilizaron las fracciones S y P, y se ensayaron frente a los antisueros homólogos y heterólogos (Fig. 2) pudo comprobarse que el suero anti-S de *N. lovaniensis* mostraba mayor número de bandas con su antígeno homólogo S que con el P. Por el contrario en la reacción recíproca el suero anti-P daba un número mayor de bandas frente al antígeno S que frente al P. En

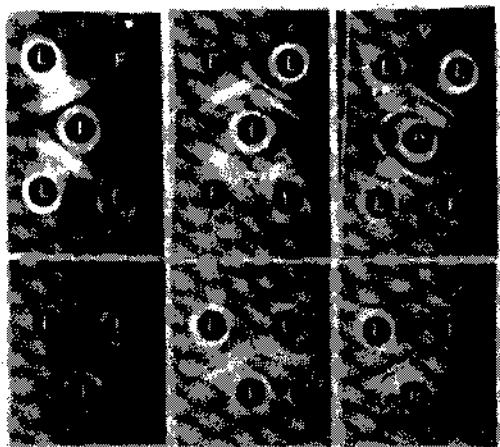


Fig. 1. Reacciones de inmunoprecipitación entre los extractos completos de las tres estirpes de *Naegleria* (letras mayúsculas) y sus correspondientes antisueros (letras minúsculas). L y l: *N. lovaniensis*; F y f: *N. gruberi* 1518/IF; E y e: *N. gruberi* 1518/IE.

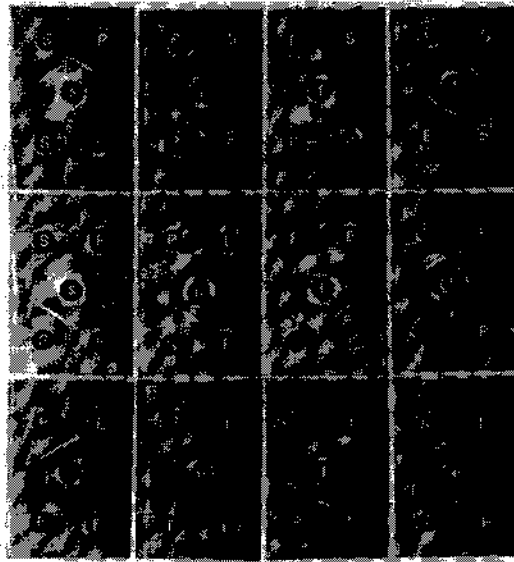


Fig. 2. Reacciones de inmunoprecipitación. El extracto de *N. lovaniensis* está separado en una fracción soluble (S) y otra particulada (P); sus correspondientes antisueros están representados por (s) y (p). El resto como en Fig. 1.

ambos casos una de las bandas era continua lo cual indica identidad antigénica entre algún componente de ambas fracciones.

Con los antisueros S y P anti-*N. lovaniensis* tampoco se obtuvo reacción cruzada frente a los antígenos de las dos estirpes de *N. gruberi* (Fig. 2).

Suero anti-*N. gruberi* 1518/lf

Cuando se utilizaron los extractos antigénicos completos de las tres estirpes pudo observarse claramente (Fig. 1) que este antisuero reaccionó tanto con su antígeno homólogo como frente a los dos heterólogos de modo equiparable, aunque la distribución de bandas era diferente en cada caso. En cambio cuando este antisuero se enfrentó a cada una de las dos fracciones antigénicas de *N. lovaniensis* (Fig. 2) la respuesta fue muy diferente; frente a la fracción S se pusieron de manifiesto cuatro bandas de precipitinas y frente a la particulada, solamente una.

TABLA 2

NUMERO MINIMO DE SISTEMAS ANTIGENO-ANTICUERPO ENTRE LAS TRES ESTIRPES DE *NAEGLERIA* (EXTRACTOS COMPLETOS)

Antisueros	Antigenos		
	N. lovaniensis	N. gruberi/lf	N. gruberi/le
N. lovaniensis	3	—	—
N. gruberi/lf	4	4	3
N. gruberi/le	3	—	3

Suero anti-*N. gruberi* 1518/le

Este antisuero reaccionó frente a su antígeno homólogo y al antígeno completo de *N. lovaniensis* de modo similar, aunque la distribución de bandas de precipitación era diferente en uno y otro caso (Fig. 1). En cambio cuando se utilizaron las dos fracciones antigénicas de *N. lovaniensis* (Fig. 2) el suero anti-*N. gruberi* 1518/le reaccionó de distinta manera: frente a la fracción S mostró dos bandas de precipitinas, continuando una de ellas con una de las bandas obtenidas en la reacción homóloga, mientras que frente a la fracción P solamente se reveló una banda. Por el contrario no se observó ninguna reacción frente al antígeno de *N. gruberi* 1518/lf.

El resumen de todas estas reacciones se muestra en las tablas 2 y 3, donde se indica el número mínimo de sistemas antígeno-anticuerpo que puede establecerse entre las tres estirpes de *Naegleria* contabilizando el número de bandas de precipitación observadas.

TABLA 3

NUMERO MINIMO DE SISTEMAS ANTIGENO-ANTICUERPO ENTRE LAS TRES ESTIRPES DE *NAEGLERIA* (EL EXTRACTO DE *N. LOVANIENSIS* ESTA SEPARADO EN UNA FRACCION SOLUBLE Y OTRA PARTICULADA)

Antisueros		Antígenos			
		N. lovaniensis		N. gruberi/lf	N. gruberi/le
		f.s.	f.p.		
N. lovaniensis	f.s.	4	1	—	—
	f.p.	3	2	—	—
N. gruberi/lf		4	1	4	3
N. gruberi/le		2	1	—	3

Discusión

Los resultados obtenidos anteriormente con estas tres estirpes de *Naegleria* (1, 16, 17) y la dificultad para distinguirlas morfológicamente (15) nos ha llevado a analizarlas inmunoquímicamente y poder caracterizar así cada una de ellas y determinar su parentesco. Existen escasos datos sobre el particular, y la mayoría de ellos se refieren solamente a reacciones inmunológicas entre alguna de estas estirpes y las estirpes patógenas (6, 13, 14).

La observación de los resultados obtenidos en este análisis serológico nos permite concluir que los antisueros anti-*N. lovaniensis*, tanto el correspondiente al extracto completo como a las fracciones S y P, al parecer no reconocen a ningún componente antigénico de las dos estirpes de *N. gruberi*; si existiera alguna reacción sería a un nivel muy bajo, no detectable con la técnica utilizada. Ambas fracciones de *N. lovaniensis* poseen algún componente antigénico común aunque su identidad no es total. Al parecer es más compleja la fracción S, puesto que enfrentada a los diferentes antisueros siempre revela mayor número de bandas de precipitación que la fracción P.

El suero anti-*N. gruberi* 1518/lf reconoce a componentes antigénicos de las tres estirpes de *Naegleria* ensayadas, y por último el suero anti-*N. gruberi* 1518/le sólo

reconoce a su antígeno homólogo y a los de *N. lovaniensis*. Por tanto las estructuras antigénicas de las dos estirpes de *N. gruberi* no parece que estén más estrechamente relacionadas entre sí que con la de *N. lovaniensis*. En realidad *N. gruberi* 1518/le comparte, al parecer, mayor número de determinantes antigénicos con *N. lovaniensis* que con *N. gruberi* 1518/lf.

Es pertinente indicar aquí que en un estudio anterior sobre el comportamiento de estas tres estirpes de *Naegleria* frente a diferentes lectinas (17) había más similitud entre *N. lovaniensis* y *N. gruberi* 1518/le que entre las dos estirpes de *N. gruberi*.

A la vista de estos resultados, la especie *N. gruberi* debería ser reconsiderada taxonómicamente, criterio compartido por otros autores (4, 5, 11) utilizando otro tipo de ensayos.

Nota: Recientemente ha sido publicado un trabajo de Winiiecka (Acta Protozool., 25, 55, 1986) en el que se muestra el parentesco antigénico existente entre varias estirpes de *N. fowleri* y la estirpe EG de *N. gruberi*, pero no hace referencia a ninguna de las estirpes estudiadas por nosotras.

Bibliografía

1. Alonso, P. and Zubiaur, E. (1985). Phagocytic activity of three *Naegleria* strains in the presence of erythrocytes of various types. *J. Protozool.* **32**, 661-664.
2. Carter, S. A. (1978). Primary amoebic meningoencephalitis: (a "new" disease associated with water pollution). *Int. J. Environ. Stud.* **12**, 199-205.
3. Culbertson, C. G. (1981). Amebic meningoencephalitis. *Antibiot. Chemother.* **30**, 28-53.
4. Daggett, P. M. and Nerad, T. A. (1983). The biochemical identification of vahlkampfiid amoebae. *J. Protozool.* **30**, 126-128.
5. De Jonckheere, J. F. (1982). Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol.* **133 A**, 319-342.
6. De Jonckheere, J. F., Pernin, P., Scaglia, M. and Michel, R. (1984). A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrate the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* **31**, 324-331.
7. Fulton, C. (1970). Amoeboflagellates as research partners: the laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. In: D. M. Prescott (ed.) *Methods in cell Physiology*. **4**, 341-476. Academic Press, New York.
8. Jadin, J. B. (1973). De la méningo-encéphalite amibienne et du pouvoir pathogène des amibes «limax». *Ann. Biol.* **12**, 305-342.
9. John, D.T. (1982). Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**, 101-123.
10. Ouchterlony, O. (1967). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: D. M. Weir (ed.) *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh.
11. Pernin, P., Cariou, M. L. and Jacquier, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* **32**, 592-603.
12. Schuster, F. L. (1979). Small amebas and amebo-flagellates. En: M. Levandowsky and S. H. Hutner (eds.) *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. **1**, 216-276. Academic Press.
13. Stevens, A. R., De Jonckheere, J. F. and Willaert, E. (1980). *Naegleria lovaniensis* sp. n.: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasitol.* **10**, 51-64.
14. Willaert, E., Jadin, J. B. et Le Ray, D. (1972). Structures immunochimiques comparées d'amibes du genre *Naegleria*. *Protistologica* **8**, 497-504.
15. Zubiaur, E. y Alonso, P. (1983a). Estudio comparativo de tres estirpes de *Naegleria*. *Microbiol. Españ.* **36**, 103-114.
16. Zubiaur, E. and Alonso, P. (1983b). Cytopathogenicity of three *Naegleria* strains. *Protistologica* **19**, 495-502.
17. Zubiaur, E. and Alonso, P. (1985). Behaviour of *Naegleria lovaniensis* and *N. gruberi* (1518/le and 1518/lf) against different lectines. *Protistologica* **21**, 267-272.

Aislamiento de un mutante de *Trichoderma pseudokoningii* hiperproductor de celulasas

Mercedes Zaldivar*, Jeannette Steiner, Mercedes Musalem e Inés Contreras

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile. Casilla 233, Santiago*

(Recibido Octubre 8, 1986/Enero 16, 1987)

Summary

The present study describes the production of cellulases by a native strain of *Trichoderma pseudokoningii* in the presence and absence of a catabolic repressor. We report a plate assay for selecting fungal mutants capable of synthesizing the cellulase enzymes under conditions of catabolite repression. This method was used for the selection of catabolite repression-resistant mutants. One mutant, B-1, secreted 3.3 times the extracellular protein and 3 times the endoglucanase and filter paper activity in submerged cultures when compared with the wild type strain. The cellobiase activity remained at similar levels in both strains. Although this mutant was isolated as a cellulase producer in the presence of 500 mM glycerol on agar plates, in liquid medium containing the repressor B-1 it exhibits only partial derepression of the cellulase complex.

