

Volumen 6. N.º 2
Diciembre 1990
ISSN 02 13-4101

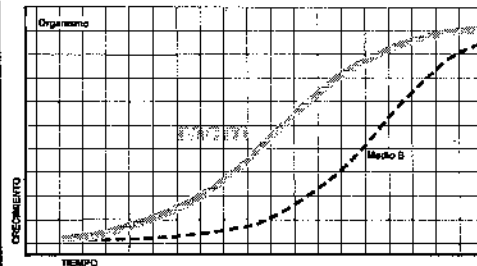
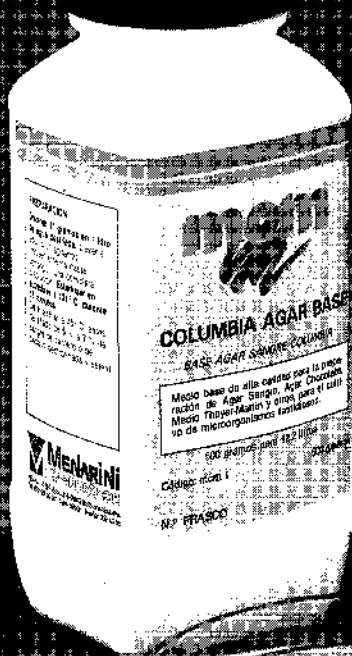
PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

Microbiología



menarini

Medios de cultivo microbiológicos



Las gráficas crecimiento/tiempo permiten la comparación entre distintos medios y su óptima elección

"Seleccionados para su laboratorio"



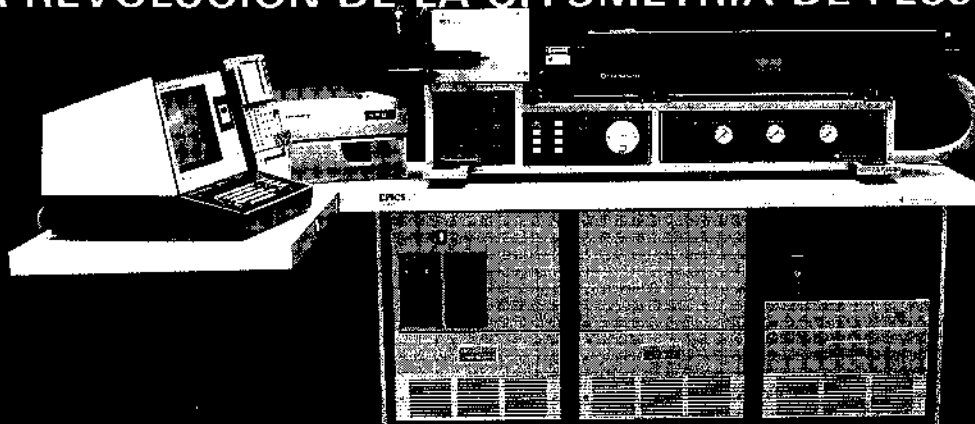
Allonso XII, 587 - Tel: 387 00 92 - Telex 59542
Telefax (93) 399 43 06 BADALONA (España)

SOLICITE INFORMACIÓN
tel. (93) 387 00 92

NOS HEMOS SUPERADO

EPICS[®] CS

LA REVOLUCION DE LA CITOMETRIA DE FLUJO



Hace algunos años COULTER introdujo el EPICS-C, el citómetro de flujo más pequeño y fácil de utilizar. Después de 7 años de experiencia y más de 500 instalaciones en todo el mundo, COULTER se supera introduciendo el EPICS-CS: el «cell sorter» más rápido, sencillo, compacto y económico del mercado, que une a las características del EPICS-C una mayor capacidad de memoria y análisis, impresora gráfica de alta resolución y gran sencillez de manejo.

Si todavía piensa que la Citometría de Flujo es una técnica cara para su laboratorio,
CONSULTENOS.

COULTER



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



EPICS DIVISION
OF COULTER CORPORATION, HIALEAH, FLA.

DESDE.....

La Microbiología
más tradicional

HASTA... La Informatización
más avanzada.

Nos complacemos en poner a su disposición la solución informática más acorde con sus necesidades, desde la configuración más sofisticada y potente hasta la más versátil y funcional. Nuestros programas para gestión integrada de Laboratorios de

Microbiología se componen de un ordenador central tipo TOWER (con Sistema Operativo UNIX), Impresora, Código de Barras y hasta 64 terminales con lápices lectores. El ordenador Central puede tener, desde 150 MB hasta 9 Giga-bytes.



FRANCISCO
SORIA MELGUIZO, S. A.

Caramuel, 38 • Teléfonos: 464 94 50/464 36 00

Fax: (91) 464 62 58

28011 MADRID

MICROBIOLOGIA SEM

Publicación de la Sociedad Española de Microbiología

Consejo Editorial	Especialidades	Special fields
Juan Antonio Ordóñez, Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid.	Editor-Coordinador	Editor-in-chief
José Claudio Pérez Díaz, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, 28035 Madrid.	Microbiología Clínica	Medical Microbiology
Víctor Campos, Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Universidad Católica, Avda. Brasil, 2950 Valparaíso, Chile.	Microbiología Ambiental	Environment Microbiology
Esteban Domingo, Instituto de Biología Molecular, CSIC/UAM, Canto Blanco, 28049 Madrid.	Virología	Virology
Mariano Esteban, Dep. Biochemistry, Box B, Downstate Medical Center 450, Clarkson Avenue, Brooklyn, NY 12203, EE. UU.	Virología e Inmunología	Virology and Immunology
Jordi Barbé, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.	Genética Microbiana	Microbial Genetics
Ricardo Guerrero, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Zona universitaria de Pedralbes, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona.	Ecología Microbiana	Microbial Ecology
Germán Larriba, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Extremadura, Badajoz.	Bioquímica y Fisiología Microbianas	Microbial Biochemistry and Physiology
Manuel Benjamín Manzanal, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.	Morfología y Ultraestructura	Morphology and Ultrastructure
José Martínez Peinado, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid.	Microbiología Industrial	Microbial Industry
M.ª Luisa García López, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León.	Microbiología de los Alimentos	Food Microbiology
Antonio Ventosa, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla.	Taxonomía Bacteriana	Bacterial Taxonomy

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

Aparecen dos números al año (1990), que se integran en un volumen.

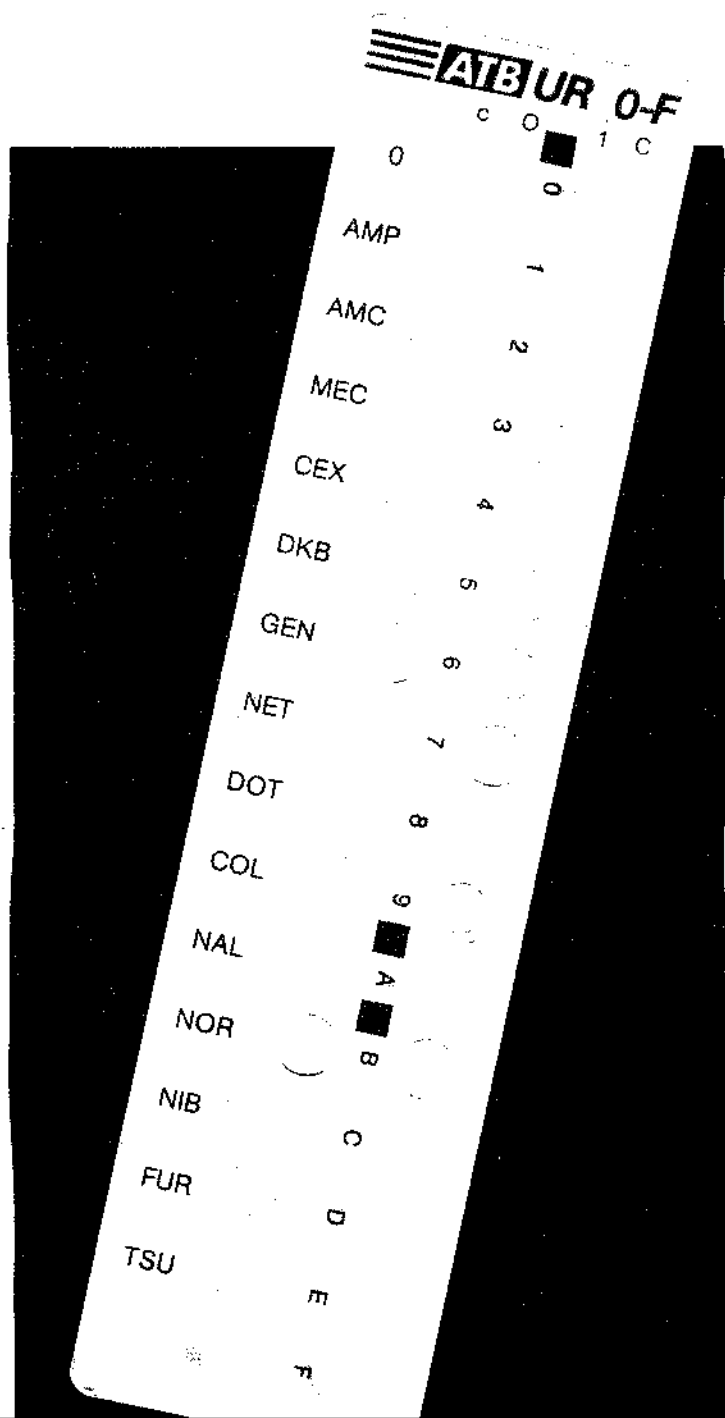
Precio de suscripción anual. Año 1991: España, 5.900 ptas. (IVA incluido); Europa, 60 \$; resto países, 72 \$.

FOTOCOMPOSICION: Lasercom, S. A.

IMPRIME: Tave, S. A.

DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985.

EL SISTEMA ATB



- Manipulación sencilla.
- Antibióticos adecuados según la muestra.
- Lectura automática o directa.
- Resultados fiables y estandarizados.



bioMérieux
Instrumentos y reactivos de laboratorio.

Manuel Tovar, 24 - 28034 MADRID
Tel. (91) 358 11 42 - Fax: (91) 358 06 29
Télex: 46620 bmer.

Delegación en BARCELONA:
Padilla, 312-316. 08025 BARCELONA.
Teléfono: 93 / 255 03 04

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. Acknowledgements and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendation 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 Stricke, P. (1976), *den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glucosylate 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: (García, 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. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. There 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-space on a separate sheet. The size of the photographs should not exceed the printing area (13 × 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.

MINIREVIEWS. Minireviews articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. However, if some authors are interested in publishing minireviews, these will be submitted for publication. They should not be longer than approx. *twelve to twenty* double-spaced typewritten pages *including* the space needed for figures and tables.

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.

Contributions, in duplicate, may be sent to the Chief Editor or to the editor whose special field is the most closely related to the subject matter.

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., Nissey-Meyer, J. and Strike, P. (1976). *den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylase 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 las 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. Sin embargo, si algún autor está interesado en publicar artículos de revisión, éstos tendrán que ser supervisados. Los manuscritos deberán comprender aproximadamente de 12 a 20 páginas (incluidas figuras y tablas) mecanografiadas a doble espacio.

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.

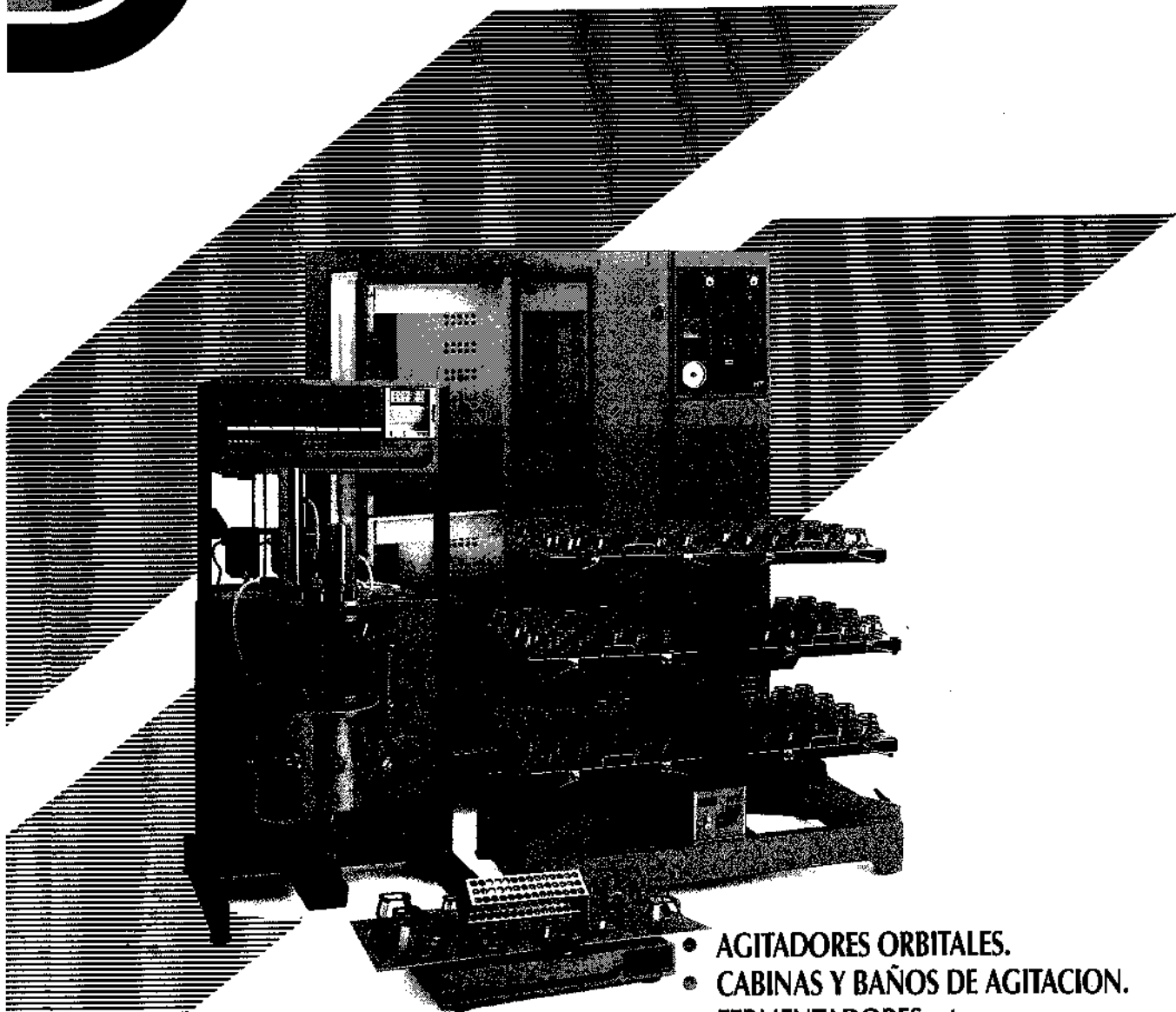
Dos copias de cada manuscrito se enviarán al editor-coordinador o al editor de la especialidad más relacionada con el contenido del trabajo.