Key words: cellulases, mutants, Trichoderma.

Resumen

En este trabajo se estudió la producción de celulasas por una especie nativa de *Trichoderma pseudokoningii* en presencia y ausencia de un represor catabólico. Se desarrolló un medio de cultivo sólido que permitió aislar un gran número de colonias en forma simultánea y observar la producción de celulasas extracelulares en condiciones reprimidas y desreprimidas. Este medio fue utilizado para la selección de mutantes resistentes a la represión catabólica. Se aisló un mutante, B-1, que secreta 3,3 veces más proteína extracelular y produce actividades de endoglucanasa y degradativa del papel de filtro 3 veces superiores a la cepa silvestre en cultivos sumergidos con celulosa como única fuente de carbono. La actividad de celobiasa muestra niveles similares para ambas cepas. Aunque este mutante fue seleccionado por su capacidad de producir celulasas en medio sólido con glicerol 500 mM, en medio líquido en presencia del represor muestra una desrepresión sólo parcial del complejo celulasas.

* A quien se dirigirá la correspondencia.

Introducción

La bioconversión de los residuos celulósicos presenta un gran potencial en la producción de azúcares solubles, utilizables para la obtención de proteína unicelular, productos químicos y etanol (8, 13). La sacarificación enzimática de la celulosa se lleva a efecto por la acción del complejo celulasa, formado por las actividades de endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasa, que actúan en conjunto en forma sinérgica en la hidrólisis de la celulosa (6).

La disponibilidad de celulasas con alta actividad es esencial para obtener una adecuada sacarificación de la celulosa. Aunque se ha aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizarla, no todos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar «in vitro» la celulosa insoluble a azúcares fermentables (10, 24). Por este motivo, es de gran interés seleccionar nuevas especies de microorganismos celulolíticos, y mejorar su producción de celulasas, ya sea por optimización de las condiciones de cultivo o por mutación.

Las celulasas fúngicas son enzimas inducibles que se producen cuando el medio de cultivo contiene celulosa o celobiosa. Por otra parte, estas enzimas son sensibles a la represión catabólica ejercida por glucosa o sus catabolitos y están sujetas a inhibición por los productos finales de hidrólisis (19). La complejidad de los mecanismos que controlan la síntesis y la actividad del complejo celulasa permite abordar la obtención de mutantes reguladores que produzcan mayores niveles de estas enzimas (3, 14, 17). Sin embargo, se han planteado problemas en la selección de estos mutantes debido a la resistencia de la celulosa cristalina a la hidrólisis y al rápido crecimiento de los hongos en medio sólido.

En este trabajo se describe la utilización de un medio sólido para la selección de mutantes capaces de sintetizar las enzimas del complejo celulasa en condiciones de represión catabólica. Este método permitió el aislamiento de un mutante de *Trichoderma pseudokoningii* hiperproductor y parcialmente resistente a la represión catabólica.

Materiales y métodos

Microorganismo

Se usó una cepa de *Trichoderma pseudokoningii* aislada de una muestra de suelo del Sur de Chile. Esta especie fue seleccionada por su capacidad de crecer en un medio sólido que contenía celulosa microcristalina como única fuente de carbono (20). La cepa se conservó por siembras periódicas en estrias de agar patata dextrosa (Difco) y se mantuvo a 4 °C.

Detección de la producción de celulasas en medio sólido

Con el objeto de visualizar la hidrólisis de la celulosa en medio sólido se agregó al medio de Mandels (12) 17,5 g/l de agar y 5 g/l de celulosa pretrataada con ácido fosfórico según el método de Tansey (25). Con el fin de restringir el desarrollo micelial y obtener colonias aisladas se usó una modificación del método de Schimenti et al. (23) que consiste en adicionar al medio 1 g/l

de desoxicolato de sodio (Difco) y 0,4 g/l de ácido N-dimetil aminosuccinámico, B-Nine (Carolina), ajustando el pH a 6,5 después de esterilizar. Las placas se sembraron con una suspensión de esporas preparada según el método de la AOAC (1) y se incubaron a 28 °C hasta la aparición de estructuras fructificantes. Luego se dejaron a 50 °C durante 18 horas para acelerar la acción de las celulosas y obtener rápidamente zonas de aclaramiento de la celulosa alrededor de las colonias.

Mutagénesis y selección de mutantes resistentes a la represión catabólica

La mutagénesis se efectuó incubando una suspensión de esporas con 200 µg/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG, Sigma) a 37° C. Se determinó la cinética de muerte tratando 5×10^8 esporas por ml con NG a distintos tiempos y sembrando los sobrevivientes en placas de agar desoxicolato (Difco). Para los experimentos de mutagénesis se eligió aquel tiempo de incubación que producía un 90 % de mortalidad. Las esporas mutagenizadas se sembraron en placas de agar desoxicolato y se incubaron a 28° C durante 5 días. Las colonias desarrolladas fueron replicadas a placas de agar con celulosa, desoxicolato sódico y B-Nime con y sin la adición de glicerol 500 mM como represor catabólico. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban halos de mayor diámetro en las placas de celulosa y que además formaban halos en las placas de celulosa y glicerol. Estas se cultivaron en medio líquido de Mandels con celulosa microcristalina para cuantificar su producción de celulasas extracelulares.

Producción de celulasas en medio líquido.

Con el objeto de cuantificar la producción de celulasas por las cepas silvestre y mutantes, éstas se cultivaron en medio líquido de Mandels con 7,5 g/l de celulosa microcristalina (Sigmacell type 50). Matraces con 200 ml de medio se inocularon con 8×10^6 esporas y se incubaron a 28° C con agitación orbital durante 10 días. Cada 2 días se tomaron muestras, se centrifugaron para eliminar sólidos y en los sobrenadantes se determinaron las actividades celulolíticas y proteína soluble. Con el fin de estudiar la producción de enzimas en presencia de un represor catabólico se cultivaron los hongos en el mismo medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes de glicerol.

Determinación de actividades enzimáticas y proteínas

La actividad de endoglucanasa (carboximetilcelulasa) se ensayó por el método propuesto por Novo Industry (Novo Analytical method report AF 149/5-G-B, 1978). La actividad de celobiasa se midió incubando una alícuota del sobrenadante con celobiosa al 0,5 % en tampón acetato 0,05 M pH 5,0 a 50° C durante 10 minutos. La glucosa liberada se determinó por el método de glucosa oxidasa peroxidasa (Sigma). La actividad degradativa sobre papel de filtro (FPA) se ensayó según una modificación del método de Mandels (13), que consiste en incubar 0,5 ml de una dilución del sobrenadante con 50 mg de papel filtro en tampón

acetato 0,04 M pH 5,0 a 50° C por 60 minutos. Los azúcares reductores liberados se determinaron por el método de Somogyi-Nelson (21). Paralelamente a cada determinación enzimática se midió la concentración de azúcares reductores o glucosa presentes en los sobrenadantes (blancos muestra). Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales por ml (U/ml) definidas como micromoles de azúcares reductores expresados como glucosa liberados por minuto. Se midió además proteína soluble por el método de Lowry (9) después de precipitar con ácido tricloroacético al 12 % usando seroalbúmina bovina como estándar.

Resultados

Detección de la producción de celulasas en medio sólido.

Con objeto de abordar la obtención de mutantes desreprimidos, se utilizó un medio que contenía celulosa pretratada con ácido fosfórico, la cual es degradada fácilmente por los microorganismos que atacan la celulosa nativa (10). Para restringir el tamaño de las colonias, se agregó a las placas desoxicolato de sodio y B-Nine. Este medio limitó efectivamente el crecimiento fúngico, desarrollándose colonias pequeñas rodeadas de halos de hidrólisis de la celulosa. Sin embargo, los halos fueron parcialmente enmascarados por la aparición de un precipitado después de incubar las placas a 50° C (Fig. 1-A). Este problema fue solucionado al aumentar el pH del medio a 6,5. Como se observa en la Figura 1-B, se obtuvieron colonias pequeñas, de diámetros de alrededor de 6 mm, de bordes bien delimitados, rodeadas de halos de hidrólisis nítidos de 2 mm. Cabe señalar que el pH 6,5, aunque superior al óptimo de las actividades del complejo celulasa (5,5), no afecta la detección de las celulasas extracelulares y contribuye a limitar el desarrollo micelial del hongo.

Al agregar glicerol (500 mM) a las placas de agar celulosa-desoxicolato-B-Nine se desarrollaron colonias de similar tamaño, pero no se observaron halos alrededor de las colonias. Estos resultados indican que el glicerol reprime la producción de celulasas en medio sólido. Por lo tanto, este medio de cultivo fue utilizado posteriormente para la selección de mutantes resistentes a la represión catabólica, ya que permitió aislar un gran número de colonias en forma simultánea y detectar su producción de celulasas extracelulares en condiciones reprimidas y desreprimidas.

Mutagénesis y selección de mutantes resistentes a la represión catabólica.

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la selección de mutantes resistentes a la represión catabólica. En la placa de réplica de celulosa en ausencia de glicerol (Fig. 2-A) se observan zonas de hidrólisis alrededor de todas las colonias, una de las cuales presenta un halo de mayor diámetro. En la placa que contiene glicerol (Fig. 2-B) esta colonia es la única capaz de hidrolizar la celulosa en condiciones reprimidas.

De un total de 1.500 colonias replicadas se seleccionaron 12 con estas características que se cultivaron en medio líquido con celulosa microcristalina para cuantificar su producción de celulasas. De entre estos mutantes se eligió uno que presentó un aumento de 1,6 veces en la actividad de endoglucanasa y de 1,7 veces en la FPA respecto a la cepa parental. Esta cepa se sometió a una nueva mutagénesis en las mismas condiciones

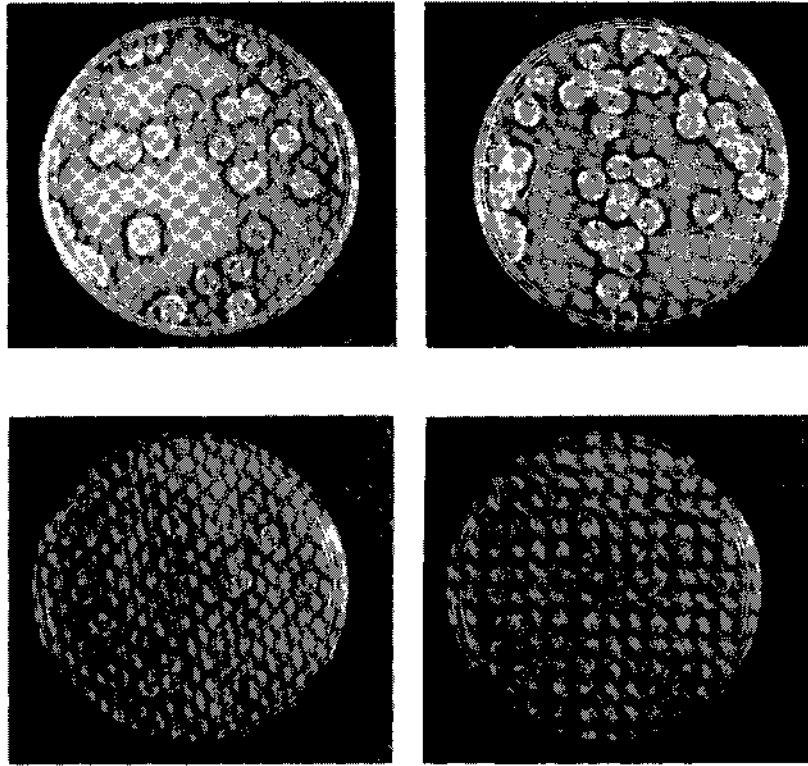


Fig. 1. Desarrollo de *T. pseudokoningii* en medio sólido con celulosa pretratada (5 g/l) suplementado con desoxicolato de sodio (1 g/l) y B-Nine (0,4 g/l). 1-A: pH 5,5; 1-B: pH 6,5.