NFORS

®



La tecnología INFORS
le sitúa a Vd. en cabeza



CONSULETOS

- AGITADORES ORBITALES.
- CABINAS Y BAÑOS DE AGITACION.
- FERMENTADORES, etc.



CIENTÍFICA, S.A.

Colonia Valcastellano, 3
Teléf. 803 11 50 - Fax 803 58 12
28790 MADRID

Gustavo A. Bécquer, 27
Teléf. 219 30 57
08023 BARCELONA

VITEK

VITEK : la bacteriología automatizada... "a la carta"

Vitek es un automático integral para el "screening" urinario, el antibiograma y la identificación bacteriana.

Sencillez : Vitek simplifica el arduo trabajo cotidiano, mostrando una rapidez y una facilidad desconocidas hasta ahora en bacteriología.

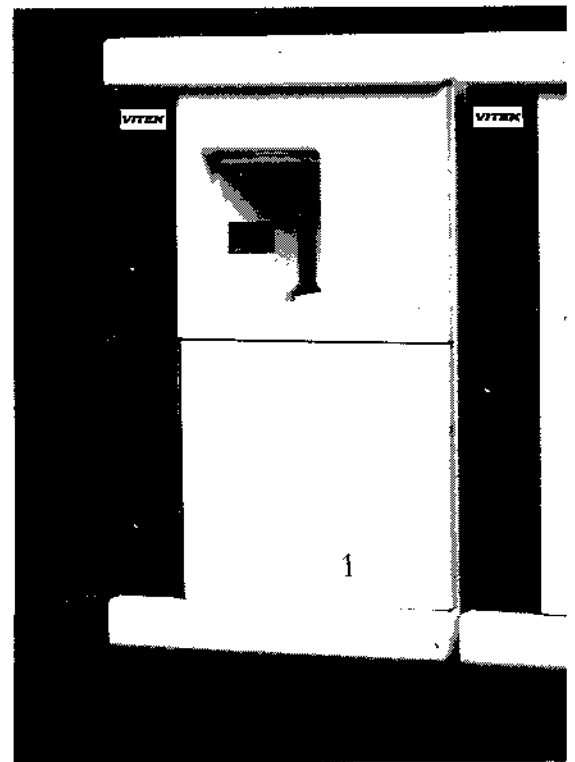
Automatización : la tarjeta se inocula automáticamente a partir de la muestra : orina, o del inóculo estandarizado. Las operaciones de incubación, la lectura y la interpretación son tratados de manera totalmente automática sin ninguna intervención, hasta la edición de la hoja de resultados.

Flexibilidad : en todo momento el aparato se encuentra dispuesto para realizar un antibiograma, una identificación o un "screening" urinario y no importa en que orden, uno a uno o en serie.

Rapidez : la mayor parte de los resultados se obtienen entre 4 y 6 horas.

Elección : Vitek es el único sistema que propone una amplia variedad de análisis :

- identificación : Gram +, Gram—, levaduras, microorganismos anaerobios, Neisseria, Haemophilus, Bacillus...
- detección, recuento e identificación directa de los microorganismos urinarios.
- detección de bacterias enteropatógenas.
- determinación de la CMI y del antibiograma.
- recuento bacteriano a partir de un líquido.





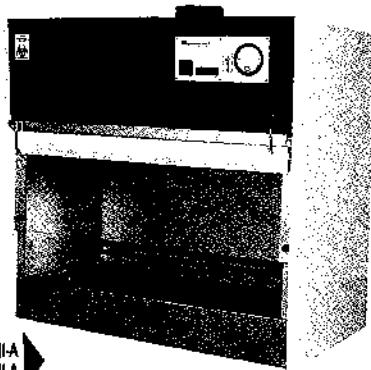
El sistema VITEK

- 1 El preparador hace el vacío para llenar las tarjetas y a continuación las cierra herméticamente.
- 2 El incubador/lector asegura simultáneamente la incubación y la lectura de cada tarjeta cada hora sin ninguna intervención manual. En cualquier momento se puede incorporar a la serie en curso, una nueva tarjeta de antibiograma, de identificación o de "screening" urinario.
- 3 El ordenador ejerce un control permanente de las operaciones que se están realizando, memoriza los valores, los procesa e interpreta los resultados. Puede asociarse un módulo epidemiológico (IMS).
- 4 El terminal permite dialogar con el sistema, personalizar los resultados y editar en cualquier momento los resultados preliminares.
- 5 La impresora edita automáticamente los resultados a medida que estos se encuentran disponibles.

bioMérieux
España

Manuel Tovar, 24 / 28034 MADRID
tels. (91) 358 11 42 - 358 13 04 - fax (91) 358 06 29 - telex 46620 bmer
Delegación:
C/ Padilla, 312. entlo. 3º. 08025 BARCELONA
tel. (93) 255 03 04 - fax (93) 347 96 65
Otras filiales en Alemania, Bélgica, Holanda, Italia, Portugal, Reino Unido,
Suiza y Japón

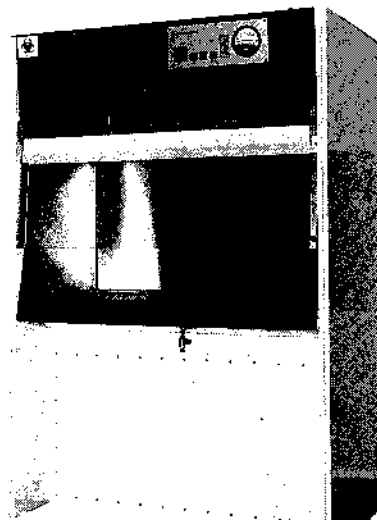
Cabinas de seguridad biológica «Biohazard»



CLASE II-A
Mod. BIO-II-A

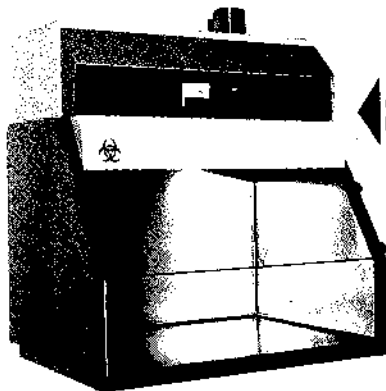
PROTECCION TOTAL DEL OPERADOR (ZONA TRABAJO EN DEPRESION); DEL AMBIENTE (FILTRO HEPA EN LA EXPULSION DEL AIRE); Y DEL PRODUCTO

EL FACTOR DE PROTECCION DE ESTAS CABINAS CUMPLE LAS ESPECIFICACIONES EXIGIDAS POR LA NORMA BRITISH STANDARD BS. 5726, LA N.S.F. STANDARD 49 Y LAS G.L.P. PARA CABINAS BIOHAZARD



CLASE II-B
Mod. BIO-II-B

INDICADAS PARA MANIPULACIONES BACTERIOLOGICAS DE MICROORGANISMOS PATOGENOS



CLASE I
Mod. DEP-I



telstar S

José Tapiolas, 120 • 08226 TERRASSA • Tel. 785 28 00 • Télex: 56101 LIOF E • Telefax: 785 93 42
Delegación: Amado Nervo, 15 • 28007 MADRID • Tel. 433 72 98 - 433 73 48 • Télex: 43542 LIOF E



CONTENTS

	Page
Genetic of lactic acid bacteria with special reference to lactococci. <i>Rodríguez, A. and Vidal, D. R.</i>	51
Growth of yeast microflora during the early stages of the fermentation in inoculated Majorcan musts. <i>Mora, J., Barbas, J. I. and Mulet, A. (*)</i>	65
Sensitivity to phages of <i>Streptomyces coelicolor</i> strains harbouring type II restriction endonucleases. <i>Aparicio, J. F., Barbés, C., Hardisson, C. and Sánchez J. (*)</i>	71
Relation between the production of deoxynivalenol and zearalenone and the mycelium growth of <i>Gibberella zeae</i> on natural solid substrates. <i>Lori, G. A., Henning, C. P., Violante, A., Alippi, H. E. and Varsavsky, E.</i>	76
Dynamical approach to the contamination of the river Segre in Lérida. <i>Palau, A. and Palomes, A.</i>	83
Structure of the DNA of live bacteriophages infecting <i>Micromonospora</i> . <i>Caso, J. L., Hardisson, C. and Suárez, J. E.</i>	94
Isolation, culture and toxicity bioassay with ciliated protozoa. <i>Esteban, G. and Téllez, C.</i>	100

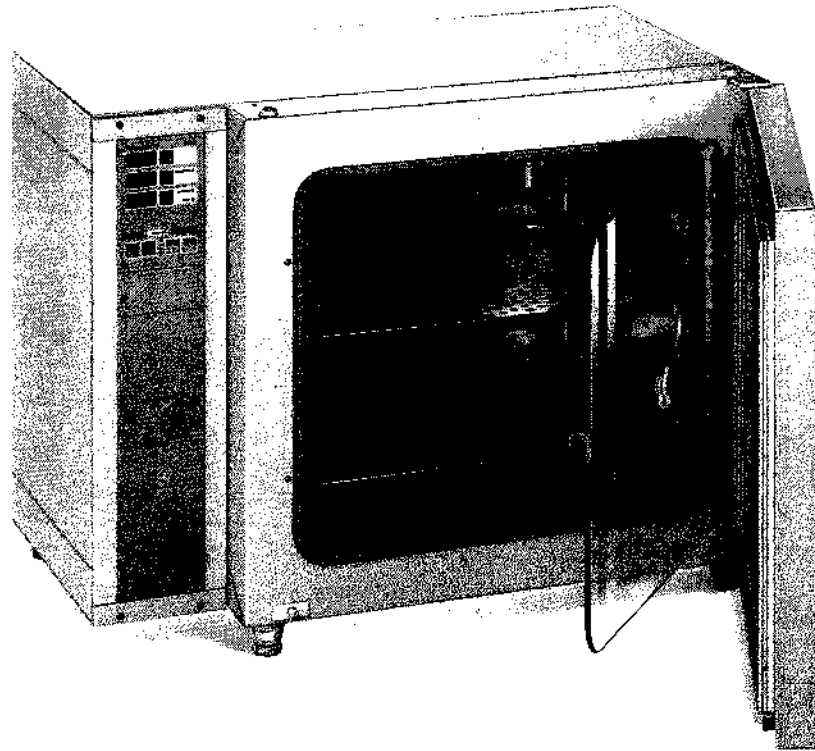
(*) Corresponding author.

INDICE

	Página
Estudios genéticos de bacterias lácticas con referencia especial a los lactococos. <i>Rodríguez, A. y Vidal, D. R.</i>	51
Evolución de la microflora de levaduras durante los primeros días de la fermentación en mostos mallorquines inoculados. <i>Mora, J., Barbas, J. I. y Mulet, A. (*)</i>	65
Efecto de endonucleasas de restricción del tipo II de cepas de <i>Streptomyces coelicolor</i> sobre el desarrollo de diversos fagos. <i>Aparicio, J. F., Barbés, C., Hardisson, C. y Sánchez J. (*)</i>	71
Relación entre la producción de deoxinivalenol y zearalenona y el crecimiento micelial de <i>Fusarium graminearum</i> en sustratos naturales sólidos. <i>Lori, G. A., Henning, C. P., Violante, A., Alippi, H. E. y Varsavsky, E.</i>	76
Aproximación a la dinámica de la contaminación microbiológica del río Segre en Lérida. <i>Palau, A. y Palomes, A.</i>	83
Estructura del DNA de cinco bacteriofagos que infectan a <i>Micromonospora</i> . <i>Caso, J. L., Hardisson, C. y Suárez, J. E.</i>	94
Método de aislamiento, cultivo y bioensayo de toxicidad con protozoos ciliados. <i>Esteban, G. y Téllez, C.</i> ..	100

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

Incubador Compacto de Atmósfera Controlada BB 6060



Características:

- Protección electrónica de sobretemperatura.
- Rango de temperatura: desde 7° C por encima de temperatura ambiente a 50° C.
- Marco para apilamiento de 2 incubadores.
- Sistema Auto-Zero para regulación del CO₂.
- Arranque automático (Auto-Start).
- Alarmas acústica y óptica de seguridad.
- Capacidad de 60 l.
- Control mediante microprocesador.
- Versión especial con interior de cobre con características fungicidas.
- Posibilidad de aplicación también con O₂.
- Puerta calefactada.
- Fácil limpieza y manejo.

Para mayor información remitir a:
HERAEUS, S. A. Agustín de Foxá, 25
28036 MADRID. Tel. 323 31 41

Nombre _____

Empresa _____

Dirección _____

C. P. _____ Provincia _____

Teléfono de contacto _____



Genetics of lactic acid bacteria with special reference to lactococci

Ana Rodríguez^{1*} and Daniel Ramón Vidal²

¹ Instituto de Productos Lácteos de Asturias. CSIC. Ctra. de Infiesto, s/n. 33300 Villaviciosa. Asturias. Spain.

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Jaime Roig, 11. 46010 Valencia. Spain.

(Received June 22, 1990).

Summary

Lactic acid bacteria play an important role in the manufacture of fermented foods. Genetic studies have made these microorganisms, particularly lactococci, accessible to genetic manipulation. The instability of key metabolic traits of lactococci has been explained by the presence of plasmid DNA species. Most genetic interest has been focused to solve the quoted instability and the sensitivity to bacteriophage infection. At the same time, gene transfer systems have been developed and specific genes with commercial significance have been identified and cloned. Lactic acid bacteria can be also used as production organisms of heterologous proteins, e. g. chimosin, lysozyme.

Key words: lactic acid bacteria, plasmid, gene cloning.

Resumen

Las bacterias lácticas juegan un papel importante en la elaboración de alimentos fermentados. La manipulación genética de estos organismos, y en particular de los lactococos, es posible gracias a los estudios genéticos realizados. La presencia de plásmidos explica la inestabilidad de las características metabólicas vitales de los lactococos. El mayor interés genético se ha enfocado en la citada inestabilidad y la sensibilidad a la infección por bacteriófagos. Al mismo tiempo, se han desarrollado sistemas de transferencia genética y se han identificado y clonado genes específicos de interés comercial. Las bacterias lácticas pueden ser utilizadas también como organismos de producción de proteínas heterólogas, tales como quimosina y lisozima.

Introduction

The term «lactic acid bacteria» emerged at the beginning of this century. A definition as gram-positive group of microaerophilic genera whose main fermentation product from carbohydrates is lactate, was given by Orla-Jensen (1931). Nowadays, lactic acid bacteria (LAB) comprise cocci (Streptococci, Pediococci, Leuconostocs) and rods (Lactobacillae and Bifidobacteria) (25, 45).

(*) Corresponding author.

The species of the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Streptococcus* are phylogenetically related as shown by oligonucleotide cataloging of their 16S rRNA, forming a super-cluster within the so-called «Clostridia sub-branch» (107). Recently, the lactic streptococci or group N streptococci were transferred to the genus *Lactococcus* (97, 98). Phenotypic differences among strains of this group allow to distinguish two subspecies of interest for food industry: *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. The citrate-fermenting lactococci, formerly *S. lactis* subsp. *diacetylactis* (26) no longer have subspecies status (81, 98).

LAB *sensu stricto* are members of the indigenous flora of the raw material of food and are used in food technology as starter cultures. They perform an essential role in the production and/or preservation of wholesome foods including a great number of milk-derived products, fermented vegetables, bakery products, fermented animal feed, fermented meats, etc. (108).

The main function of LAB in food fermentations is one of *acidification* resulting from conversion of carbohydrates (mainly lactose) to lactate. The rapid production of lactic acid inhibits the growth of most undesirable spoilage microorganisms and food pathogens.

The great demand of stable starter cultures for food fermentation processes determine the need to obtain new and improved strains in order to perform lactic fermentations in an efficient and predictable way. In this regard, genetic studies have been mainly directed to the group N of streptococci, to a lesser extent to lactobacilli, and have been very limited in *Leuconostoc*s and *Pediococci*. Throughout this review we will put an emphasis on the role of LAB involved in the manufacture of dairy products due to the availability of literature on this subject.

Plasmids in lactic acid bacteria. Functional properties

LAB contain an unusually large complement of plasmid DNA. Most of them are cryptic, i.e. their functional properties have not been elucidated yet (15), but the main industrially important parameters of lactic starter cultures, bacteriophage resistance, lactose, citrate and protein metabolism, are all encoded by plasmid DNA, which is easily lost in many strains (see Table 1). The spontaneous loss of these metabolic properties observed in these bacteria was correlated to the presence

TABLE 1
SOME METABOLIC FUNCTIONS LINKED TO
PLASMID DNA IN LACTIC ACID BACTERIA

Sugar metabolism:
— Lactose.
— Glucose.
— Mannose.
— Galactose.
— Sucrose.
— Xylose.
Proteinase activity.
Citrate metabolism.
Bacteriophage resistance.
Production of antagonistic compounds:
— Nisin.
— Diplococcin.
— Bacteriocins.
Resistance to nisin.
Exopolymer production.

TABLE 2
PLASMIDS CARRYING LACTOSE UTILIZATION AND/OR PROTEINASE GENES

	Lac	Prt	Lac/Prt	Reference
<i>Lactococcus lactis</i> C2	30 Md	18 Md		50
<i>L. lactis</i> ML3	33 Md		33 Md	117
<i>L. lactis</i> 712			33 Md	28
<i>L. lactis</i> 18-16 ¹	41 Md			50
<i>L. lactis</i> DRC1 ¹			31 Md	49
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> B1	37 Md			48
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP		9 Md		61
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ML1			2.2 Md	61
<i>Lactobacillus helveticus</i> 536-2	8.2 Md			104
<i>L. casei</i> DR1002	23 Md			6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> X2	34 Md			85
<i>L. lactis</i> N2	16 Md			85

¹ Citrate fermenting lactococci. Md: Megadaltons. Lac: Lactose utilization. Prt: Proteinase.

of plasmid DNA. For this reason, plasmid biology is becoming an important field of study for strains used for dairy, meat and vegetable fermentation processes. The confirmation of the role of plasmids encoding for traits vital for successful fermentations is supported by physical and genetics studies.

A large variety of plasmids is found in lactococci (15, 72) and lactobacilli (52, 114), while *S. thermophilus* shows almost total lack of plasmids and small number is found in leuconostocs (83) and pediococci (37).

Lactose metabolism

The very efficient conversion of carbohydrates (mainly lactose) to lactic acid by LAB is of great relevance in dairying and preservation of a variety of fermented foods. Two different systems for lactose catabolism have been found in LAB (19): (i) the lactose phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system (PTS) and phospho- β -galactosidase in *L. lactis* strains and *Lb. casei*; (ii) the lactose permease system and a β -galactosidase in *Leuconostoc spp.* and thermophilic LAB.

The lactose-fermenting ability is plasmid-mediated in many lactococci as well as some lactobacilli (Table 2). This conclusion is based on phenotypic, physical and genetic evidence. The spontaneous loss of lactose metabolism (lac^-) was confirmed by McKay et al. (1972), and this could be increased treating cells with acridine dyes or culturing cells at elevated temperatures (6, 42, 67). Presumptive correlation of lac metabolism to plasmid DNA was based on the loss of a particular plasmid from lac^+ strains. The involvement of a specific plasmid in lac metabolism is proved when the introduction of the plasmid into lac^- cells by any of gene transfer systems results in the regaining of the ability.

The lac plasmid encodes for Enzyme II^{lac}, Enzyme III^{lac} and P- β -gal involved in lactose utilization by lactococci (71, 78) and *Lb. casei* (7, 63), as is shown by enzyme complementation analysis. In some lactococci enzymes of tagatose branch of lactose metabolism are coded by genes located on plasmid DNA (12).

Proteolysis

LAB are all nutritionally fastidious and they have an important proteolytic system as a means of getting N from proteins and peptides to promote the rapid growth and consequent acidification du-

ring food fermentations. In addition, the proteolytic system plays a role in the development of the organoleptic properties of foods. The proteolytic activity of LAB has been mainly studied in relation to their function in the manufacture of dairy products.

The instability of proteinases production in lactococci is well known. There is evidence for plasmid linkage of this trait in a number of lactococci strains (see Table 2). Prt variants show a reduced acid production. In some *L. lactis* strains (ML3, C10, M18, 712), the phenotype prt⁺ is associated to the plasmid involved in lac utilization. Similar data for *L. lactis* subsp. *cremoris* (59, 61) and citrate fermenting *L. lactis* strains (49) have been reported. Genetic data on proteinases in the other genera of LAB are not available. In fact, no curing results have been obtained with proteinase plasmids.

Bacteriophage resistance

The common presence of bacteriophages in food fermentations environments has resulted in the need to control phage development because they are able to disrupt growth and acid production of starter cultures.

Within LAB, lactococci and thermophilic streptococci are preferentially attacked by phages and for this reason, bacteriophage resistance mechanisms have been intensively studied in these strains.

Several approaches have been tried in order to develop new phage – resistance strains: *rotation of starter strains; phage inhibitory media; starter concentrates*. However, these attempts have not allowed to eliminate phage contamination. Nevertheless, the genetic studies of phage defense mechanisms have resulted in the identification of a number of plasmids which encode bacteriophage resistance in lactococci (91). The mechanisms of resistance encoded by these plasmids include *interference with phage adsorption* (20, 93), *restriction-modification* (4, 8, 13, 92, 110) and *abortive infection* (21, 35, 42, 103).

The molecular analysis of these mechanisms will be used in genetic programmes of phage insensitive starter cultures development.

Miscellaneous properties

Production of flavour and aroma

A number of compounds, particularly *diacetyl* and perhaps acetate and CO₂, contribute to flavour and aroma of fermented dairy products. All of them result from citrate metabolism in *L. lactis* and several *leuconostoc* species (11), although CO₂ is also produced from lactose in *Leuconostoc* spp. Unstable citrate utilization has been observed and plasmid linkage has been established. Kempler and McKay (1981) have shown that this trait is associated to the presence of a 5.5 MDa plasmid in *L. lactis* subsp. *lactis* 18-16 and DRC1 after obtaining cit⁻ variants by treatment with acridine orange. These variants have lost the citrate permease activity. Cit⁻ variants have also been detected in *L. mesenteroides* which have lost a 10 MDa plasmid (72, 85).

Production of antagonistic compounds

To control the growth of spoilage and pathogenic microorganisms, LAB have a complex antagonistic system. In addition to organic acids production, the antagonistic activity include peroxides, diacetyl, antibiotic —like substances and bacteriocins.

Bacteriocins are bactericidal proteins secreted by many strains of lactic acid bacteria. The antimicrobial activity is mostly directed against closely related bacteria (53). In lactococci it has been demonstrated that bacteriocin production is associated with plasmid DNA (14). However, bacteriocin production and immunity in lactobacilli seems to be either plasmid (53, 96) or chromosomally (47, 53) encoded. In leuconostocs, production of bacteriocin is not well established (53).

In LAB it is also important the production of antagonistic compounds defined as antibiotic-like substances. In this regard, *nisin* is a polypeptide antibiotic produced by *L. lactis*. Nisin contains three unusual aminoacids, dehydroalanine, lanthionine and β -metil-lanthionine and belongs to lantibiotics. Nisin is used as food preservative because of its high potency against certain Gram-positive (*Clostridium* and *Bacillus* spores). The involvement of plasmid DNA in nisin production and resistance was first suggested by Kozaz *et al.* (1974). Physical evidence was established (37, 62, 109). In addition, close genetic linkage of sucrose metabolism (Suc⁺) and nisin production (Nis⁺) was showed (30, 37, 109).

Gene transfer systems

During the last few years, several gene transfer processes have been found in lactic acid bacteria. These systems are essential for the development of genetic technologies applied to the improvement of strains for industrial application. Some of these mechanisms occur naturally (conjugation, transduction) whereas others have been developed at the laboratory and have to use protoplasts (fusion, transformation, transfection).

Transduction

Some bacteriophages act as vectors for transfer of host markers between bacterial cells. This gene transfer system is named transduction. Transduction mediated by virulent phages was first described in detail for streptomycin resistance in *L. lactis* subsp. *lactis* 18-16 (90). Later, McKay *et al.* (1973) described lactose metabolism transduction mediated by a temperate phage. Transduction carried out with induced phages from lac⁺ transductants resulted in an increased frequency of lactose gene transfer (HFT) (74). Other studies showed the cotransduction of lactose metabolism and proteinase activity (29, 73). In addition, it has been shown that transduced lactose plasmids are smaller than the natural ones because the phage head size is too small to accommodate them.

Transduction has also been observed in other species including *L. lactis* subsp. *cremoris* C3 (105) and *Streptococcus thermophilus* (79). However, transduction has not been reported in *Lactobacillus* although a few phages have been described.

Conjugation

Conjugation is a gene transfer mechanism which requires cell to cell contact. In lactococci, conjugation occurs by collecting cells on a membrane filter (33, 82), or by plating cells on an agar medium (49, 75). A new method in which cells are entrapped in calcium alginate gel beads has been recently developed (111).

Conjugal transfer of plasmid-encoded lactose genes between strains of *L. lactis* (32) and from citrate fermenting *L. lactis* 18-16 into a plasmid free derivative of C2 strain (49) were reported. Lactose genes transferred by conjugation have been described in several other lactococcal strains (75, 105).

The transfer processes described above took place at low frequency. However, high frequency

transfer and cell-aggregation phenotypes have been detected between transconjugants (32, 33). These observations were accompanied by the enlargement of lac plasmids. An IS element located on the lac plasmid is responsible of this process in *L. lactis* ML3 (87). However, in *L. lactis* 712 the sex factor is located on the bacterial chromosome (23). In addition, for high frequency transfer and cell aggregation is needed the presence of a chromosomal gene *agg* and the genes for clumping (*clu*) (112).

Conjugal transfer of other plasmid-encoded traits have been obtained: bacteriocin production (82, 89, 99); sucrose-fermenting ability and nisin production (30, 38, 109); proteinase production (33) and bacteriophage resistance (8, 94, 103, 110).