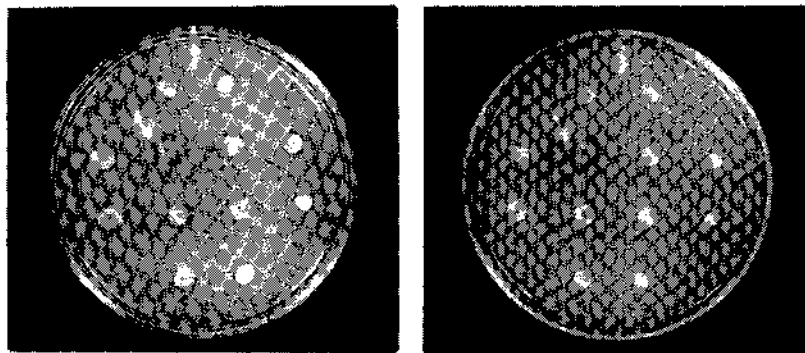


Fig. 2. Selección de mutantes de *T. pseudokoningii* resistentes a la represión catabólica. 2-A: Agar celulosa-desoxicolato de sodio B-Nine; 2-B: Agar celulosa-desoxicolato de sodio B-Nine + glicerol 500 mM.

anteriores. Los conidios sobrevivientes se sembraron en placas de agar celulosa-desoxicolato-B-Nine suplementadas con glicerol 500 mM. Se seleccionaron aquellas colonias que mostraron mayores halos de hidrólisis después de incubación a 50° C para medir su producción de celulasas en cultivos líquidos.

Las actividades enzimáticas de una de estas cepas, B-1, y de la cepa silvestre obtenidas en condiciones desreprimidas al cabo de 10 días de fermentación se muestran en la Tabla 1. El mutante B-1 presenta un aumento de 3 veces en la actividad de endoglucanasa y de 3,1 veces en la FPA respecto a la cepa silvestre. La producción de celobiasa muestra niveles sólo levemente superiores (1,5 veces). Además se observa que el mutante B-1 libera 3,3 veces más proteína extracelular que la cepa silvestre.

TABLA 1

ACTIVIDADES CELULOLITICAS PRODUCIDAS POR *T. PSEUDOKONINGII*.

	Endoglucanasa		Celobiasa		FPA		Proteína mg/ml
	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	
Cepa silvestre	5.3	23.0	0.13	0.56	0.14	0.61	0.23
Mutante B-1	15.9	20.6	0.20	0.26	0.44	0.57	0.77

a: las actividades enzimáticas fueron ensayadas en sobrenadantes obtenidos al cabo de 10 días de cultivo en medio líquido de Mandels con 7.5 g/l de celulosa microcristalina. Los resultados representan el promedio de tres experimentos.

FPA: actividad degradativa sobre papel filtro.

Cinética de la producción de celulasas en condiciones reprimidas y desreprimidas.

Se estudió el efecto de glicerol como represor catabólico sobre la cinética de producción de celulasas por la cepa silvestre y el mutante B-1. Para ello ambas cepas se cultivaron en medio líquido con concentraciones crecientes de glicerol y se midieron las actividades enzimáticas en los sobrenadantes del cultivo a intervalos de 2 días.

Los resultados de la producción de endoglucanasa se muestran en la Figura 3. Se puede observar que en la cepa silvestre (Fig. 3-A) la actividad enzimática se eleva entre el cuarto y sexto día de fermentación alcanzando un valor final de 5 U/ml. En presencia de glicerol 25 mM el nivel máximo llega a sólo 2,1 U/ml. Concentraciones superiores de glicerol reprimen completamente la actividad de endoglucanasa. En ausencia del represor, el mutante B-1 (Fig. 3-B) produce 18,2 U/ml a los 10 días de incubación. Como se observa en la figura ya al segundo día se alcanzan niveles enzimáticos iguales a los máximos obtenidos para la cepa silvestre. La adición de glicerol 25 y 50 mM reduce levemente la producción de enzima, lográndose un 83 % de la actividad obtenida en condiciones desreprimidas. Sólo al aumentar la concentración de glicerol a 100 mM se aprecia una disminución significativa de la actividad de endoglucanasa, llegando a un 27 % del control. Concentraciones de glicerol 200 mM y superiores reprimen completamente la producción de esta enzima.

La Figura 4 muestra los resultados de la actividad de celobiasa. En la cepa silvestre (Fig 4-A) ésta alcanza un valor de 0,13 U/ml al décimo día de fermentación en condiciones desreprimidas. La presencia de glicerol 25 mM reprime la producción de

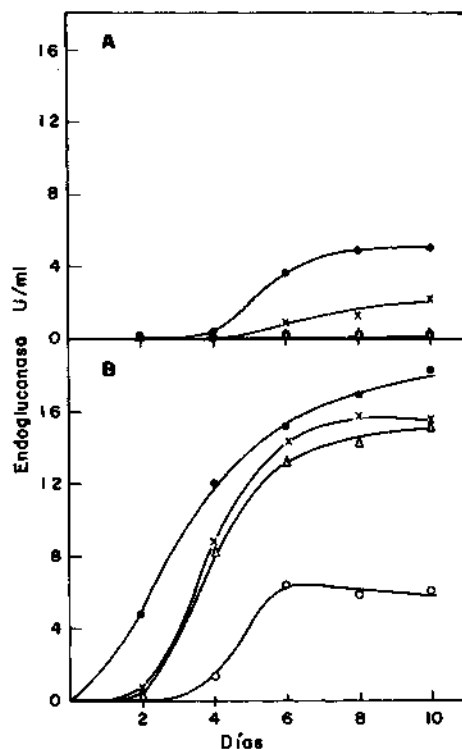


Fig. 3. Cinética de producción de endoglucanasa por *T. pseudokoningii* cultivado en medio líquido con celulosa microcristalina (7.5 g/l) en presencia o ausencia de glicerol. 3-A: cepa silvestre; 3-B: mutante B-1; ●—● : control sin glicerol; x—x : glicerol 25 mM; △—△ : glicerol 50 mM; ○—○ : glicerol 100 mM.

celobiasa llegando a un máximo de 0,03 U/ml. Concentraciones de 50 mM y superiores suprimen completamente la producción de esta enzima. El mutante B-1 alcanza un nivel máximo de 0,22 U/ml de celobiasa entre el octavo y décimo día de cultivo en medio con celulosa como única fuente de carbono. A diferencia de lo ocurrido con la actividad de endoglucanasa, la adición de glicerol 25 mM produce una disminución notable en los niveles de celobiasa que alcanza un valor de 0,08 U/ml al octavo día de fermentación y luego desciende a 0,06 U/ml al décimo día. Resultados similares se obtienen con glicerol 50 mM.

Los resultados de la FPA se muestran en la Figura 5. En la cepa silvestre (Fig. 5-A) la cinética de producción de enzimas se asemeja a la obtenida para la endoglucanasa en que la actividad enzimática se eleva entre el cuarto y sexto día de fermentación, llegando a un nivel máximo de 0,15 U/ml. La adición de glicerol 25 mM retarda el inicio de la producción de enzima; sin embargo, al décimo día de cultivo se alcanza una actividad semejante a la del control. Concentraciones superiores a 25 mM de glicerol reprimen completamente la FPA. En el caso del mutante B-1 (Fig. 5-B) el nivel máximo alcanzado es significativamente más alto que el de la cepa silvestre llegando a 0,37 U/ml. La adición de glicerol 25 y 50 mM produce un gran aumento en la producción inicial de enzimas llegando a valores finales semejantes a los del control. Nuevamente sólo a

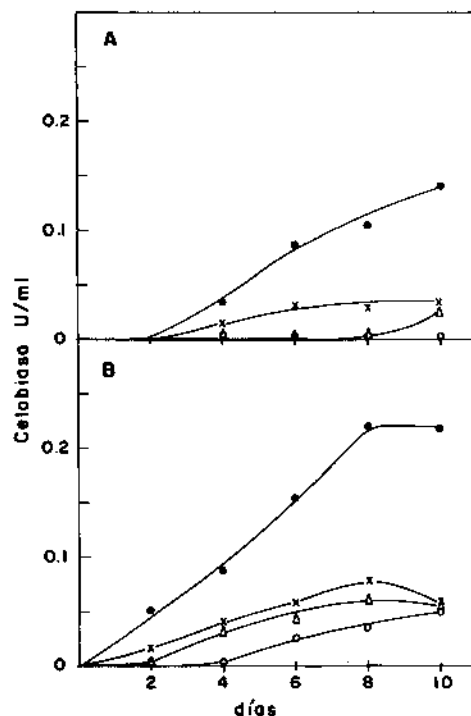


Fig. 4. Cinética de producción de celobiasa por *T. pseudokoningii* cultivado en medio líquido con celulosa microcristalina (7.5 g/l) en presencia o ausencia de glicerol. 4-A: cepa silvestre; 4-B: mutante B-1: ●—● : control sin glicerol; x—x : glicerol 25 mM; △—△ : glicerol 50 mM; ○—○ : glicerol 100 mM.

concentraciones de glicerol 100 mM se logra una disminución significativa de la actividad enzimática llegando ésta a un valor de 0,18 U/ml a los 10 días. Concentraciones superiores a 100 mM de glicerol reprimen completamente la FPA.

La adición de glicerol 100 mM no sólo reprime la producción de celulasas sino que también disminuye significativamente la cantidad de proteína extracelular sintetizada. En estas condiciones el mutante B-1 libera menos de la mitad de la proteína extracelular que en condiciones desreprimidas (datos no presentados).

Discusion

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza y constituye el componente principal de desechos y residuos del procesamiento de alimentos y de la agroindustria. Por este motivo, la utilización de microorganismos celulolíticos y de sus enzimas en la hidrólisis de materiales celulósicos con objeto de producir azúcares fermentables, ha adquirido gran importancia en los últimos años (4, 8, 11).