No lactococcal plasmid DNA can also be transferred between lactococci. The pAMB₁, a conjugative plasmid of wide host range isolated from *Enterococcus faecalis*, that encodes an erythromycin resistance determinant, has been transferred by conjugation into a lac defective derivative of *L. lactis* 712 (33), into *L. plantarum* and *L. acidophilus* (101, 115). This plasmid is able to mobilize other plasmids.

Conjugal transfer of transposons and insertion elements to lactic acid bacteria is becoming a potential tool for targeting of chromosomally located genes (40, 41).

Protoplast fusion

Osmotically stabilized protoplasts of LAB (27, 64, 116) produced by enzymatically removing of the cell wall have been used to carry out gene transfer by fusion. The fusion of protoplasts mediated by the fusogenic agent PEG, results in the formation of recombinants containing genetic information from both parental strains. The first successful experiment of protoplast fusion was carried out by Gasson (1980) in *L. lactis* 712 derivatives. Intraspecific fusion of protoplasts has been reported for lactobacilli (46). Intergeneric protoplast fusions have been also reported involving *L. lactis* and lactobacilli (10).

Transformation

Transformation is the process in which the uptake of naked DNA by a bacterial cell results in the acquisition of a specific phenotype. Plasmids act as vehicles of donor DNA in this gene transfer system.

So far, successful genetic modification of bacteria depends on a reliable transformation system. Since natural competence is undemonstrated in lactococci (54, 90), a great effort has been made to introduce DNA in recipient cells using protoplasts. Nevertheless, induced competence has been recently described in *L. lactis* LM0230. This strain has been transformed without protoplasts formation (95). Different protocols of protoplast formation and regeneration have been described in lactococci (24, 27), and the first successful transformation in *L. lactis* was achieved by Kondo and McKay (1982) using a modified protocol of *B. subtilis*. The transformation frequency was very low (8.5 transformants per μg DNA). The optimization of the protocol resulted in an increased frequency (4×10^4) (55). New modifications are carried out in order to get better frequencies. However, transformation in *L. lactis* subsp. *cremoris* has still poor efficiency. In addition, transformation efficiency varies among different lactococci and plasmid incompatibility may also affect it (113).

On the other hand, protoplast cotransformation has been applied to introduce different-sized cryptic plasmids into the plasmid-free *L. lactis* IL1403, using the indicator plasmid pHV1301 (102).

Protoplast transformation has been achieved in several species of lactobacilli: *L. reuteri* (80) and *L. acidophilus* (67). However, *L. casei* and *L. plantarum* protoplast transformation requires the use of liposomes (5). In leuconostocs, no protoplast transformation has been shown.

TABLE 3
STRAINS USED AS HOSTS IN GENE CLONING EXPERIMENTS

Parent strain		Derivative	Phenotype
<i>Lactococcus lactis</i>	C2	LM0230	PF lac ⁻
<i>Lactococcus lactis</i>	712	MG1363	PF lac ⁻
<i>Lactococcus lactis</i>	ML3	MMS36	rec ⁻ lac ⁺
<i>L. lactis</i> ¹	BU2	BU2-60	PF lac ⁻
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	4802	4843	PF lac ⁻
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM20016		PF lac ⁺ em. ²
<i>Leuconostoc para mesenteroides</i>	NZ6009	NZ6091	PF lac ⁻ cit ⁺

¹ Citrate fermenting lactococci. PF: Plasmid-free. lac: Lactose utilization. cit: Citrate fermentation. ems: Erythromycin sensitivity.

Recently, transformation of LAB has been achieved by electroporation, a new technique in which a brief electric discharge is applied to render cells permeable to DNA. Preliminary success with this technique has been reported with *L. lactis* (39). Optimized results have been obtained in *L. lactis* LM0230 (88). Transformation by electroporation was also obtained in the subspecies *cremoris*, *L. casei* and other lactobacilli species (69), and *L. paramesenteroides* (16). Electroporation has been also achieved in *S. thermophilus* (106).

Transfection

This process is equivalent to transformation being the only difference that naked phage DNA rather than a plasmid is used as vehicle of donor DNA. Geis (1982) achieved protoplast transfection in citrate fermenting *L. lactis* F7/2 using DNA of phage P008. The result obtained was 5×10^4 plaques per μg of DNA. The use of liposomes improved the transfection efficiency up to 4×10^6 . Transfection by electroporation has been reported in *L. lactis* (88). Transfection has been also shown in *L. casei* (100) with a low frequency. Recently, higher frequencies were obtained for *L. casei* and *L. bulgaricus* (3).

Gene cloning

Cloning is virtually the only procedure by which a DNA fragment containing a specific gene can be prepared, allowing a direct study of the structure of genes and the control of gene expression. In this regard, the great development of lactic acid bacteria genetics has allowed the recent application of gene cloning techniques in the genetics analysis and practical improvement of these bacteria. This process has several requirements: i) availability of suitable vectors (plasmid and/or bacteriophage DNA) for transporting a desired gene into the appropriate recipient cell; ii) suitable hosts in which cloned DNA is stable maintained and expressed; iii) efficient gene transfer system.

Host-vector system

A reliable and efficient procedure for introducing DNA in LAB is essential for developing a gene cloning system in these industrially important microorganisms.

TABLE 4
LACTIC STREPTOCOCCAL VECTORS

Vector	Parental Plasmid	Resistance Marker	Size (Kb)
pGB301 ^a	pIP501	Cm, Em	9.8
pGKV2 ^b	pWV01	Cm, Em	4.7
pCK1 ^b	pSH71	Cm, Km	5.5
pNZ12 ^b	pSH71	Cm, Km	4.3

^a Non-lactococcal origin vectors. ^b Vectors based on replicons of cryptic plasmids. Cm: Chloramphenicol. Em: Erythromycin. Km: Kanamycin. Kb: Kilobases.

So far, a first generation of host-vectors systems has been developed in lactococci, including some transformable model strains used as hosts, a number of cloning vectors and several transformation protocols. Model strains are plasmid-free derivatives of starter cultures used in the food industry (Table 3).

Concerning to cloning vectors, two main categories can be distinguished (Table 4): i) non-lactococcal origin vectors able to replicate in lactococci and ii) vectors based on replicons of cryptic plasmids that are abundantly present in lactococci.

Cloning vectors of the first class are plasmids derived from the broad host range pAMB and pIP501. Deletion derivatives of these plasmids have been obtained in *S. sanguis* (2), in *B. subtilis* (9), replicating and expressing antibiotic resistance in lactococci (9, 55). The second category of cloning vectors were constructed by adding genetic markers to cryptic plasmids abundantly present in lactococci. Using various approaches, the related plasmids pWV01 and pSH71 have been combined with well-characterized antibiotic resistance genes from *S. aureus* plasmids (31, 57). These vectors—shuttle vectors—replicate in lactic acid bacteria, in *B. subtilis*, and also, in *E. coli*.

Since starter strains are non or poorly transformable, cloning experiments can be performed in these intermediate hosts, using their efficient transformation procedures. Subsequently, the constructed plasmids can be returned to lactococcal hosts without further genetic manipulation.

A third class of cloning vectors has been developed by inserting DNA fragments containing multiple cloning sites into the second category described above, resulting in pCK509 (1), pNZ17, pNZ18, etc., which allow the selection and characterization of expression signals in lactococci.

Apart from lactococci, development of vectors are carried out in lactobacilli. Some resistance-determining plasmids present in lactobacilli can be useful for the construction of vectors. Attempts to construct vectors based on cryptic *Lactobacillus* plasmids have been made but no good results have been achieved (65). Another approach used for transforming lactobacilli was the utilization of lactococcal vectors (5). This strategy has been also used for cloning several genes in *L. casei*, *L. paramesenteroides* and *S. thermophilus*.

In spite of told above, the classical cloning vectors using drug-resistance genes are unsafe for direct use in food manufacture. So that, 'food grade' vectors with genetic markers acceptable for that proposal have to be developed.

Cloning of lactose genes

Several genes of the lactose catabolic pathway have been cloned from plasmid DNA and expressed in different hosts (Table 5). Genes encoding enzyme II^{lac}, enzyme III^{lac} and P-β-Gal of *L. lactis* C2 were cloned in plasmid-free LM2001 (55). In a related study, genes encoding for the same enzymes from *L. cremoris* H2 were cloned in *S. sanguis*. Chromosomal integration of the cloned

TABLE 5
SUMMARY CLONED GENES OF LACTOSE METABOLIC PATHWAY AND PROTEINASE FROM LACTIC ACID BACTERIA

Gene	Plasmid (Origin)	Host for cloning
pbg	pLP712	MG1363, <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
pbg + EnzII ^{lac} + EnzIII ^{lac}	pLM2001	<i>S. sanguis</i> .
tag-1,6-P-aldolase	pD11	<i>E. coli</i>
bg	pLZ15	<i>E. coli</i>
pbg	pMG820	<i>L. paramesenteroides</i>
prt	pWV05	MG1363, <i>B. subtilis</i>
prt	pLP712	MG1363, <i>B. subtilis</i>
prt	pSK111	MG1363, <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i>

pbg: Phospho- β -D-galactosidase. bg: B-galactosidase. prt: Proteinase.

TABLE 6
HETEROLOGOUS GENES CLONED IN LACTIC ACID BACTERIA

Gene	Source
Antibiotic resistance markers:	
— Chloramphenicol	
— Kanamycin	
— Erythromycin	<i>S. aureus/E. faecalis</i>
— Tetracyclin	
B-galactosidase	<i>E. coli</i>
B-lactamase	<i>E. coli</i>
Egg white lysozyme	Hen
Chymosin	Bovine

DNA occurred (44). In addition, lac G gene encoding P- β -Gal from *L. lactis* 712 was isolated from the mini-lactose plasmid pMG820 and cloned and expressed in *E. coli* (70) and *L. lactis* (18). Similar approaches have been used to clone the plasmid encoded lac G genes from *L. casei* in *E. coli* (63) and β -Gal gene (22). On the other hand, a gene from the tagatose 1,6-biphosphate aldolase of *L. lactis* H1 was cloned and expressed in *E. coli* using as vector pACYC184 (66).

Recently, the *L. lactis* gene encoding p- β -gal has been cloned in *L. paramesenteroides*, showing the efficiency of heterologous gene expression signals in this species (15).

Cloning of proteinase genes

In the recent past, the proteinase genes (prt) from *L. cremoris* Wg2 and SK11 and *L. lactis* 712 have been cloned, expressed and sequenced. The cloning in *E. coli* plasmid vector resulted in formation of deletions. Consequently, the prt genes were cloned and expressed either on *B. subtilis* plasmid vectors (34, 58) or on *E. coli* bacteriophage lambda vectors (17). The proteinase genes isolated appear to be quite similar (Table 5).

Cloning of other genes

Chopin *et al.* (1986) cloned genes involved in prophage stability and UV resistance and located on pIL7 plasmid in a plasmid-free derivative of *L. lactis* IL594. Moreover, Loureiro and Chopin (1987) excised the transposon Tn916 as a 22 Kb fragment and cloned in the strain IL594 using the pAMB-derived vector pIL204. That means that direct cloning of large DNA fragments is possible in lactococci, allowing the molecular analysis of gene clusters. On the other hand, cloning and expression of important heterologous genes have been achieved in LAB as is shown in Table 6.

Expression signals

In order to establish efficient expression systems in lactococci, several promoters, ribosome-binding sites (RBS) and terminators have been isolated. The identification of these signals was achieved by random isolation using expression — probe vectors. These vectors are based on the promoter-less chloramphenicol acetyl transferase (cat-86) gene and have allowed to isolate expression signals in *L. lactis*, *E. coli* and *B. subtilis*. So far, the expression signals identified show a sequence organization which is characteristic for Gram positives. Thus, expression of both homologous and heterologous genes can be achieved in LAB.

Conclusions

Lactic acid bacteria are a unique group of industrially important microorganisms. In the recent past the genetic progress on these bacteria has allowed to carry out fundamental and applied research directed to improve their use as starters and production organisms in the food industry. These studies still have to continue.

References

1. Anderson, P. H., Rodríguez A. and Gasson, M. J. (1987). Further development of lactic streptococcal shuttle vectors. Biotechnology Action Programma ELWW Meeting. Biotechnology of lactic acid bacteria. University of Ionnina, 30-31.
2. Behnke, D., Gilmore, M. S. and Ferreti, J. J. (1981). Plasmid pG301, a new multiple resistant streptococcal cloning vehicle and its use in cloning of the gentamicin/kanamicin resistance determinant. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 414-421.
3. Boizet, B., Flickinger, J. L. and Chassy, B. M. (1988). Transfection of *Lactobacillus bulgaricus* Protoplasts by bacteriophage DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3014-3018.
4. Boussemaer, J. P., Schrauwen, P. P., Sourrouille, J. L. and Guy, P. (1980). Multiple modification/restriction systems in lactic streptococci and their significance in defining a phage-typing system. *J. Dairy Res.* **47**, 401-409.
5. Chassy, B. M. (1987). Prospects for the genetic manipulation of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 297-312.
6. Chassy, B. M., Gibson, E. M. and Giuffrida, A. (1978). Evidence for plasmid-associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Curr. Microbiol.* **1**, 141-144.
7. Chassy, B. M. and Thompson, J. (1983). Regulation of lactose-phosphoenol pyruvate dependent phosphotransferase system and β -D-phosphogalactosidase galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **154**, 1195-1203.
8. Chopin, A., Chopin, M. C., Moillot-Batt, A. and Langella, P. (1984). Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* **11**, 260-263.
9. Chopin, M. C., Chopin, A., Rouaut, A. and Simon, D. (1986). Cloning in *Streptococcus lactis* of plasmid mediated UV resistance and effect on prophage stability. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 233-237.
10. Cocconcelli, P. S., Morelli, L., Vescovo, M. and Bottazzi, V. (1986). Intergeneric protoplast fusion in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**, 211-214.
11. Cogan, T. M. (1983). Some aspects of the metabolism of dairy starter cultures. *Ir. J. Food. Sci. Technol.* **7**, 1-13.
12. Crow, V. L., Davey, G. P., Pearce, L. E. and Thomas, T. D. (1983). Plasmid linkage of the D-tagatose 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect on lactose and galactose metabolism. *J. Bacteriol.* **153**, 76-83.