En una comunicación previa (20) describimos el aislamiento y caracterización de 23 especies de hongos celulolíticos obtenidos a partir de muestras de maderas y suelos del Sur de Chile. En este trabajo se escogió una de estas especies, *T. pseudokoningii*, que

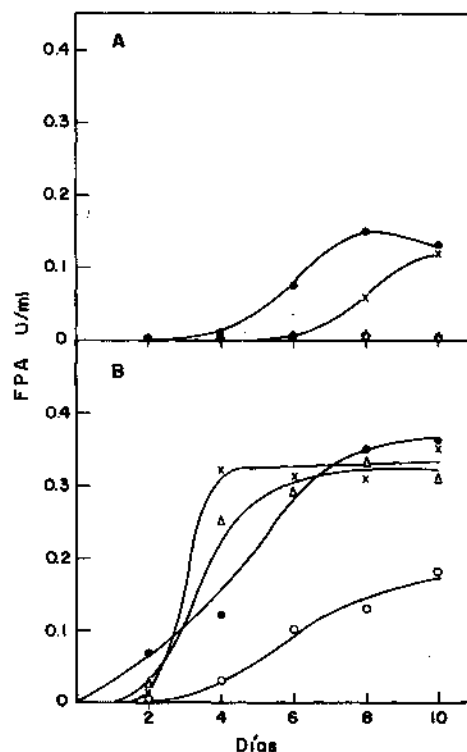


Fig. 5. Cinética de producción de actividad degradativa sobre papel de filtro por *T. pseudokoningii* cultivado en medio líquido con celulosa microcristalina (7,5 g/l) en presencia o ausencia de glicerol. 5-A: cepa silvestre; 5-B: mutante B-1: ●—●: control sin glicerol; x—x glicerol 25 mM; △—△ glicerol 50 mM; ○—○: glicerol 100 mM.

produce todas las actividades del complejo celulasa, con la finalidad de aumentar su producción de enzimas mediante la obtención de mutantes reguladores, específicamente mutantes resistentes a la represión catabólica ejercida por glicerol.

Para la selección de mutantes desreprimidas, se utilizó un medio sólido que contenía celulosa pretratada con ácido fosfórico, la cual es degradada rápidamente por los microorganismos que atacan la celulosa nativa, observándose zonas de hidrólisis al cabo de 3 a 4 días de cultivo. En cambio, al utilizar celulosa sin pretratamiento, este tiempo se extiende a varias semanas de incubación. Con el objeto de restringir el tamaño de las colonias, se agregó al medio desoxicolato sódico, el cual fue superior a otros inhibidores ensayados en un trabajo anterior (20), como rosa de bengala, bilis de buey y saponina. Se agregó además B-Nine, un compuesto utilizado para limitar el crecimiento de plantas (7), que aumentó la nitidez de los halos de hidrólisis de la celulosa. El efecto bioquímico del B-Nine sobre la producción o liberación de celulasas por *T. pseudokoningii* no ha sido aún estudiado.

Este medio de cultivo permitió aislar un gran número de colonias de reducido tamaño, rodeadas de halos claros de hidrólisis del sustrato (Fig. 1-B). La adición de

glicerol (500 mM) reprimió la producción de celulasas en medio sólido por la cepa silvestre, lo que se evidenció por la ausencia de zonas de hidrólisis alrededor de las colonias. De acuerdo a estos resultados, este medio de cultivo fue utilizado para el aislamiento de mutantes resistentes a la represión catabólica, seleccionando aquellas colonias capaces de producir zonas de aclaramiento por hidrólisis de la celulosa en presencia de glicerol (Fig. 2-B).

De esta manera se obtuvo un mutante que mostró un aumento de casi 2 veces en las actividades de endoglucanasa y FPA respecto a la cepa parental. Sin embargo, este mutante era inestable ya que en corto tiempo revirtió a una forma en que su producción enzimática era sólo levemente superior a la del tipo silvestre. Por lo tanto se decidió continuar mutagenizando esta cepa con objeto de aumentar su estabilidad sin sacrificar su alto nivel de producción de enzimas celulolíticas.

En una segunda mutagénesis se aisló la cepa B-1 que presentó actividades más altas que su cepa parental y que resultó tener mayor estabilidad. Como se observa en la Tabla 1 este mutante mostró un aumento de 3 veces en la actividad de endoglucanasa y FPA respecto a la cepa silvestre, mientras que la producción de celobiasa se mantuvo en niveles similares para ambas cepas. Este efecto diferencial podría sugerir que las enzimas del complejo celulasa no se encuentran bajo control coordinado en este hongo. Otros autores han descrito efectos semejantes para hongos del género *Trichoderma* (16) y *Neurospora* (5).

El mutante B-1 liberó 3,3 veces más proteína extracelular que la cepa silvestre. Este resultado implica que el aumento en las actividades de endoglucanasa y FPA observando se debería a una mayor secreción de enzimas por la cepa mutante, y no a un aumento de sus actividades específicas como se aprecia en la Tabla 1.

La resistencia a la represión catabólica, aparentemente completa, observada en medio sólido con glicerol 500 mM, no muestra una correlación similar en cultivos sumergidos. Esta concentración de glicerol suprimió completamente la producción de enzimas por el mutante al cultivarlo en medio líquido. Sin embargo, como se muestra en las Figuras 3 y 5, concentraciones de 25 y 50 mM de glicerol no afectan la producción de las enzimas endoglucanasa y FPA, observándose que el rango en que se produce la transición entre desrepresión y represión ocurre entre 100 y 200 mM. En la cepa silvestre, en cambio, esta transición ocurre en un rango entre 25 y 50 mM de glicerol.

Respecto a la actividad de celobiasa, ésta parece ser más sensible a la represión por glicerol, ya que concentraciones bajas (25 mM) de este compuesto afectan notablemente la producción de esta enzima por el mutante B-1, que alcanza valores de sólo 1/3 de los obtenidos en condiciones desreprimidas. Estos resultados también sugieren la existencia de un control diferencial de las enzimas del complejo celulasa en *T. pseudokoningii*.

Otro compuesto que también ha sido usado como represor catabólico del complejo celulasa es la 2-desoxiglucosa (17), un análogo no metabolizable de la glucosa. Datos preliminares indican que el mutante B-1 es también parcialmente resistente a la represión ejercida por 2-desoxi-glucosa a concentraciones que suprimen completamente la producción de celulasas por la cepa silvestre.

Cabe mencionar que la bioquímica y genética de la represión catabólica de carbohidrasas en eucariontes no ha sido investigada en detalle. Se han aislado mutantes resistentes a la represión catabólica en levaduras (18, 22) y hongos (2, 16) algunas de las cuales muestran desrepresión sólo parcial de la producción de enzimas (16, 18).

Los resultados presentados indican que se logró aislar un mutante hiperproductor de celulasas y parcialmente resistente a la represión catabólica. Mediante el uso de nuevos agentes mutagénicos esperamos obtener un mutante que produzca niveles aún más altos de las enzimas del complejo celulasa, que permitan la bioconversión eficiente de los residuos celulósicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Proyecto B-1864 de la Dirección de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile. Deseamos expresar nuestros agradecimientos al Dr. E. Piontelli y Dra. M. A. Toro por su valioso aporte al desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

1. AOAC (1980). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. p. 61. W. Horwitz, Ed. 13th Edition.
2. Bailey, C. and Arst, H. N. (1975). Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Eur. J. Biochem. **51**: 573-577.
3. Bailey, M. J. and Nevalainen, K. M. H. (1981). Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. Enzyme Microb. Technol., **3**: 153-158.
4. Cuskey, S. M., Frein, E. M., Montencourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1981). In: Overproduction of Microbial Metabolites. pp. 405-416. Academic Press. N. Y.
5. Eberhart, B. M., Beck, R. S. and Goolaby, K. M. (1977). Cellulase of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. **130**: 181-186.
6. Enari, T. M. and Markkanen, P. (1977). In Advances in Biochemical Engineering N.º 5 «Microbial Products». Ed. T. K. Ghose, A. Fiechter and N. Blakebrough pp. 1-24.
7. Flagg, R. O. (1963). Plant Growth Regulators. Carolina Tips **26**: 3-7.
8. Keim, C. R. (1983). Technology and economics of fermentation alcohol-an update. Enzyme Microb. Technol. **5**: 103-114.
9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. I. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
10. Mandels, M. (1975). Microbial sources of cellulases. In Biotechnol. and Bioeng. Symp. N.º 5. pp. 81-105. John Wiley and Sons.
11. Mandels, M. (1985). Applications of Cellulases. Biochem. Soc. Trans. **13**: 414-416.
12. Mandels, M. and Andreotti, R. E. (1978). Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. Process Biochem. **13**: 6-13.
13. Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J. (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol and Bioeng. **16**: 1471-1493.
14. Mishra, S., Gopalkrishnan, K. S. and Ghose, T. K. (1982). A constitutively cellulase-producing mutant of *Trichoderma reesei*. Biotechnol and Bioeng. **24**: 251-254.
15. Montencourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1977). Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. Appl. Environ Microbiol. **33**: 178-183.
16. Montencourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1977). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. **34**: 777-782.
17. Montencourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1979). Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. Adv. Chem. Ser. **181**: 289-301.
18. Montencourt, B. S., Kuo, S. C. and Lampen, J. O. (1973). *Saccharomyces* mutant with invertase formation resistant to repression by hexoses. J. Bacteriol. **114**: 223-283.

-
19. Montencourt, B. S., Schamhart, D. H. and Eveleigh, D. E. (1979). Mechanisms controlling the synthesis of the *Trichoderma reesei* cellulase system. In «Microbial polysaccharides and polysaccharases». Academic Press, N. Y. pp. 327-337.
 20. Musalem, M., Steiner, J. y Contreras, I. (1984). Producción de celulasas por hongos aislados de madera y suelos del sur de Chile. *Boletín Micológico* 2: 17-25.
 21. Nelson, N. (1944). A Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
 22. Schamhart, D. H. J., ten Berge, A. M. A. and van der Poll, K. W. (1975). Isolation of a catabolite repression mutant of yeast as a revertant of a strain that is maltose negative in the respiratory deficient state. *J. Bacteriol.* 121: 747-752.
 23. Schimenti, J., Garret, T., Montencourt, B. S. and Eveleigh, D. E. (1983). Selection of hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* based on resistance to Nystatin. *Mycologia.* 75: 876-880.
 24. Sternberg, D. (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* N.º 6. pp. 35-53. John Wiley and Sons.
 25. Tansey, M. R. (1971). Agar diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Arch. Mikrobiol.* 77: 1-11.

An effective mutagenic method in *Azotobacter vinelandii*

Francisco Luque, Eduardo Santero, Juan Ramón Medina* y María Tortolero

Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apartado 1095. Sevilla.

(Received July 8/November 21, 1986)

Summary

The acridine-like compound ICR-191 is an effective mutagenic agent in *Azotobacter vinelandii*. Selectable mutants, such as those resistant to chlorate, can be isolated without post-mutagenic segregation. Non selectable mutants, such as those unable to metabolize different sugars, can be easily isolated after twelve generations of post-mutagenic segregation.

Key words: Azotobacter, mutagenesis, ICR-191.

Resumen

El tratamiento con el derivado de acridina ICR-191 es un método muy eficaz de mutagénesis en *Azotobacter vinelandii*. Mutantes seleccionables, como los resistentes a clorato, se pueden aislar sin segregación posmutagénica. Por otra parte, mutantes no seleccionables, como los incapaces de metabolizar diferentes azúcares, se pueden aislar fácilmente tras doce generaciones de segregación posmutagénica.