13. Daly, C. and Fitzgerald, G. P. (1982). Bacteriophage DNA restriction and the lactic streptococci. *In*: D. Schlessinger (ed.) Microbiology, pp. 213-216. ASM. Washington, D. C.
14. Davey, G. P. (1984). Plasmid associated with diplococcal production in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 895-896.
15. Davies, F. L. and Gasson, M. L. (1983). Genetics of dairy cultures. *Ir. J. Food. Sci. Technol.* **7**, 49-60.
16. David, S., Simmons, G. and De Vos, W. M. (1989). Plasmid transformation by electroporation of *Leuconostoc parame-senteroides* and its use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1483-1489.
17. De Vos, W. M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **48**, 281-295.
18. De Vos, W. M. and Gasson, M. J. (1989). Structure and expression of the *Lactococcus lactis* gene for phospho- β -galactosidase (lac G) in *E. coli* and *L. lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1833-1846.
19. De Vos, W. M. and Simmons, G. (1988). Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the p- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* **70**, 461-473.
20. De Vos, W. M., Underwood, H. M. and Davies, F. L. (1984). Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 175-178.
21. Duckworth, D. H., Glenn, J. and McCorquodale, D. J. (1981). Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetics elements. *Microbiol. Rev.* **45**, 52-71.
22. Flickinger, J. L., Porter, E. V. and Chassy, B. M. (1986). Molecular cloning of a plasmid encoded β -galactosidase from *Lactobacillus casei* (Abstract H-179), pp. 156, meeting of the AMS.
23. Fitzgerald, G. and Gasson, M. J. (1988). In vivo gene transfer systems and transposons. *Biochimie* **70**, 489-502.
24. Fujita, Y., Okamoto, T. and Irie, R. (1983). Protoplast formation and regeneration in lactic streptococci. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2103-2105.
25. Garvie, E. I. (1984). *In Davies and Law (eds.) Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, pp. 35-66. Elsevier Applied Sciences Publishers. London.
26. Garvie, E. I. and Farrow, J. A. (1982). *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen) comb. nov. and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (Matuszewski et al.) nom. rev. comb. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, **32**(4), 453-455.
27. Gasson, M. J. (1980). Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 99-102.
28. Gasson, M. J. (1982). Identification of the lactose plasmid from *Streptococcus lactis* 712. *In*: D. Schlessinger (ed.), *Microbiology*, pp. 217-220. AMS. Washington, D. C.
29. Gasson, M. J. (1983). Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 275-282.
30. Gasson, M. J. (1984). Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**, 7-10.
31. Gasson, M. J. and Anderson, P. H. (1985). High copy number plasmid vectors for use in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 193-196.
32. Gasson, M. J. and Davies, F. L. (1979). Conjugal transfer of lactose genes in group N streptococci. *Soc. Gen. Microbiol. Quart.* **6**, 87-93.
33. Gasson, M. J. and Davies, F. L. (1980). Conjugal transfer of the drug resistance plasmid pAMB₁, in the lactic acid streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **7**, 51-53.
34. Gasson, M. J., Hill, S. A. and Anderson, P. H. (1987). Molecular genetics of metabolic traits in lactic streptococci. *In*: Ferreti and Curtis (eds.), *Streptococcal Genetics*, AMS.
35. Gautier, M. and Chopin, M. C. (1987). Plasmid determined systems for restriction and modification activity and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 923-927.
36. Geis, A. (1982). Transfection of protoplasts of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 119-122.
37. González, C. F. and Kunka, B. S. (1983). Plasmid transfer in *Pedococcus* spp.: Intergeneric transfer of pIP501. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(1), 81-89.
38. González, C. F. and Kunka, B. S. (1985). Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 627-633.
39. Harlander, S. (1987). Transformation of *S. lactis* by electroporation. *In*: Ferreti and Curtis (eds.), *Streptococcal genetics*, pp. 229-233. ASM. Washington, D. C.
40. Hill, C., Daly, C. and Fitzgerald, G. P. (1985). Conjugal transfer of the transposon TN 919 to lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**, 115-119.
41. Hill, C., Daly, C. and Fitzgerald, G. I. (1987). Development of high frequency delivery system for transposon Tn 919 in lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 74-78.
42. Hill, C., Pierce, K. and Klaenhammer, T. R. (1989). The conjugative plasmid pTR2030 encodes two bacteriophage defense mechanisms in lactococci, restriction-modification (R^+/M^+) and abortive infection (Hps^+). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2416-2419.
43. Hofer, F. (1977). Involvement of plasmids in lactose metabolism in *Lactobacillus casei* suggested by genetic experiments. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 167-170.
44. Inamine, J. M., Lee, L. N. and Leblanc, D. J. (1986). Molecular and genetic characterization of lactose-metabolic genes of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* **167**, 855-862.

45. Ingram, M. (1975). Lactic acid bacteria in beverages and foods. In: Carr, Cutting and Whiting (eds.). Fourth Long Ashton Symposium 1973, pp. 1-13. Academic Press, London.
46. Iwata, M., Mada, M. and Ishiwa, H. (1986). Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 392-393.
47. Joerder, M. C. and Klaenhammer, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. Appl. Environ. Microbiol. **167**, 439-446.
48. Klaenhammer, T. R., McKay, L. L. and Baldwin, K. A. (1978). Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Appl. Environ. Microbiol. **35**, 592-600.
49. Kempler, G. M. and McKay, L. L. (1979a). Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid linked citrate utilization. Appl. Environ. Microbiol. **37**, 316-323.
50. Kempler, G. M. and McKay, L. L. (1979b). Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol. **37**, 1041-1043.
51. Kempler, G. M. and McKay, L. L. (1981). Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. J. Dairy Sci. **64**, 1527-1539.
52. Klaenhammer, T. R. (1984). A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Curr. Microbiol. **10**, 23-28.
53. Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie **70**, 337-349.
54. Kondo, J. K. and McKay L. L. (1982). Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol. **43**, 1213-1215.
55. Kondo, J. K. and McKay, L. L. (1984). Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: Optimization and use in molecular cloning. Appl. Environ. Microbiol. **48**, 252-259.
56. Kondo, J. K. and McKay, L. L. (1985). Gene transfer systems and molecular cloning in group N streptococci: A review. J. Dairy Sci. **68**, 2143-2159.
57. Kok, J., Van Der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1984). Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **48**, 726-731.
58. Kok, J., Van Dijk, J. M., Van Der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1985). Cloning and expression of a *Streptococcus cremoris* proteinase in *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **50**, 94-101.
59. Kok, J. and Venema, G. (1978). Genetics of proteinase of lactic acid bacteria. Biochimie, **70**, 475-488.
60. Kozak, W., Rajchert-Trzypil, M. and Dobrzanski, W. T. (1974). The effect of proflavin, ethidium promide and elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin-producing strains of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. **83**, 295-302.
61. Larsen, J. D. and McKay, L. L. (1978). Isolation and characterization of plasmid DNA in *Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. **36**, 944-952.
62. Leblanc, D. J., Crow, V. L. and Lee, L. V. (1980). Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzymes among strains of *Streptococcus lactis*. In: C. Stuttard and K. R. Rozee (eds). Plasmids and transposons: Environmental effects and maintenance mechanisms, pp. 31-41. Academic Press Inc., New York.
63. Lee, L. J., Hansen, J. B., Jaguszyn-Krynicka, E. K. and Chassy, B. M. (1982). Cloning and expression of the β -D-phosphogalactosidase galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei* in *E. coli* K-12. J. Bacteriol. **152**, 1138-1146.
64. Lee-Wicker, L. and Chassy, B. M. (1984). Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. **48**, 994-1000.
65. Lee-Wicker, L. and Chassy, B. M. (1985). Molecular cloning and characterization of crytic plasmids isolated from *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbiol. **49**, 1154-1161.
66. Limsowtin, G. K. Y., Crow, V. L. and Pearce, L. E. (1986). Molecular cloning and expression of *Streptococcus lactis* tagatose-1,6-biphosphate aldolase gene in *E. coli*. FEMS Microbiol. Lett. **33**, 79-83.
67. Lin, J. H. C. and Savage, D. C. (1986). Genetic transformation of rifampicin resistance in *Lactobacillus acidophilus*. J. Gen. Microbiol. **132**, 2107-2111.
68. Loureiro dos Santos, A. D. and Chopin, A. (1987). Shotgun cloning in *Streptococcus lactis*. FEMS Microbiol. Lett. **42**, 209-212.
69. Luchansky, J. B., Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. (1988). Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. Mol. Microbiol. **2**, 637-646.
70. Maeda, S. and Gasson, M. J. (1986). Cloning, expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- β -D-galactosidase. J. Gen. Microbiol. **132**, 331-340.
71. McKay, L. L. (1983). Functional properties of plasmids in lactic streptococci. Antonie van Leewenhock, **49**, 259-274.
72. McKay, L. L. (1985). Role of plasmids in starter cultures. In: Stanley and Gilliland (eds.). Bacterial Starter Cultures for Foods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
73. McKay, L. L. and Baldwin, K. A. (1974). Simultaneous loss of proteinase and lactose utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. Appl. Microbiol. **28**, 342-346.
74. McKay, L. L., Baldwin, K. A. and Efstathiou, J. D. (1976). Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. Appl. Environ. Microbiol. **32**, 45-52.

75. McKay, L. L., Baldwin, K. A. and Walsh, P. M. (1980). Conjugal transfer of genetic information in group N streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 84-91.
76. McKay, L. L., Baldwin, K. A. and Zottola, E. A. (1972). Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Microbiol.* **23**, 1090-1096.
77. McKay, L. L., Cords, B. R. and Baldwin, K. A. (1973). Transduction of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *J. Bacteriol.* **115**, 810-815.
78. McKay, L. L., Miller, A., Sandine, W. E. and Elliker, P. R. (1970). Mechanisms of lactose utilization by lactic acid streptococci: enzymatic and genetic analysis. *J. Bacteriol.* **103**, 804-809.
79. Mercenier, A., Robert, C., Romero, D. A., Slos, P. and Lemoine, Y. (1987). Transfection of *Streptococcus thermophilus* spheroplasts. In: Ferretti and Curtis (eds.), *Streptococcal Genetics*, pp. 234-237. AMS, Washington, D. C.
80. Morelli, L., Cocconcelli, P. S., Bottazzi, V., Damiani, G., Ferretti, L., Sgaramea, V. (1987). *Lactobacillus* protoplast transformation. *Plasmid*, **17**, 73-75.
81. Mundt, J. O. (1986). Enterococci and lactic acid streptococci, In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair and M. E. Sharpe (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1063-1066. Williams and Wilkins, Baltimore.
82. Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. (1984). Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J. Bacteriol.* **157**, 833-838.
83. Orberg, P. G. and Sandine, W. E. (1984). Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 1129-1133.
84. Orla-Jensen, S. (1931). In: *Dairy Bacteriology*, 2nd edition.
85. O'Sullivan, T. and Daly, C. (1982). Plasmid DNA in *Leuconostoc* species. *Ir. J. Food Sci. Technol.* **6**, 206.
86. Pearce, L. E., Skipper, N. A. and Jarvis, B. D. W. (1974). Proteinase activity in slow lactic-acid producing variants of *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol.* **27**, 933-937.
87. Polzin, K. M. and Shimizu-Kadota, M. (1987). Identification of a new insertion element, similar to Gram-Negative IS26, on the lactose plasmid of *Streptococcus lactis* ML3. *J. Bacteriol.* **169**, 5481-5488.
88. Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J. and Davidson, B. E. (1988). A simple and rapid method for genetic transformation of lactic streptococci by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 655-660.
89. Romero, D. A., Slos, P., Robert, C., Castellino, J. and Mercenier, A. (1987). Conjugative mobilization as an alternative vector delivery system for lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2405-2413.
90. Sandine, W. E., Elliker, P. R., Allen, L. K. and Brown, W. C. (1962). Genetic exchange and variability in lactic streptococci starter organisms. *J. Dairy Sci.* **45**, 1266-1271.
91. Sanders, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1981). Evidence for plasmid linkage of restriction and modification in *Streptococcus cremoris* KH. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 944-950.
92. Sanders, M. E. (1988). Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochemie* **70**, 411-421.
93. Sanders, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1983). Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1125-1133.
94. Sanders, M. E., Leonhard, P. J., Sing, W. D. and Klaenhammer, T. R. (1986). Conjugal strategy for construction of fast acid-producing, bacteriophage-resistance lactic streptococci for use in dairy fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1001-1007.
95. Sanders, M. E. and Nicholson, (1987). A method for genetic transformation of nonprotoplasted *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1730-1736.
96. Schillinger, V. and Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1901-1906.
97. Schleifer, K. H. and Kilpper-Balz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 1-19.
98. Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D. and Fisher, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 183-185.
99. Scherwitz, K. M., Baldwin, K. A. and McKay, L. L. (1983). Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylatis* strain WM4: transferability to *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1506-1512.
100. Shimizu-Kadota, M. and Kudo, S. (1984). Liposome-mediated transfection of *Lactobacillus casei* spheroplasts. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1105-1107.
101. Shrago, A. W., Chassy, B. M. and Dobrogosz, W. J. (1986). Conjugal plasmid transfer (pAM β_1) in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 574-576.
102. Simon, D., Rouault, A. and Chopin M. C. (1985). Protoplast transformation of group N streptococci with cryptic plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**, 239-244.
103. Sing, W. D. and Klaenhammer, T. R. (1986). Conjugal transfer of bacteriophage resistance determinants on pTR2030 into *Streptococcus cremoris* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1264-1271.
104. Smiley, M. B. and Fryder, V. (1981). Plasmids, lactic acid production and N-acetyl-D-glucosamine fermentation in *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 777-781.

105. Snook, R. J. McKay, L. L. and Ahlstrand, G. G. (1981). Transduction of lactose metabolism by *Streptococcus cremoris* C3 temperate phage. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 897-903.
106. Somkuti, G. A. and Steinberg, D. H. (1988). Genetic transformation of *Streptococcus thermophilus* by electroporation. *Biochimie* **70**, 579-585.
107. Stackebrandt, E., Fowler, W. J. and Woese, C. R. (1983). A phylogenetic analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *System Appl. Microbiol.* **4**, 326-337.
108. Steinkraus, K. H. (1983). Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 337-348.
109. Steele, J. L. and McKay, L. L. (1986). Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 57-64.
110. Steenson, L. R. and Klaenhammer, T. R. (1986). Plasmid heterogeneity in *Streptococcus cremoris* M12R: effects on proteolytic activity and host-dependent phage replication. *J. Dairy Sci.* **69**, 2227-2236.
111. Steenson, L. R. and Klaenhammer, T. R. (1987). Conjugal transfer of plasmid DNA between streptococci immobilized in calcium alginate gel beads. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 898-900.
112. Van der Lelie, D. (1989). Mechanisms of DNA transfer in lactococci. Ph. D. Degree. University of Groningen. The Netherlands.
113. Van der Lelie, D., Van der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1988). Effect of plasmid incompatibility on DNA transfer to *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 865-871.
114. Vescovo, M., Botazzi, V., Sarra, P. G. and Dellaglio, F. (1981). Evidence of plasmid deoxyribonucleic acid in *Lactobacillus*. *Microbiologica*, **4**, 413-419.
115. Vescovo, M., Morelli, L., Botazzi, V. and Gasson, M. J. (1983). Conjugal transfer of broad-host range plasmid pAMB₁. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 753-755.
116. Vescovo, M., Morelli, L., Cocconcelli, P. S. and Botazzi, V. (1984). Protoplast formation, regeneration and plasmid curing in *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 333-334.
117. Wash, P. M. and McKay, L. L. (1982). Restriction endonuclease analysis of the lactose plasmid in *Streptococcus lactis* ML3 and two recombinant lactose plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1006-1010.

Evolución de la microflora de levaduras durante los primeros días de la fermentación en mostos mallorquines inoculados

J. Mora, J. I. Barbas y A. Mulet*

*Universitat de les Illes Balears. Facultat de Ciències. Carrer. Valldemossa, km 7.5, E07071 Palma de Mallorca.
(Recibido octubre 14, 1989/marzo 23, 1990)*

Summary

Three fermentations were carried out with grape must of the Callet variety. This cultivar is considered autochthonous from the island of Majorca. Two tanks were inoculated with starting cultures of selected yeasts and the last was fermented spontaneously by wild yeasts. The frequency of yeast isolates during the early stages of the fermentation, showed that *Candida stellata* was more affected by the inoculation than the other wild yeasts with the exception of *Saccharomyces cerevisiae*. The chemical analyses of wines showed a better alcoholic rate and less volatile acidity in the inoculated wines. Two sensorial analyses were performed and significant differences between the wines were noted.

Key words: yeast, inoculation, wine, S. cerevisiae.

Resumen

Se han llevado a cabo tres fermentaciones con mosto de uva de la variedad Callet, considerada autóctona de la isla de Mallorca. Dos se iniciaron con la adición de cultivos de levaduras seleccionadas y la tercera se llevó a cabo por fermentación espontánea. Las frecuencias de aislamiento de las distintas especies de levadura muestran que la especie más afectada por la inoculación es *Candida stellata*, mientras que el resto de las especies, con la excepción de *Saccharomyces cerevisiae*, se ven menos influenciadas por la inoculación. Los análisis químicos de los vinos muestran un mayor rendimiento alcohólico y menor acidez volátil en los vinos inoculados respecto al de fermentación espontánea. Se ha realizado un análisis sensorial que ha demostrado la existencia de diferencias significativas entre ambos tipos de vinos.

Parte de los resultados del presente trabajo fueron presentados en la VI Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos de la SEM.

Introducción

La distribución de las distintas especies de levaduras a lo largo del proceso fermentativo del mosto de uva es hoy en día un hecho bien conocido tanto en España (10) como en otros países (2).

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

La evolución de dichas especies ha sido también establecida (7). Sin embargo, esta evolución puede sufrir modificaciones debidas a la utilización de cultivos iniciadores (8, 9). Algunos autores son partidarios de utilizar técnicas especiales de vinificación que respetan en mayor medida la ecología de las levaduras mediante la utilización escalonada de varias cepas que pueden ser de distintos géneros (5). Sin embargo, la técnica más corriente de inoculación es la de utilizar una cepa seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los cultivos iniciadores de levaduras seleccionadas para vinificación han sido usados desde hace tiempo en la práctica enológica de los países de tradición vitivinícola reciente (12). Sin embargo, estas técnicas de fermentación han tardado más en introducirse en Europa y no están generalizadas todavía en España, aunque el interés por su utilización aumenta constantemente.

En la isla de Mallorca la vinificación tradicional se lleva a cabo mediante las levaduras silvestres, siendo la utilización de levaduras seleccionadas prácticamente inexistente. La distribución de las especies que conducen la fermentación en los mostos de la isla ha sido descrita en los últimos años (13). Sin embargo, no se había estudiado, hasta el momento, el efecto de la inoculación sobre esta microflora ni sobre la calidad de los vinos. El objetivo de este trabajo ha sido la comparación desde el punto de vista microbiológico de la fermentación espontánea frente a la utilización de levaduras seleccionadas en los mostos mallorquines. Los tipos de vinos obtenidos con los dos procedimientos se compararon mediante el análisis físico-químico y el análisis sensorial.

Material y métodos

Cepas de levadura: Se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se habían aislado de la fermentación de mostos mallorquines en un trabajo anterior (13).

Vinificaciones: Se llevaron a cabo tres vinificaciones con mosto de la variedad autóctona Callet, obtenido mediante estrujado mecánico y posterior escurrido. Las fermentaciones se realizaron a escala semiindustrial, utilizando depósitos de PVC de unos 400 litros de capacidad. La concentración inicial de SO₂ fue de unos 100 mg/L y la temperatura de fermentación se controló de manera que en ningún momento se superaron los 30° C. Dos de los mostos (A y B) se inocularon con un 2% (v/v) de cultivo iniciador (ca. 10⁶ cel/ml), tal como describe Daudt (6), y el tercero (C) se dejó fermentar espontáneamente por las levaduras silvestres.

TABLA 1
ESPECIES DE LEVADURA AISLADAS DE LOS MOSTOS ANTES DE INICIARSE LA FERMENTACION

Especie	C		B		A	
	n	%	n	%	n	%
<i>Candida stellata</i>	9	29,9	11	36,7	10	33,3
<i>Candida pulcherrima</i>	1	3,3	1	3,3	2	6,7
<i>Candida steatolytica</i>	2	6,6	0	—	0	—
<i>Candida diversa</i>	1	3,6	0	—	0	—
<i>Kloeckera apiculata</i>	8	26,7	10	33,3	9	29,9
<i>Kloeckera apis</i>	6	20,0	6	20,0	6	20,0
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	1	3,3	0	—	0	—
<i>Issatchenkia terricola</i>	2	6,6	1	3,3	1	3,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	—	1	3,3	2	6,7

n: Número de aislamientos.

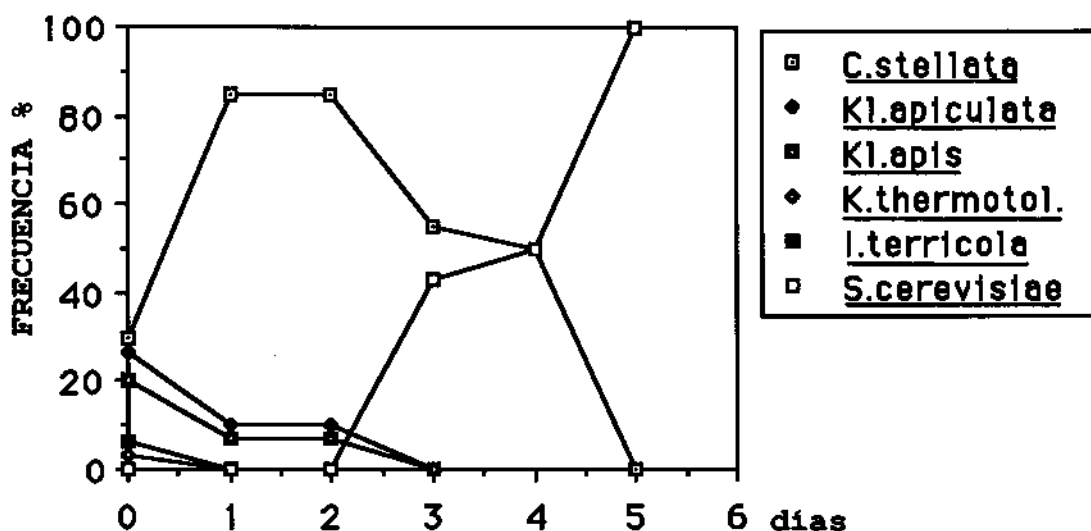


Fig. 1. Frecuencias de aislamiento de las distintas especies de levadura durante los primeros días de la fermentación del mosto no inoculado C.

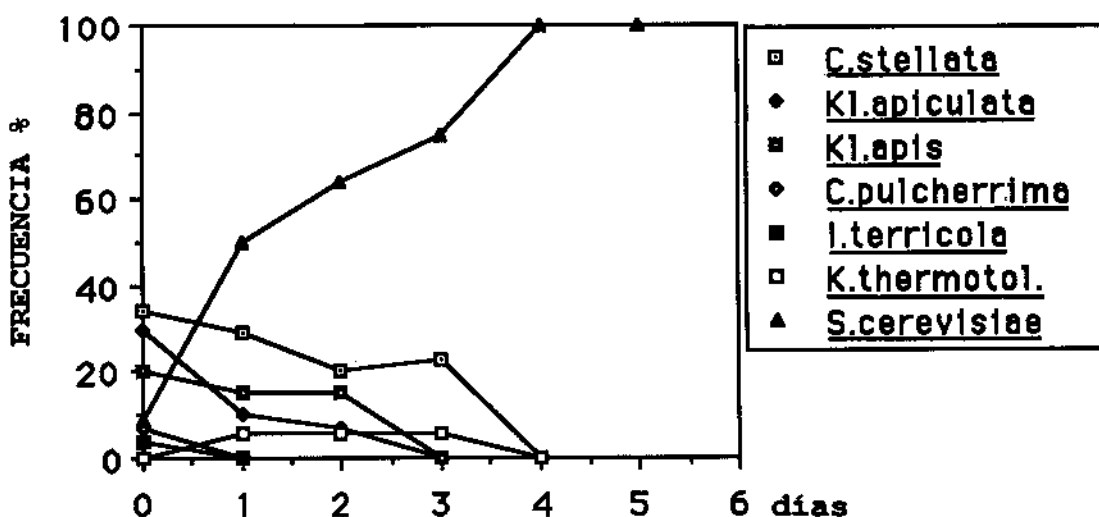


Fig. 2. Frecuencias de aislamiento de las distintas especies de levadura durante los primeros días de la fermentación del mosto inoculado B.

Toma de muestras, aislamiento e identificación de las levaduras: De cada una de las tres fermentaciones se tomaron seis muestras. La primera fue tomada inmediatamente después de la adición del cultivo iniciador y las restantes en cada uno de los cinco días sucesivos. Una vez convenientemente diluidas, las muestras se sembraron en superficie sobre placas de agar YM (DIFCO) y se incubaron de tres a cinco días a 25° C. A continuación se tomaron al azar 30 colonias de una placa contable. Los cultivos, una vez purificados, se identificaron según las descripciones y las claves propuestas por Barnett y col (3) y Kreger-Van Rij (11).

Análisis químicos: Los análisis químicos de mosto y vinos se llevaron a cabo por técnicas habituales (1). Los componentes volátiles fueron determinados por cromatografía de gases (Columna

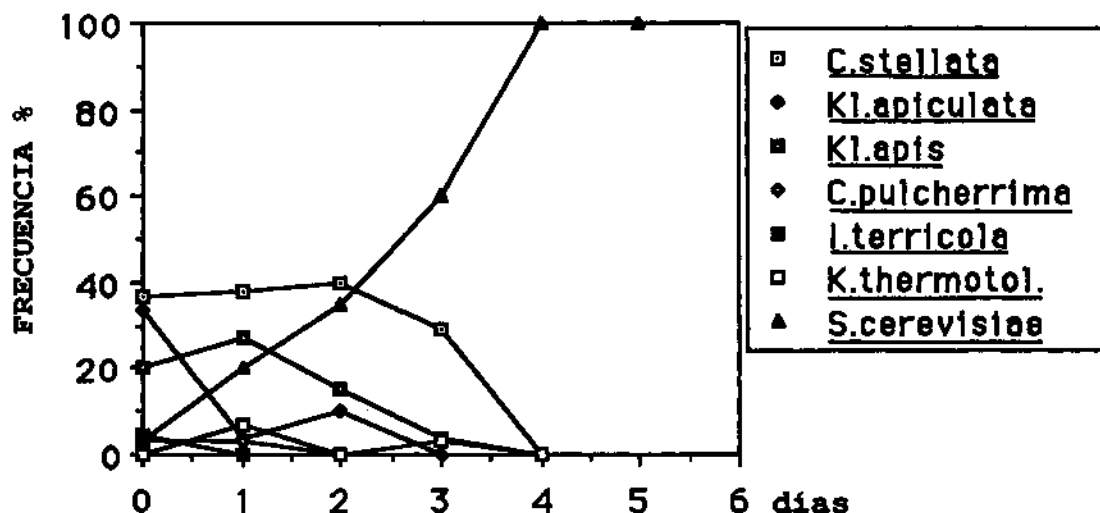


Fig. 3. Frecuencias de aislamiento de las distintas especies de levadura durante los primeros días de la fermentación del mosto inoculado A.

de 2 m × 1/8" de Carbowax 20M sobre Carbopack B de 60/80 mesh. Iny. 150° C, Det. 175° C, Temp. prog. 4 min a 150° C, 5° C/min hasta 150° C. Gas portador: N₂. Caudal: 20 mL/min. Detector: FID).