Among heterotrophic bacteria, *Azotobacter vinelandii* has the special property of fixing dinitrogen under aerobic conditions. Metabolic mutants of *Azotobacter* were first isolated almost forty years ago (3, 11), but the loss or instability of the mutant character, coupled with reports of failure to mutagenize successfully (4), have contributed to a shift in emphasis in nitrogen fixation research from *Azotobacter* to more readily manipulated *Klebsiella*. A few purine and pyrimidine auxotrophs exist, but no aminoacid auxotrophs have been isolated even after a concerted effort aimed towards this goal. However, it is relatively easy to isolate antibiotic or antimetabolite resistant mutants and mutants,

* To whom correspondence should be sent.

named. Nif^- , lacking nitrogenase activity (5, 8, 9). It has been argued that *A. vinelandii* contains a minimum of forty chromosomes per cell and that, therefore, failure to isolate mutants probably results from difficulties in segregation rather than in mutagenesis.

In this paper we describe an easy and effective method for mutagenesis in *A. vinelandii* using the acridine-like compound known as ICR-191. The ICR compounds are similar to proflavin as they are planar heterocyclic molecules but, in addition, they carry a polyamine side chain. The most highly mutagenic ICR compounds have an alkylating side chain that is probably responsible for the covalent linking of the acridine moiety to DNA. Several types of evidence suggest that these compounds cause frameshift mutations (6).

In our hands, ICR-191 has proved to be a very efficient mutagen in *A. vinelandii*, which allows us to obtain a variety of stable mutants by the following method: The UWrif[®] strain was grown at 30° C under aeration in nitrogen-free Burk's medium (1) with sucrose (0.5 % w/v) as carbon source. The final concentration of EDTA and iron was 0.1 mM. When the exponential phase was reached, bacteria were diluted to approximately five hundred cells per plate and added to mixtures of soft agar (Difco Bactoagar, 0.6 % w/v) and different concentrations of ICR-191. The mixtures were immediately poured over plates with minimal solid medium (Difco Bactoagar, 2 % w/v) supplemented with Difco Bactotryptone (2 g/l) and Difco yeast extract (1 g/l) and incubated in the dark at 30° C for six days. After this period, plates were exposed to fluorescent light for twenty-four hours to inactivate the mutagen. In the absence of ICR-191 the frequency of colonies harboring mutant cells is nil. It should be noted that, due to the method employed, many different mutant cells from the same survival colony may be due to the same initial mutation, so that a high frequency of colonies harboring mutant cells does not imply an equivalent high rate of mutation.

To determine whether mutagenesis with ICR-191 is an appropriate method for isolating selectable mutants we screened for chlorateresistant mutants by streaking with sterilized toothpicks a hundred single colonies from each concentration of ICR-191 on minimal plates supplemented with chlorate (100 mM). This experiment is based on the fact that the dissimilatory forms of the enzyme nitrate reductase are known to reduce non toxic chlorate to toxic chlorite; consequently, strains that cannot reduce nitrate can be selected in medium supplemented with chlorate. Dose-effect curve for colony forming ability of *A. vinelandii* and the frequency of colonies harboring chlorate resistant mutants induced with different concentrations of ICR-191 are shown in Figure 1. There is a decay of viability with the increase of mutagen concentration and a rapid increase in the frequency of appearance of mutants that reaches a maximum between four and eight $\mu\text{g/ml}$. The chlorate resistant mutants were further classified into three phenotypic groups according to their growth ability in nitrogen free media supplemented with a variety of nitrogen sources.

Chlorate resistance is obviously a selectable trait; to determine whether mutagenesis with ICR-191 is also an appropriate method for isolating non selectable mutants we screened for undefined auxotrophs. In these experiments we used a concentration of ICR-191 of four $\mu\text{g/ml}$ because, as shown in Figure 1, at this point survival is greater than fifty per cent and the frequency of mutants has reached its maximum value. After inactivating the mutagen with fluorescent light, five single mutagenized colonies were mixed to establish a subculture that was grown for eighteen hours to allow cell division and

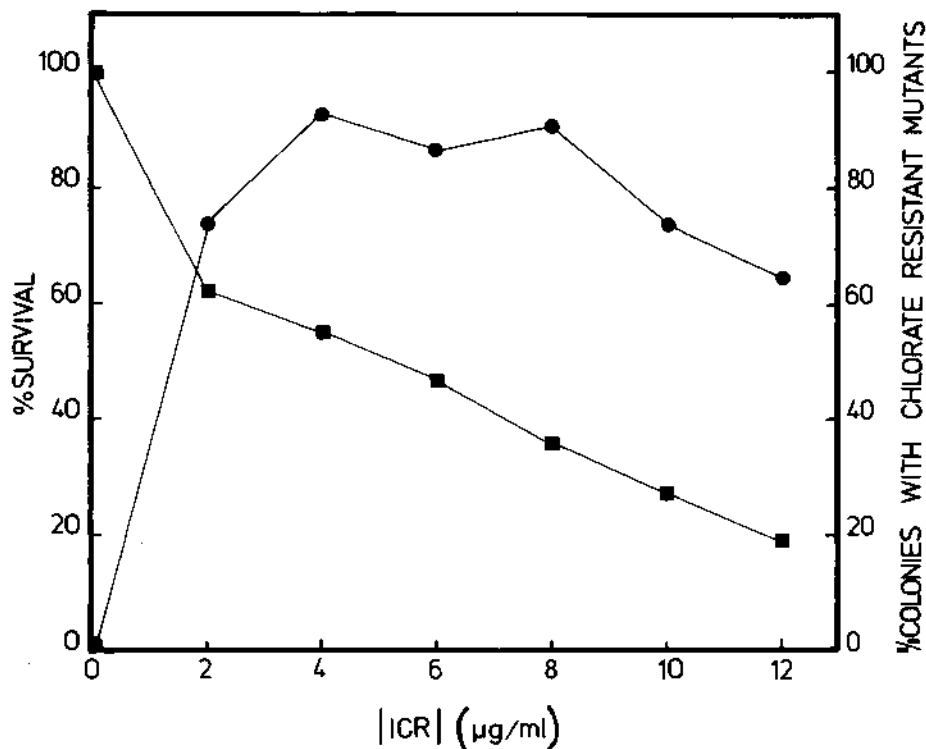


Fig. 1. Toxic and mutagenic effect of ICR-191 on *A. vinelandii*. The rationale and the method are explained in the text. Squares are for survival; circles, for the frequency of mutagenized colonies harboring mutant cells resistant to chlorate. For example, the circle in the 75 % line corresponding to a concentration of ICR-191 of 2 µg/ml means that 75 out of 100 mutagenized colonies contain some resistant cells, but it does not mean that 75 out of 100 cells are mutant.

segregation of mutant genomes in liquid medium enriched with Bactotryptone and yeast extract. Cells were then washed and subjected to an auxotroph enrichment procedure by incubation in minimal nitrogen-free medium with ampicillin (20 µg/ml) and D-cycloserine (20 µg/ml). Survival cells were subsequently plated on solid rich medium and a thousand colonies from the subculture were tested for growth on nitrogen-free medium. The same experiment was made with five independent subcultures, named A to E. Since each subculture contains five mutagenized colonies, the cells of a total of twenty five such colonies were assayed for auxotroph screening. Recall that different mutant cells from the same mutagenized colony may be the descendants of the same original mutation. The results are given in Table 1. Growth on nitrogen-free medium and the behaviour in the auxanographic test of Holliday (2), that is, the growth ability on media supplemented with different combinations of aminoacids, vitamins, purines and pyrimidines, of ten auxotrophic strains from each subculture were analyzed (Table 1). Tryptone mutants are defined as mutants that grow on minimal medium supplemented with tryptone, but did not grow when the minimal medium was supplemented with ammonium acetate, casaminoacids or the molecules described in the Holliday's test. The phenotype of the Tryptone-

mutants may be explained by the hypothesis that free amino acids are not transported into *Azotobacter*. However, in subculture C, two Met⁻ colonies were identified; to our knowledge, there are the first amino acid auxotrophs of *A. vinelandii* cited in the literature. Our results confirm previous reports that Nif⁻ mutants can be isolated.

To obviate the above difficulties in the study of non selectable mutations, we screened for mutants unable to use either rhamnose, sorbose, raffinose or galactose as sole

TABLE 1

AUXOTROPHIC COLONIES FROM *A. VINELANDII*. MUTAGENESIS PROCEDURE AND THE PHENOTYPE OF MUTANTS ARE DETAILED IN THE TEXT.

Subculture	% of auxotrophic colonies	Nif ⁻	Phenotype Tryptone ⁻	Met ⁻
A	5.6	1	9	0
B	45	10	0	0
C	6.5	0	8	2
D	30	0	10	0
E	22	6	4	0

carbon source. Mutagenesis procedure was as for auxotrophs. After mutagenesis, four subcultures were established to allow the segregation of mutant genomes. Liquid minimal medium supplemented with the corresponding sugar and the antibiotics cited for auxotroph obtention was utilized as enrichment medium. Mutants were isolated from the four subcultures, but the frequencies were extremely variable: rhamnose, 50 %; sorbose 0.1 %; raffinose, 0.4 % and galactose, 1.7 %. These fluctuations may be attributable to differences in the efficiency of the enrichment procedure.

All the mutants isolated are stable, their reversion frequencies being less than 10⁻⁸ in every case.

Acknowledgements

This work was supported by the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (grant 3026).

References

- Guerrero, M. G., Vega, J. M., Leadbetter, E. and Losada, M. (1973). Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *A. chroococcum*. Arch. Microbiol. **91**, 287-304.
- Holliday, R. (1956). A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. Nature, **178**, 987.
- Karlson, J. L. and Barker, H. A. (1948). Induced biochemical mutants of *Azotobacter agilis*. J. Bacteriol. **56**, 671-677.
- Mishra, A. K. and Wyss, O. (1968). Induced mutations in *Azotobacter* and isolation of an adenine-requiring mutant. Nucleus **11**, 96-105.

-
5. Page, W. J. and Safoff, H. L. (1976). Control of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* by nitrogen catabolite derepression. *J. Bacteriol.* **125**, 1088-1095.
 6. Roth, J. R. (1974). Frameshift mutations. *Ann. Rev. Genet.* **8**, 319-342.
 7. Sadoff, H. L., Shimei, B. and Ellis, S. (1979). Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J. Bacteriol.* **138**, 871-877.
 8. Shah, V. K., Davis, L. C., Gordon, J. K., Orme-Johnson, W. H. and Brill, W. J. (1973). Nitrogenaseless mutants of *Azotobacter vinelandii*: activities cross-reactions and EPR spectra. *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 246-255.
 9. Sorger, G. J. and Trofimenkoff, D. (1970). Nitrogenaseless mutants of *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**, 74-80.
 10. Terzaghi, B. E. (1980). Ultraviolet sensitivity and mutagenesis of *Azotobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **118**, 271-273.
 11. Wyss, O. and Wyss, M. B. (1950). Mutants of *Azotobacter* that do not fix nitrogen. *J. Bacteriol.* **59**, 287-291.

Estudio de la fosfotransferasa APH(3')-II mediante transferencia de proteínas («western blotting»)

María José Rivera^{1*}, Diego Pulido², Bienvenida Grasa¹ y Rafael Gómez-Lus¹

¹ *Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.*

¹ *Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.*
² *Centro de Biología Molecular, Cantoblanco, Madrid, España.*

(Recibido Octubre 27/Diciembre 2, 1986)

Summary

The APH(3')-II aminoglycoside-phosphotransferase has been studied by protein blotting. This technique allowed the detection of the enzyme in the crude extracts from clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, and the molecular weight determination of the APH(3')-II. The obtained molecular weight of 25000 is coincident with the previously reported value determined by a different method. These results demonstrate that this technique is useful for the study of aminoglycoside-modifying enzymes.