Análisis sensorial: El análisis sensorial de los vinos A y C se llevó a cabo con un grupo de 21 jueces en condiciones estandarizadas (4, 14). Las pruebas sensoriales utilizadas fueron la prueba triangular y una prueba de tipo «A o no A».

Resultados y discusión

Los aislamientos de levaduras realizados en los mostos antes de iniciarse la fermentación muestran la presencia de nueve especies (Tabla 1). Las especies con mayor frecuencia de aislamiento en los tres mostos son *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata* y *Kloeckera apis*. También se aísla en los tres mostos, aunque con frecuencias sensiblemente menores, *Candida pulcherrima* e *Issatchenkia terricola*. En el mosto no inoculado (C) se aíslan además *Candida diversa*, *C. steatolytica* y *Kluyveromyces thermotolerans*. En los mostos inoculados (A y B) se aísla también *Saccharomyces cerevisiae*.

La Figura 1 muestra la evolución de las especies a lo largo de los primeros días de la fermentación en el mosto C. La frecuencia de *C. stellata* aumenta el primer día y se mantiene como especie predominante durante los tres primeros días de la fermentación. Las especies apiculadas *Kl. apiculata* y *Kl. apis* se mantienen en frecuencias bajas hasta el segundo día, y el resto de las especies no se aíslan ya en el primer día de fermentación. *S. cerevisiae* no se empieza a aislar hasta el tercer día, pero es la especie predominante el quinto día.

La Figura 2 muestra la evolución de las especies en el mosto inoculado A. *S. cerevisiae* predomina desde el primer día de fermentación y es la única especie aislada a partir del cuarto día. *C. stellata* se mantiene en frecuencias bajas hasta el tercer día, mientras que las levaduras apiculadas sólo se aíslan los dos primeros días. A pesar de no haber sido aislado el día 0, *K. thermotolerans* aparece el primer día y se mantiene en frecuencias de aislamiento bajas hasta desaparecer el cuarto día.

La Figura 3 muestra la evolución de las especies en el mosto inoculado B. En esta fermentación el predominio de *S. cerevisiae* no es tan rápido como en el mosto A. Sin embargo, y a diferencia del mosto C, los aislamientos de esta especie son progresivamente mayores desde el primer día. La evolución del resto de las especies es similar a la observada en el mosto A.

TABLA 2
ANÁLISIS QUÍMICOS DEL MOSTO Y DE LOS VINOS

	Mosto	Vinos		
		C	B	A
Densidad relativa a 20° C	1,084	0,997	0,997	0,996
pH	3,15	3,25	3,25	3,21
Acidez total	g/L *	7,9	7,7	7,3
Acidez volátil	g/L **	—	0,49	0,26
Azúcares reductores	g/L	193,0	0,9	2,0
Nitrógeno total	mg/L	365	—	—
FAN	mg/L	184	—	—
Prolina	mg/L	920	—	—
SO ₂ libre	mg/L	—	3,2	4,0
SO ₂ combinado	mg/L	—	28,8	28,0
Etanol	% (v/v)	—	10,0	10,5
Acetaldehído	mg/L	—	16	11
Metanol	mg/L	—	43	44
Acetato de etilo	mg/L	—	29	13
1-propanol	mg/L	—	23	11
2-metil-1-propanol	mg/L	—	78	47
1-butanol	mg/L	—	3	1
Alcoholes amflicos	mg/L	—	159	91

*: En ácido tartárico. **: En ácido acético. FAN: Nitrógeno alfa-aminado libre.

Comparando la evolución de las especies de levadura en las tres fermentaciones estudiadas cabe señalar que si bien el protagonismo de algunas especies está condicionado por la adición del cultivo iniciador, otras no parecen estar afectadas por este hecho. Así, podemos observar que la inoculación afecta al número de aislamientos de *C. stellata*, pero no a los de las especies apiculadas. Por otra parte, en la fermentación de los mostos inoculados A y B se detecta la presencia de *K. thermotolerans*, cosa que no ocurre en el mosto C.

Algunas especies tienen una escasa persistencia en los tres mostos. *C. diversa*, *C. steatolytica* e *I. terricola* no se aíslan el primer día de la fermentación y *C. pulcherrima* sólo se aísla durante los dos primeros días en el mosto B.

La Tabla 2 muestra los análisis químicos del mosto y de los tres vinos. Se observa un mayor rendimiento alcohólico en los vinos A y B, así como una acidez volátil inferior con respecto al vino C. Del resto de los análisis efectuados cabe destacar la diferencia existente en la concentración de alcoholes amflicos y 2-metil-1-propanol entre los vinos A y B. Las dos cepas de levadura utilizadas ya habían mostrado diferencias en este sentido en la caracterización de las cepas realizada mediante fermentaciones a pequeña escala que se llevaron a cabo en el laboratorio (Mora, J., 1989. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears).

El análisis sensorial se llevó a cabo cinco meses después de terminada la fermentación. La fermentación maloláctica había sido completada espontáneamente en los tres vinos, pero el vino B adquirió accidentalmente olor a moho durante su conservación. Por este motivo el análisis sensorial se llevó a cabo únicamente con los vinos A y B.

De los 21 jueces que tomaron parte en el análisis sensorial, 12 identificaron correctamente el vino distinto cuando se les presentaron los vino A y C en una prueba triangular. De los 12 jueces que realizaron la identificación correcta, ocho prefirieron el vino A. De acuerdo con estos resultados se

puede concluir que existen diferencias significativas (95% de probabilidad) entre las muestras presentadas; sin embargo, la preferencia por una u otra no es estadísticamente significativa (4, 14).

Con los mismos jueces se llevó a cabo una prueba de tipo «A o no A» utilizando como vino de referencia el vino C. Sólo uno de los 21 jueces reconoció al vino A como del mismo tipo que el C, mientras que 18 jueces reconocieron como similar al de referencia a otro vino obtenido a partir de la misma variedad de uva por fermentación espontánea en otra bodega de la misma zona.

En las experiencias que se han llevado a cabo se ha puesto en evidencia la influencia de la adición de cultivos iniciadores sobre la fermentación del mosto de la variedad Callet, autóctona de la isla de Mallorca. En el aspecto microbiológico, los aislamientos de *C. stellata* son más numerosos durante los primeros días de la fermentación del mosto no inoculado, mientras que el resto de las especies no son tan afectadas por la adición del cultivo iniciador. El predominio de *S. cerevisiae* es más rápido en los mostos inoculados. Este hecho conlleva la disminución de especies de levaduras silvestres, que, como es sabido, son en algunos casos fuertemente productoras de acidez volátil. Por ello, se puede observar en los vinos inoculados un mayor rendimiento alcohólico y una acidez volátil más baja. Se pone de manifiesto que la adición de cultivos iniciadores produce vinos sensorialmente distintos y que, en conjunto, esta técnica puede contribuir favorablemente a la mejora de la calidad del vino obtenido con esta variedad de uva.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su más sincero agradecimiento a la doctora M. D. Cabezudo por su asistencia en los análisis sensoriales.

Bibliografía

1. Amerine, M. A. and Ough, C. S. (1980). Methods for analysis of musts and wines. John Wiley and Sons, New York.
2. Amerine, M. A. and Kunkee, R. E. (1968). Microbiology of winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 323-358.
3. Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (1983). Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
4. Cabezudo, M. D. (1982). El análisis sensorial de los vinos. In: C. Llaguno (ed.). *Enología, temas actuales*. Anque, Madrid.
5. Colomo, B., Suárez, J. A., González, A. and Iñigo B. (1987). Fermentaciones controladas del mosto de uva. Comportamiento de distintas especies de levaduras vínicas en diferentes modalidades fermentativas sobre mosto de uva natural. *Agricultura* **58**, 900-904.
6. Daudt, C. E. (1983). Culturas puras na fabricação de vinhos. *Rev. Centro de Ciências Rurais (Brazil)* **13**(1), 47-56.
7. Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environm. Microbiol.* **48**(5), 1034-1038.
8. Heard, G. M. and Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environm. Microbiol.* **50**(3), 727-728.
9. Heard, G. M. and Fleet, G. H. (1986). Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Australia* **38**(1), 22-25.
10. Khayat, N., Arroyo, V., Somavilla, J. F. and Iñigo B. (1982). La España vitivinícola. Estudio microbiológico. *Rev. Alimentaria* **131**, 29-32.
11. Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). The Yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam.
12. Kunkee, R. E. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiol.* **1**, 315-332.
13. Mora, J., Barbas, J. I., Ramis, B. and Mulet, A. (1988). Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**(4), 344-346.
14. Usseglio-Tomasset, L. (1988). Methodes objectives d'évaluation des caractères organoleptiques des vins. *Bull. O. I. V.* **61**, 391-415.

Sensitivity to phages of *Streptomyces coelicolor* strains harbouring type II restriction endonucleases

Jesús F. Aparicio, C. Barbés, C. Hardisson and J. Sánchez*

Department of Funcional Biology. Microbiology Area. University of Oviedo. 33006 Oviedo (Spain)

(Received February 28/April 20, 1990)

Summary

The role of type II restriction endonucleases in phage development in two different strains of *Streptomyces coelicolor* has been analyzed. Two of ten phages tested (Φ A4 and R4_{c1}) presented a low efficiency of plating (e.o.p.) in the studied strains. The isolation of host-range mutants of Φ A4 and R4_{c1}, with improved e.o.p. and higher adsorption capability in these two bacterial strains, suggests that the presence of host endonucleases is not the main barrier for these phages, but rather adsorption inability.

Key words: phages, deoxyribonucleases, streptomyces coelicolor.

Resumen

Se ha estudiado el efecto que dos endonucleasas de restricción del tipo II de dos cepas diferentes de *Streptomyces coelicolor* ejercen sobre el desarrollo de diversos fagos. Dos de los 10 fagos ensayados (Φ A4 y R4_{c1}) presentaron una baja eficiencia de plaqueo (e.f.p.) en las cepas estudiadas. El aislamiento de mutantes de Φ A4 y R4_{c1} con e. f. p. más altas y mayor adsorción de ambas cepas sugiere que la principal barrera para su desarrollo es su incapacidad de adsorción y no la presencia de la endonucleasa del huésped.

The genus *Streptomyces* has proved to be a good source of type II restriction enzymes; more than 33 deoxyriboendonucleolytic activities have been detected to date (15). For most of these *Streptomyces* enzymes there is no genetic evidence for the presence of an associated, functional R-M system, although there are clear examples of biological implications of such enzymes in phage restriction (5, 7, 13, 17). Recent reports show that other *Streptomyces* DNase activities, besides traditional type II deoxyriboendonucleases, can be involved, under some circumstances with «in vivo» phage restriction (1, 10, 11). Moreover adsorption capability of phages at different phases of the growth curve has been described as one of the main factors which determined development and/or phage plaque size in those strains (1, 11).

(*) Corresponding author.

Abbreviations: ETHZ: Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC: American Type Culture Collection.

In this work we show a general absence of «in vitro» phage restriction in *S. coelicolor* CECT 3079 and in *S. coelicolor* A3170, both of which also harbour an identical type II deoxyribonuclease activity. Adsorption incapability seems to be the main barrier for the few phages which are not able to grow in any of the cited strains.

Growth on surface and sporulation of *S. coelicolor* ETHZ A3170 and *S. coelicolor* CECT 3079 (Müller, Kutzner 1122) were achieved on GAE medium at 30° C (12). Characteristics of phages P10, P17, P27, R4_{c1} and ØC31_{c1}, source and hosts have been previously described (16). ØA2, ØA4, ØA6, ØA7 and ØA8 were isolated from soil on *S. antibioticus* ATCC 11891 (original host) by L. A. Díaz and M. R. Rodicio (unpublished observations). Phages were grown on bacteria cultured on nutrient agar supplemented with 0.5% glucose (NAG medium) (1). To grow strains in liquid culture this medium-without agar-was used. Efficiency of plating (e.o.p.) was obtained as described previously (16). Separate lytic plaques collected with a Pasteur pipette were used as a source of phage suspensions to follow the e.o.p. throughout successive hosts. Adsorption ability of phages to *S. coelicolor* was measured as described in De los Reyes-Gavilán *et al* (10). Phage DNAs were isolated basically as in Chater *et al* (8). Endodeoxyribonuclease activity was determined by analysing supernatants prepared by high-speed centrifugation of sonicated mycelial pellets (1). Enzymatic hydrolysis was carried out on lambda DNA (0.5 µg) as described (1) except that NaCl was increased to 70 mM in the reaction buffer.

The e.o.p. of ten virulent actinophages was tested in *S. coelicolor* A3170 and *S. coelicolor* CECT 3079. High e.o.p. values were obtained for most of the phages, with the exception of R4_{c1} and ØA4 (Table 1). When R4_{c1} and ØA4 were soaked out from plaques on *S. coelicolor* CECT 3079, a remarkable increase in e.o.p. was obtained with both phages on this strain. These results could indicate the presence of a modification-restriction system (2). However, when we carried out successive infectious cycles in *S. coelicolor* and in the original host —*S. albus* J1074 (7) and *S. antibioticus* ATCC 11891, respectively— phages soaked out from single plaques showed no decrease in e.o.p. (Table 1).