Key words: Protein blotting, aminoglycoside-phosphotransferase APH(3')-II, molecular weight.

Resumen

Se ha realizado un estudio de la fosfotransferasa APH(3')-II mediante la técnica de transferencia de proteínas. La aplicación de esta técnica ha permitido, por una parte, confirmar la presencia del enzima en los extractos crudos de diferentes enterobacterias de origen hospitalario, y por otra, determinar el peso molecular de la fosfotransferasa, obteniéndose un valor de 25000, similar al encontrado con otros métodos. Estos resultados demuestran la utilidad de esta técnica para la investigación de enzimas modificantes de aminoglicósidos.

* A quien se dirigirá la correspondencia.

El estudio de la resistencia a los antibióticos aminoglicósidos-aminociclitolos reviste particular importancia en los centros hospitalarios donde el uso de estos antimicrobianos puede alcanzar valores elevados originando un fenómeno de presión selectiva, responsable en gran parte de la aparición, diseminación y mantenimiento de resistencias. En el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza se viene realizando desde su apertura (1976) un control sistemático de la resistencia transferible a antibióticos, y en especial a los aminoglicósidos, mediante la caracterización de plásmidos R y de los enzimas modificantes de aminoglicósidos que éstos codifican (4, 5, 7) (Martín, C. 1985. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza). Es un hecho universalmente aceptado que la presencia de enzimas modificantes de aminoglicósidos de origen plasmídico es la causa más frecuente de resistencia a dichos antibióticos y que estos enzimas se clasifican según el mecanismo (N-acetilación, O-fosforilación y O-nucleotidilación) y según el lugar de su modificación (3).

Desde su descubrimiento, los enzimas modificantes de aminoglicósidos han sido objeto de estudio llegándose a diferenciar distintos tipos o subclases, que si bien catalizan la modificación de un mismo grupo de aminoglicósido, presentan diferente perfil de sustrato y características propias, tanto en lo referente a su tamaño molecular como a sus propiedades cinéticas (2). Con el fin de aportar datos a este estudio se ha planteado en el presente trabajo la aplicación de la técnica de transferencia de proteínas y su posterior detección inmunológica («Western blotting») a la investigación de la fosfotransferasa APH(3')-II. Esta fosfotransferasa pertenece al grupo de enzimas APH(3') que catalizan la fosforilación y producen resistencia a neomicina, paromomicina, ribostamicina y kanamicina. Se diferencia de los otros tres tipos de APH(3') en que, además, fosforila y produce resistencia a butirosina y no a lividomicina.

El enzima APH(3')-II ha sido purificado parcialmente y a homogeneidad por diversos autores mediante la utilización de distintos tipos de cromatografía. La electroforesis en gel de poliacrilamida del enzima purificado demostró la existencia de una única proteína con un peso molecular de 25.000-27.000 (2, 3). En el presente trabajo se estudia el peso molecular de la fosfotransferasa APH(3')-II a partir del extracto enzimático crudo y del antisuero específico APH(3')-II. Asimismo se confirma la existencia del enzima en cepas en las que se había detectado su presencia mediante el ensayo radioenzimático de Haas y Dowding (6).

Las cepas utilizadas, aisladas en productos patológicos de pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico Universitario, fueron las siguientes: *Escherichia coli* 15.159 (pUZ62), *E. coli* 2.513 (pUZ552), *E. coli* 6.055 (pUZ638) y *Salmonella enteritidis* 7.277 (pUZ655). Todas ellas presentaban resistencia a aminoglicósidos transferible por conjugación a *E. coli* K-12 J62 (F⁻, NaI^r, pro⁺ba020, his⁺, lac⁺) (1). El ensayo radioenzimático realizado con los extractos crudos, preparados por sonicación, de las cepas donadoras así como de sus transconjugantes demostró la existencia de actividad fosforilante. El perfil de sustrato indicó que en todos los casos esta actividad era debida a la existencia de APH(3')-II.

La transferencia de proteínas se realizó mediante la técnica de Towbin *et al.* (8). Los extractos crudos y las proteínas patrón de peso molecular (lisozima, 14.300; β -lactoglobulina, 18.400; albúmina de huevo, 45.000 y albúmina bovina, 66.000) (Sigma), se sometieron a electroforesis en gel laminar de SDS-poliacrilamida al 12,5 % y a continuación las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a láminas de nitro-

celulosa. La transferencia se realizó a 100 mA durante 3 horas en tampón T (25 mM Tris. HCl, pH 8,3, 192 mM glicina, 20 % metanol, 0,1 % SDS). Una de las láminas de nitrocelulosa fue teñida con negro amido (0,1 % en 45 % metanol-10 % ácido acético) y desteñida con 90 % metanol-2 % ácido acético. Las proteínas transferidas a la otra lámina fueron incubadas durante 18 horas a 45° C con el antisuero específico APH(3')-II (J. Davies. BIOGEN, Geneva) en solución TBT (10 mM Tris. HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,77 mM azida sódica, 3 % albúmina de suero bovino, 0,1 % Triton X-100). Después del lavado con solución TBS-BSA (solución TBT sin Triton X-100), las proteínas fueron incubadas de nuevo durante 1 hora con solución TBT conteniendo [¹²⁵I] -proteína A (0,5-2 μCi) (Amersham) que se fija al antisuero unido al enzima APH(3')-II previamente inmovilizado en la lámina de nitrocelulosa. Después de otro lavado con solución TBS-BSA, la nitrocelulosa fue secada y expuesta con película X-Ray (Kodak/R54) durante 18 horas a -70° C.

Como puede observarse en la Fig. 1, en todas las muestras, a excepción de la correspondiente al extracto crudo de *E. coli* K-12 J62, se detecta la presencia del enzima APH(3')-II, reconocido por el antisuero y este complejo por la proteína A radioactiva. Este resultado, de una parte, confirma los del ensayo radioenzimático que indicaban la existencia del mismo enzima en todas las cepas estudiadas y, de otra, constituye un dato más sobre la existencia de reacción inmunológica cruzada entre todos los enzimas APH(3')-II hasta ahora aislados (3).

La determinación del peso molecular del enzima mediante superposición de las proteínas teñidas con negro amido y las reveladas por autorradiografía da un valor de 25.000, que concuerda con el obtenido por electroforesis tras la purificación del enzima.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la técnica de transferencia de proteínas y el uso de antisueros específicos puede ser de utilidad en la investigación de los enzimas modificantes de aminoglicósidos y en concreto en aspectos referentes tanto a la identificación de los distintos tipos como a la comparación de los enzimas procedentes de diferentes microorganismos.

1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 1. Autorradiografía de la transferencia de proteínas. Los extractos crudos de siete cepas productoras de APH(3')-II (muestras 2-8) fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a una lámina de nitrocelulosa e incubadas con antisuero específico APH(3')-II y posteriormente con [¹²⁵I] proteína A. (1) *E. coli* K-12 J62 (no productora de APH(3')-II). (2) *E. coli* 15.159 (pUZ62). (3) *E. coli* K-12 (pUZ62). (4) *E. coli* 2.513 (pUZ552). (5) *E. coli* K-12 (pUZ552). (6) *E. coli* 6.055 (pUZ638). (7) *E. coli* K-12 (pUZ638). (8) *S. enteritidis* 7.277 (pUZ655). La flecha indica el enzima APH(3')-II.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado con una ayuda de la CAICYT (N.º 3501/83).

Bibliografía

1. Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* **36**, 525-527.
2. Bryan, L. E. (1984). Aminoglycoside resistance. *In*: L. E. Bryan (ed.) *Antimicrobial Drug Resistance*. pp. 241-277. Academic Press, New York.
3. Davies, J., and Smith, D. I. (1978). Plasmid determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 469-518.
4. Gómez-Lus, R., Rivera, M. J. and Vitoria, M. A. (1984). A growing clinical problem: plasmid-determined resistance to aminocyclitol-aminoglycosides in Enterobacteria. *Chemioterapia* **3**, 368-370.
5. Gómez-Lus, R., Rubio Calvo, M. C., Larrad, L., Navarro, M., Lasiera, P., and Vitoria, M. A. (1980). 3-N-aminoglycoside-acetylating enzymes produced by R plasmid-carrying bacteria isolated in a general hospital. *In*: J. D. Nelson, D. Grassi (eds.). *Current Chemotherapy and Infectious Disease* pp. 708-710. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
6. Haas, M. J., and Dowding, J. E. (1975). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Methods Enzymol.* **43**, 611-628.
7. Rivera, M. J., Vitoria, M. A., Navarro, M., Robledano, L., Chocarro, P., and Gómez-Lus, R. (1984). Hospital dissemination among gram-negative bacillus strains of an Inc M plasmid encoding an AAC(3) and a TEM-1 beta-lactamase. *Drugs Exptl. Clin. Res.* **X** (11), 789-795.
8. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Guidelines to authors

«Microbiología» (Published by the Spanish Society for Microbiology) publishes original research papers, research Notes and occasionally reviews covering all aspects of Microbiology. All submissions should be written in Spanish or in English. The decision to accept manuscripts 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 publication of this Journal if accredited as the source.

ORGANIZATION AND FORMAT OF THE MANUSCRIPTS. Type every portion of the manuscript double-space with a wide margin at the left 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 15 printed pages including figures and tables (this corresponds to approximately 25 typewritten pages).

The front page should include title, name (s) of the author (s), institution affiliation (s) and complete address (es). Three to five keywords would also be included.

Papers should be divided into: Abstracts in English and in Spanish (not exceeding 250 words), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

Cite each listed reference by numbers in the text. References should be numbered and arranged in alphabetical order as indicated in the following examples:

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seeberg, E., Nissez-Meyer, J. and Strike, P. (1976). *den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosilate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In*: C. Nombela (ed.) *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*. pp. 3-12. Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam.

References to thesis, manuscripts not accepted for publication or Meetings should be indicated in the text as follows: (Garcia, P. *et al.* 1985. in preparation), (Smith, T. 1985.

Ph. D. thesis, University of Colorado, Colorado) or (Suárez, A. y González, F. 1975. V Congr. Nac. Microbiol, p. 1845).

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Fotoprints 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. Legends for line-drawings and photoprints must be typed double-spaced on a separate sheet. The size of the photographs should not exceed the printing area (13 x 20 cm). All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black ink on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

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

Please indicate with a soft pencil the approximate location of tables and figures in the left margin of the page.

NOTES. Notes should be restricted to 6 typewritten 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 50 words. Figures and tables should be restricted to a maximum of 2 figures and 1 table or vice versa.

REVIEWS. 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.

PROOFS. On acceptance of the paper, one galley proof will be sent to the nominated author to check for typesetting accuracy. The corrected proofs should be duly returned within one week's time. If delays 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. Twenty-five offprints of each paper are supplied free of charge. Additional reprints will be billed at cost price if requested upon returning the corrected galley proofs.

Papers must be submitted, in duplicate, to «Microbiología» (Publicación de la SEM). c/ Vitruvio, 8. 28006 Madrid - Spain or to one of the Editors according to the discipline represented.

Normas para los autores

«Microbiología» (Publicación de la SEM) acepta trabajos y Notas de investigación originales dentro del campo de la Microbiología y, ocasionalmente, artículos de revisión. Textos en castellano o en inglés. La aceptación corresponde al Consejo Editorial.

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

PRESENTACION DE LOS MANUSCRITOS. Los trabajos, por duplicado, estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con un amplio margen en la parte izquierda y no deberán exceder de 15 páginas impresas incluyendo tablas y figuras (lo que corresponde aproximadamente a 25 hojas mecanografiadas).

Los trabajos incluirán una primera página en la que se indicará por este orden: Título del trabajo, nombre y apellido del autor o autores, centro en el que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo así como de tres a cinco palabras clave. En los artículos en castellano se deberá incluir una versión inglesa del título.

Los trabajos constarán de: Resúmenes en inglés y en castellano (de no más de 250 palabras), Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Las secciones de Resultados y Discusión se podrán fusionar en una sola.

Las abreviaturas deberán seguir las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica. Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal.

La bibliografía será citada en el texto mediante números y se preparará numerada y en orden alfabético de acuerdo con los ejemplos que se ofrecen a continuación:

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seeberg, E., Nissez-Meyer, J. and Strike, P. (1975). *den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylate specific for pyrimidine dimers in DNA. J. Virol. **35**, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. In: C. Nombela (ed.) Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis. pp. 3-12. Elsevier Science Pub. B.V. Amsterdam.

Las referencias a tesis doctorales, manuscritos no aceptados y comunicaciones presentadas a Congresos, deben incluirse en el texto del trabajo de acuerdo con los siguientes ejemplos: (García, P. *et al.* 1985. in preparation), (Smith, T. 1985. Ph. D. thesis, University of Colorado, Colorado) or (Suárez, A. y González, F. 1975. Res. V Congr. Nac. Microbiol. p. 1845).

Las fotografías, que deberán estar preparadas para su reproducción directa, se limitarán 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. En los trabajos en castellano las figuras incluirán

asimismo un texto en inglés. El tamaño de las fotografías no excederá de 13 x 20 cm. Las dimensiones de los rótulos deberán ser las adecuadas para ser legibles en caso de que se reduzca la fotografía. La presentación de dibujos en tinta china y papel vegetal seguirá las mismas normas. No se admitirán fotografías en color.

Las tablas se enviarán en hojas aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números arábigos y deberán llevar el correspondiente título explicativo.

Los autores deberán indicar a lápiz en el margen la situación aproximada en donde deben aparecer las tablas y figuras.

NOTAS. Las Notas, que no deberán exceder de seis páginas mecanografiadas incluyendo figuras y tablas, 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 50 palabras. Sólo incluirán, como máximo, dos figuras y una tabla o viceversa.

ARTICULOS DE REVISION. Los artículos de revisión versarán sobre temas de microbiología de gran interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Incluirán, en lugar de Resumen un índice de contenido.

PRUEBAS. Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en plazo no superior a una semana. 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. Se enviarán 25 separatas gratuitas por artículo; si se desearan más, deberá indicarse por escrito cuando se devuelvan las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

Dos copias de cada manuscrito se enviarán a: «Microbiología» (Publicación de la SEM). c/ Vitruvio, 8. 28006 Madrid o al Editor de la Revista que este más relacionado con el contenido del trabajo.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

Fundada en 1946

Miembro de:

FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGY SOCIETIES (FEMS)
INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (IUMS)

Representada en numerosos Comités Internacionales relacionados con la especialidad



Agrupada a los interesados en cualquier faceta científica o profesional relacionada con los microorganismos.

Grupos Especializados

Virología
Micología
Microbiología Clínica
Microbiología Industrial
Microbiología de Alimentos
Taxonomía Bacteriana

Grupos Regionales

Noroeste de España
Aragón, Rioja, Navarra
y Soria

Publicaciones

Boletín Informativo
Revista MICROBIOLOGIA

Actividades:

- Congresos generales de carácter bianual.
- Reuniones y Congresos de temáticas específicas o ámbito geográfico más restringido.
- Colaboración con la Administración española en asesoramientos, consultas, comisiones de expertos, tribunales, etc.

Inscripciones, dirigirse a:

Sociedad Española de Microbiología
c/ Vitruvio, 8
28006 Madrid
SPAIN

CO₂-Auto-Zero

cero absolutamente estable
para un cultivo ininterrumpido, cómodo y preciso.

**Estufas para cultivos de células
y tejidos de la
nueva serie B-5061 Heraeus.**

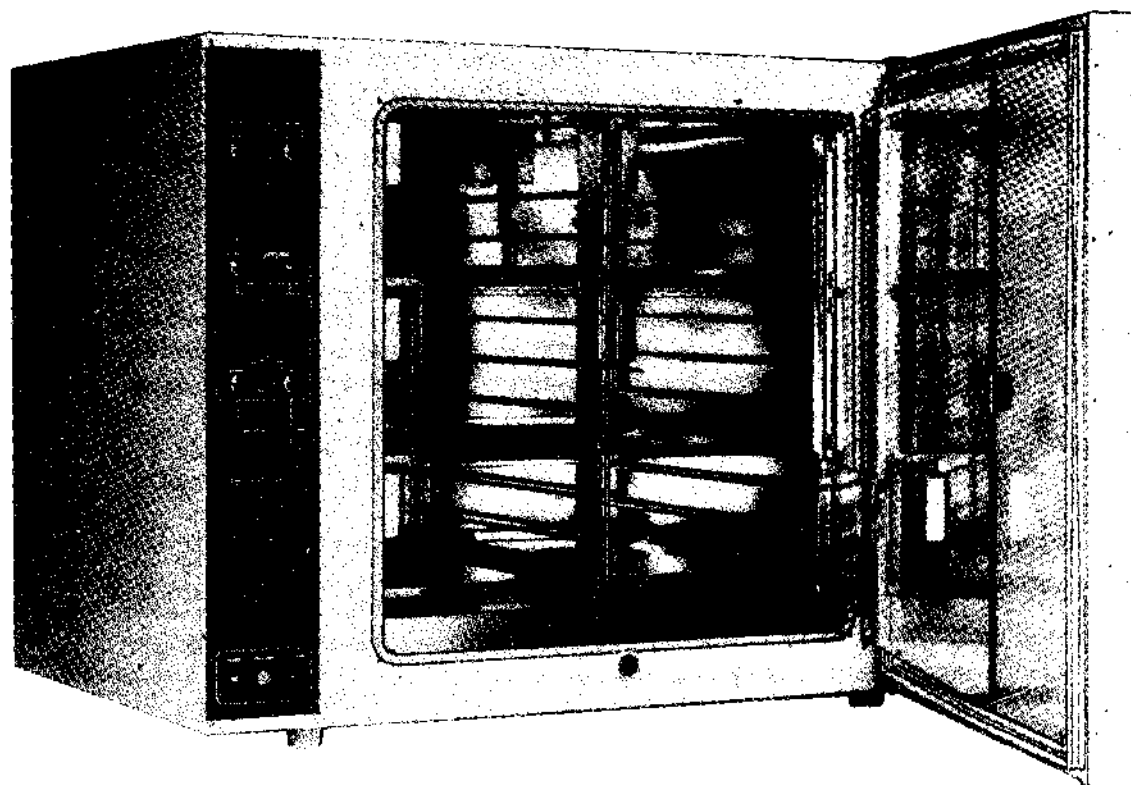
Control de CO₂ con corrección
de cero automático, sin que los
cultivos sean afectados.

Temperatura muy uniforme en
la cámara de trabajos, sin riesgo

de contaminación debido a una
ausencia total de condensacio-
nes en el interior de la cámara.

Una humedad relativa elevada
asegura el crecimiento uniforme
de sus cultivos.

...y muchas otras ventajas.



Deseo recibir más amplia información

Nombre _____

Dirección _____

Población _____
(con código postal)

Envíe este cupón a: **Heraeus, S. A.**

Agustín de Foxá, 25

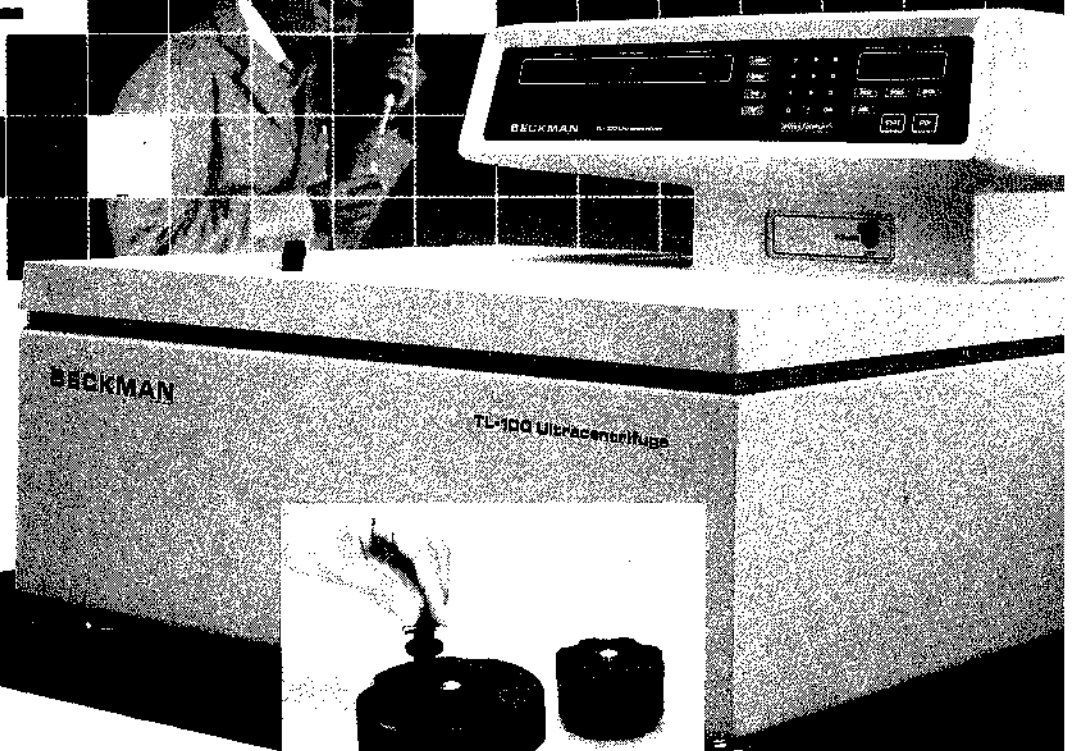
28036 MADRID

Tels: 91/733 77 64 - 733 77 96

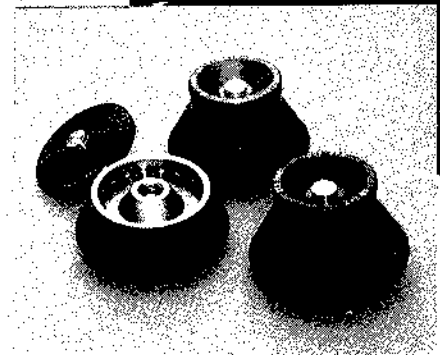
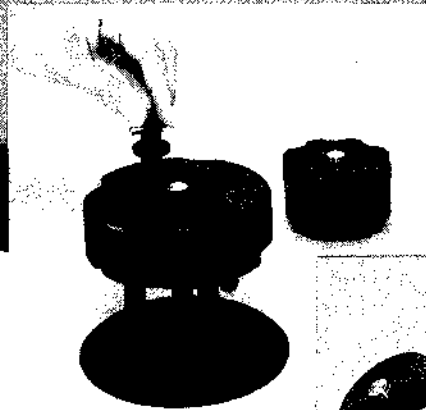
Telex: 43102 HERU E

Heraeus

TL-100



*La ultracentrifuga
ideal para
pequeñas muestras*



La Ultracentrifuga de mesa TL-100 es otra primicia de Beckman. Esta máquina de 100.000 rpm., genera fuerzas de hasta 436.000 g. y no ocupa más espacio que un espectrofotómetro. Seis rotores diferentes utilizan tubos desde 0,2 ml. a 2,2 ml.

AHORRA ESPACIO, AHORRA TIEMPO. Al diseñar la TL-100 (y su gama de rotores) específicamente para muestras tan pequeñas, hemos podido reducir también el tiempo de centrifugación. En trabajos como; aislamiento de plásmidos de DNA, separación de gradientes, estudios de ligando, determinaciones de pesos moleculares, ensayo de receptores o separación de proteínas, se tarda mucho menos tiempo.

FACIL UTILIZACION. Todos los rotores de la TL-100 utilizan tubos Quick-Seal, o tubos sin tapa de pared gruesa o fina, por lo que ya se ahorra tiempo al eliminar el tapado de los tubos. Entonces, cuando todo está preparado para poner en

marcha la máquina, Vd. puede seleccionar su programa de trabajo, presionando una tecla. Se puede conseguir una separación óptima al poder escoger entre rotores de ángulo fijo, basculantes o verticales.

MUY ECONOMICA DE MANTENER. A pesar de que el tamaño se ha reducido, la calidad no lo ha sido. Se ha asegurado la fiabilidad de la TL-100 en el diseño, incluyendo el sistema de giro por inducción, que elimina el delicado sellado de vacío y las escobillas. Esta sencillez de diseño evidente en la TL-100 crea una nueva categoría de máquina.

Si quiere obtener más detalles de esta nueva Ultracentrifuga, por favor póngase en contacto con Beckman en cualquiera de sus oficinas, o escriba a:

BECKMAN INSTRUMENTS ESPAÑA, S. A.
Avda. del Llano Castellano N° 15
28034 MADRID. Telf. 729 16 66

BECKMAN

MEDIOS DE CULTIVO **Biolife**



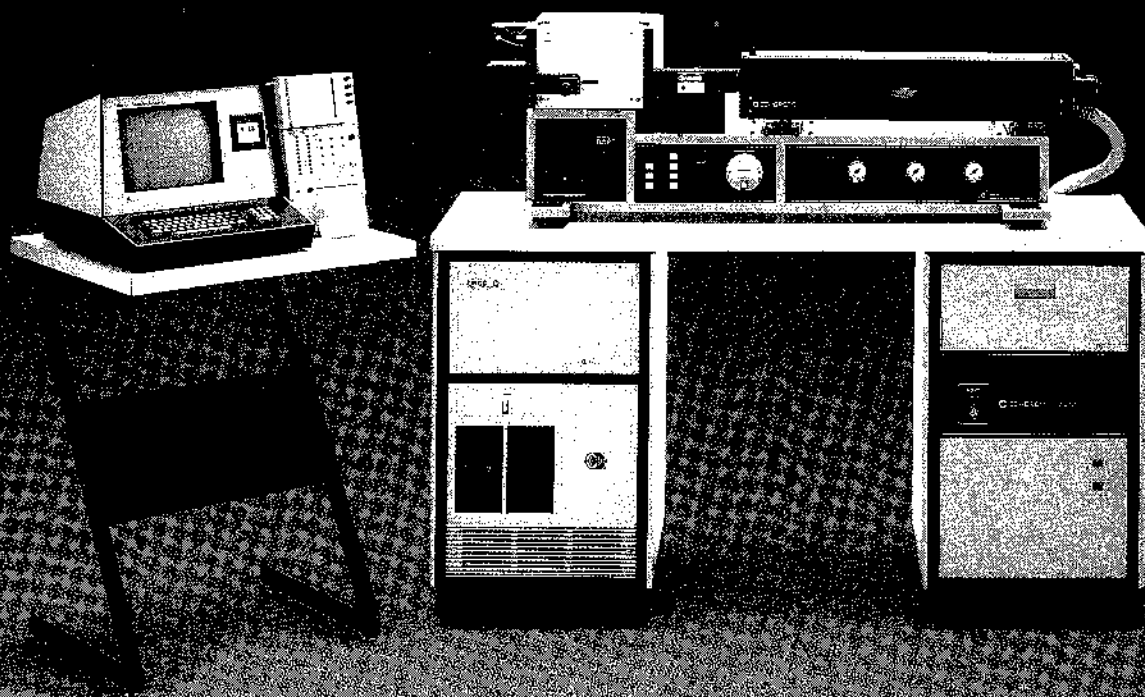
Nuestro concepto:

Microbiología a su servicio



Leopoldo, 262 - entre, 2.ª
Teléfono (93) 246 08 01
Tel. 50042 (C/ R. F. - 102) y 11-
080) S. BARTOLOMÉ

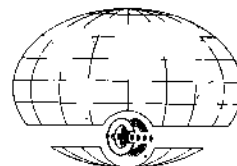
LA CITOMETRIA DE FLUJO



La Citometría de flujo representa el más avanzado método de estudio de las células, su funcionamiento y su estructura, que existe a la disposición del microbiólogo.

- Detección e identificación de especies.
- Aislamiento de individuos.
- Estudio de ciclo vital.
- Permeabilidad de membrana.
- Resistencia a antibióticos, etc.

Las aplicaciones presentes y futuras sólo están limitadas por la imaginación del investigador. Pregúntenos sobre el EPICS C si desea conectar con la investigación del futuro.



EPICS[®] C
LA CITOMETRIA DE FLUJO

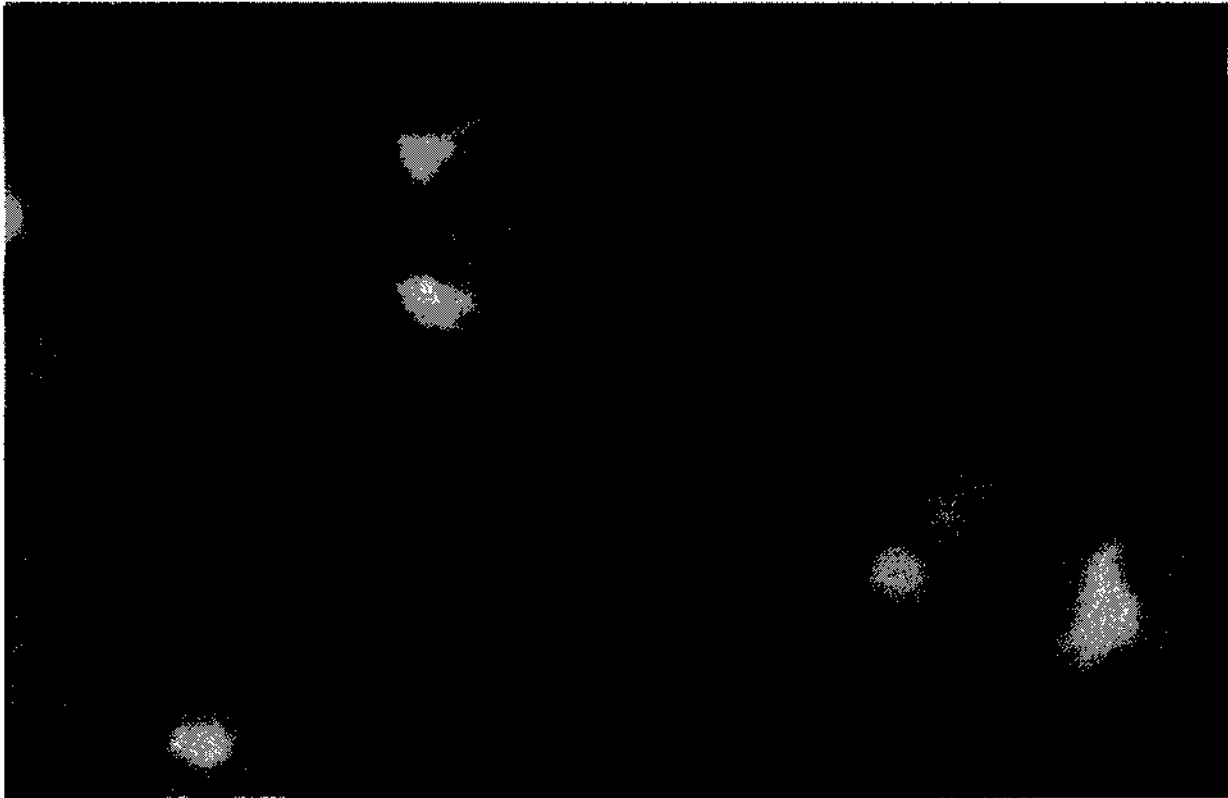
COULTER CIENTIFICA, S. A.

Polig. Ind. «La Fuensanta» - Parcela 11
Teléfono: 645 30 11. MOSTOLES (Madrid)

VIRGO

 **ELECTRO-NUCLEONICS™**

Determinación de INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA para la determinación de "HTLV III"



DETERMINACIONES mediante INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- * Anticuerpos anti - mitocondriales
- * Anticuerpos anti - nucleares
- * Anticuerpos anti - nDNA
- * Anticuerpos frente a Chlamydia Trachomatis.
- * Anticuerpos frente al Citomegalovirus.
- * Anticuerpos frente al V. de Epstein - Barr
- * Anticuerpos frente al Treponema (FTA - ABS)
- * Anticuerpos frente al V. Respiratorio Sincitial.
- * DETERMINACION IFA para "HTLV - III"
- * Anticuerpos frente al V. Herpes Simplex 1
- * Anticuerpos frente al V. Herpes Simplex 2
- * Anticuerpos frente al V. del Sarampión.
- * Anticuerpos frente al V. de las Paperas.
- * Anticuerpos frente al V. de la Rubeola.
- * Anticuerpos frente al Toxoplasma.
- * Anticuerpos frente al V. Varicela - Zoster.

DETERMINACIONES mediante INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Test de identificación y tipificación del Virus Herpes Simplex, tipos 1 & 2.

DETERMINACIONES mediante SISTEMA "ELISA"

*DETERMINACION "ELISA" para "HTLV - III"

NO DUDE EN CONSULTARNOS Y EN SOLICITAR EL NUEVO MANUAL DE TRABAJO DE "REACTIVOS VIRGO", nos pondremos rápidamente en comunicación desde nuestra oficina más cercana a su domicilio.

Deseo recibir mayor información..... presupuesto de los tests.....

Deseo recibir el NUEVO MANUAL DE REACTIVOS VIRGO

Nombre y Apellidos.....

Domicilio..... Tfn.....

Centro de Análisis.....

Localidad.....

COMERCIAL RAFAEL, S.L.

CALLE BOLONIA, 12
TELEFONO 976/23 74 00
TELEX 58252 RAFA E
50008 ZARAGOZA