S. coelicolor A3170 and *S. coelicolor* CECT 3079 each produced a type II restriction endonuclease not described previously in these strains, which gives an identical pattern of bands on lambda DNA (Fig. 1 A, B). These enzymes required Mg²⁺ (5-10 mM) and about 70mM NaCl for maximum activity. When DNAs from R4_{c1} and ØA4 were assayed with the cell-free extracts of CECT 3079 and A3170, no digestion was observed (Fig. 1). This led us to consider adsorption incapability of the phages at the mycelium as a possible cause for lack of phage growth in these strains. Thus, the adsorption of phages to the above strains was investigated (Table 2). Adsorption of both phages to the mycelium of *S. coelicolor* CECT 3079 obtained on three different developmental stages was very inefficient. On the contrary, R4_{c1} or ØA4 phage suspensions obtained after passage through either *S. coelicolor* CECT 3079 or *S. coelicolor* A3170 showed an efficient adsorption on CECT 3079 (Table 2); this suggested that host-range mutants with improved adsorption capability on *S. coelicolor* CECT 3079 and *S. coelicolor* A3170 were selected, thus explaining the subsequent high e.o.p. values showed in this strain. Analogous results were obtained with ØA4 soaked off from *S. coelicolor* A3170 and tested on this strain.

Restriction endonuclease production has been proposed as a major determinant for broad host-range bacteriophage specificity in *Streptomyces* (9). Despite this, the existence of type II endonucleases in *Streptomyces* with apparently no restriction function against phages has been documented. More than 30 phages tested were able to develop in *S. albus* P, producing *Sal*PI endonuclease, an isoschizomer of *Pst*I (3), although only one phage (an R4 derivative) was restricted by *Sal*PI (6). It seems that phages could evolve a resistance mechanism by deleting or changing their restriction target sites from DNA (4). This can be supported by the fact that there seems to be a general bias towards no restriction sites or multiple restriction sites in actinophage DNAs, but not intermediate resistance (4, 9. L. A. Díaz, unpublished results). The relative high incidence of a given restric-

TABLE 1
PLATING EFFICIENCY OF PHAGES ON THE *S. COELICOLOR* STRAINS

Phages ^(a)	Strains	
	A3170	CECT 3079
P10	0.42	0.27
P17	3.10	1.34
P27	1 ^(b)	3.10
ØC31 _{c1}	0.17	0.19
R4 _{c1}	0.65	3.9*10 ⁻⁶
R4 _{c1} CECT 3079 ^(c)	0.64	1.21 ^(c)
R4 _{c1} CECT 3079.J1074 ^(d)	0.65	1.48 ^(c)
ØA2	0.90	0.90
ØA4	6*10 ⁻⁴	5*10 ⁻⁴
ØA4.A3170 ^(c)	0.40	0.50
ØA4.A3170.ATCC 11891 ^(d)	0.66	0.75
ØA4.CECT 3079	0.57	0.30 ^(c)
ØA4.CECT 3079.ATCC 11891	0.81	0.66 ^(c)
ØA6 ^(f)	6.50	6.90
ØA7 ^(f)	7.20	5.50
ØA8	0.68	0.33

(a) Phages were tested as high titre suspensions (16) obtained from original host in which e.o.p. is 1.

(b) *S. coelicolor* A3170 is the original host for this phage.

(c) Last host. *S. coelicolor* CECT 3079, or *S. coelicolor* A3170.

(d) Two successive infectious cycles, indicated by a dot; in this case the last host was *S. albus* GJ1074 [a restriction minus mutant, (7)], or *S. antibioticus* ATCC 11891.

(e) Values were similar for phage suspensions obtained from three separately isolated single plaques.

(f) Adsorption to the original host is not very efficient (L. A. Díaz, unpublished results).



Fig. 1. Hydrolytic activity of *S. coelicolor* CECT 3079 (A, C, E) and A3170 (B, D, F) endonucleases on lambda DNA (A, B), R4_{c1} DNA (C, D) and ØA4 DNA (E, F).

TABLE 2
 ADSORPTION OF PHAGES TO *S. COELICOLOR* CECT 3079^(a)

Phages ^(b)	Free phage decrease ^(c)
R4 _{c1}	6.50
R4 _{c1} . CECT 3079 ^(d)	70
ØA4	7.80
ØA4. CECT 3079	68

^(a) The values are expressed as free phage percentage of decrease with respect to the control—original host—considered 100% after 120 min. of incubation. The adsorption efficiency was measured using mycelium grown to early stationary phase (10), in which endonucleases of both strains are produced.

^(b) Suspension of phages were obtained from the original hosts (16) (*S. albus* GJ1074 for R4_{c1}; see Table 1).

^(c) Adsorption efficiency was measured using late exponentially grown mycelium. Results for middle exponential—and early stage stationary—grown mycelium were similar.

^(d) Last host, *S. coelicolor* CECT 3079; suspensions were obtained from single plaques and multiplied in the same host before testing the adsorption.

tion enzyme on the several species of *Streptomyces* could explain the high proportion of phage resistance, through a selective pressure against those particular recognition sites. This is clearly visible when the phage resistance to *Spa* I (and the other *Xho* I isoschizomers), which is the enzyme most frequently found in *Streptomyces* (15), is analyzed. A significantly high proportion of actinophages are resistant to this enzyme (4; L. A. Díaz, unpublished results). The same reasoning is more difficult to apply to *Sal*PI due to the fact that it has only been described to date in two species [*S. albus* P and *S. karnatakensis* (15)].

The appearance of host-range mutants for R4 (from which R4_{c1} is a derivative) was previously described in *S. coelicolor* (Müller) (6). Similar to the case reported in this work, R4 phages increased their e.o.p. after passage through this strain, and kept the later constant after propagation in *S. albus* J1074. Changes in adsorption efficiency were suggested as the result of this mutation; no restriction endonuclease was detected otherwise in the *S. coelicolor* strain used. Thus, R4 seems to possess a ready host-adaptative behaviour by changing its adsorption determinant phenotypes. An interesting phenomenon has also been previously reported in *E. coli* phage T7, in which successive changes in phage adsorption determinants give rise to a «phenotypic» host-controlled modification-restriction mechanism without the mediation of any enzymatic process (14). This behaviour has been suggested to be the result of a host-induced post-synthetic modification of specific phage coat proteins involved in the specificity of adsorption. This could also be the case of R4_{c1} and ØA4 in *S. coelicolor*. Unfortunately, very scarce data exist in *Streptomyces* about the location of phage receptors, their biochemical nature and their correlation with the morphological and biochemical characteristics of the phages (4), so that a reliable interpretation of the observed phenomenon must await further research on this subject.

Acknowledgments

J. F. Aparicio was supported by a fellowship of «Iniciación a la investigación en España», Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, Spain. The research was supported by grant

BI089-0014 from the Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Spain.

References

1. Aparicio, J. F., De los Reyes-Gavilán, C. G., Barbés, C., Hardisson, C. and Sánchez, J. (1988). A non-specific deoxyribonuclease with restriction function in *Streptomyces glaucescens*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2345-2351.
2. Arber, W. and Dussoix, D. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **5**, 18.
3. Chater, K. F. (1977). A site-specific endodeoxyribonuclease from *Streptomyces albus* CMI 52766 sharing site-specificity with *Providencia stuartii* endonuclease *Pst* I. *Nucl. Ac. Res.* **4**, 1989-1998.
4. Chater, K. F. (1986). *Streptomyces* phages and their application to *Streptomyces* genetics. In: S. W. Queener and L. E. Day (eds.). *The Bacteria*, vol. IX, pp. 119-158. Academic Press, New York.
5. Chater, K. F. and Carter, A. T. (1978). Restriction of a bacteriophage in *Streptomyces albus* P (CMI 52766) by endonuclease *Sal* PI. *J. Gen. Microbiol.* **109**, 181-185.
6. Chater, K. F. and Carter, A. T. (1979). A new, wide host-range, temperate bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its interaction with some restriction-modification systems. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 431-442.
7. Chater, K. F. and Wilde, L. C. (1976). Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease *Sal* I. *J. Bacteriol.* **128**, 664-650.
8. Chater, K. F., Hopwood, D. A., Kieser, T. and Thompson, C. J. (1982). Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **96**, 69-95.
9. Cox, K. L. and Baltz, R. H. (1984). Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **159**, 499-504.
10. De los Reyes-Gavilán, C. G., Aparicio, J. F., Barbés, C., Hardisson, C. and Sánchez, J. (1988a). An exocyttoplasmic endonuclease with restriction function in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **170**, 1339-1345.
11. De los Reyes-Gavilán, C. G., Aparicio, J. F., Barbés, C., Hardisson, C. and Sánchez, J. (1988b). Adsorption capability determines phage plaque size on *Streptomyces antibioticus* producing endodeoxyribonuclease. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 301-306.
12. Hardisson, C., Manzanal, M. B., Salas, J. A. and Suárez, J. E. (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 203-214.
13. Klaus, S., Hartmann, M., Krugel, H., Roth, M., Walter, F., Rautenshtein, Y. I. and Solovèva, N. Y. (1981). Restriction of *Streptomyces* phage SH5 by endonuclease *Shy* I from *Streptomyces hygroscopicus* 0477. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 286-288.
14. Krüger, D. H., Hansen, S., Schroeder, C. and Presber, W. (1977). Host dependent modification of bacteriophage T7 and SAMase-Negative T3 derivatives affecting their adsorption ability. *Mol. Gen. Genet.* **153**, 107-110.
15. Roberts, J. (1987). Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucl. Ac. Res.* **15**, 189-217.
16. Sánchez, J., Barbés, C., Hernández, A., De los Reyes-Gavilán, C. G. and Hardisson, C. (1985). Restriction-modification systems in *Streptomyces antibioticus*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 942-946.
17. Voyeykova, T. A., Ovekhov, A. V. and Rebentish, B. A. (1980). New approaches to the study of restriction and modification systems in Actinomycetes. *Actinomycetes* **15**, 152-166.

Relación entre la producción de deoxinivalenol y zearalenona y el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum* en sustratos naturales sólidos

Gladys A. Lori¹, Cynthia P. Henning², Andrea Violante³, Héctor E. Alippi¹ y Edith Varsavsky³

¹ Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía (CIC Prov. Buenos Aires). Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118. 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

² Cátedra de Química Agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118. 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³ Departamento de Biología. Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología. Ministerio de Salud y Acción Social. Caseros, 2161, Buenos Aires, Argentina.

(Recibido abril 24/septiembre 7, 1990).

Summary

A toxicogenic strain of *Fusarium graminearum* which produces DON and ZEA was cultivated on natural solid substrates (wheat, polished rice and hulled rice) under different environmental conditions. The production of both toxins and mycelium growth (in terms of glucosamine) were evaluated to establish the relation between the production of DON and ZEA and the different mycelium growth on the substrates mentioned above.

Polished rice was the substrate on which most production of both toxins was obtained. Comparing the three substrates studied, the highest quantities of DON were obtained at a temperature of 27° C during incubation period, being indifferent to the presence of light except in the case of hulled rice. Whereas for ZEA the best conditions in wheat and polished rice were medium temperatures (17°-21° C respectively) and darkness. While in hulled rice the ideal conditions for the production of both toxins were temperature of 27° C and the presence of light. Concerning the mycelium growth, this was very scarce when cultivated in hulled rice, increasing in polished rice and being largest in wheat. The increase or reduction of the mycelium growth in the different substrates was not proportional to the increase or decrease of the production of both toxins. Therefore, production of DON and ZEA could be subjected to the nature of the substrate and environmental conditions, more than the rate of development of *Fusarium graminearum* in cereal grains.

Key words: *Fusarium graminearum*, growth, deoxynivalenol, zearalenone, natural solid substrates.

Resumen

Una cepa de *Fusarium graminearum*, productora de deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), se cultivó en sustratos naturales sólidos (trigo, arroz pulido y arroz con cáscara) bajo distintas condiciones ambientales. En los cultivos obtenidos se evaluó la producción de ambas toxinas y el

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

crecimiento micelial (en términos de glucosamina liberada tras hidrólisis de la quitina), a los efectos de establecer la relación existente entre la producción de DON y ZEA y el crecimiento del hongo en los granos. El arroz pulido fue el sustrato que condicionó la mayor producción de ambas toxinas. En los tres granos las cantidades más elevadas de DON se obtuvieron con 27° C. La presencia de la luz resultó indiferente, excepto cuando se cultivó en arroz con cáscara. En cuanto a ZEA en arroz pulido y trigo las condiciones óptimas fueron temperaturas medias (17°-21° C, respectivamente) y oscuridad, mientras que en arroz con cáscara las condiciones ideales para la producción de ambas toxinas fueron 27° C y presencia de luz. El crecimiento micelial resultó muy escaso cuando se cultivó en arroz con cáscara, aumentando en arroz pulido y siendo el máximo en trigo. El incremento de la masa micelial no corrió paralelo con el aumento o el descenso de la síntesis de ambas toxinas. Por tanto, la producción de DON y ZEA podría estar supeditada a la calidad del sustrato y los factores ambientales más que al grado de invasión de los granos por *F. graminearum*.

Introducción

Fusarium graminearum Schw., anamorfo de *Gibberella zeae* (Schw.) Petch es un hongo fitopatógeno que comúnmente ataca al trigo, maíz, cebada y otros cereales en la Argentina y en otras partes del mundo (4, 9, 18). Cuando *F. graminearum* infecta naturalmente los granos puede producir micotoxinas tales como zearalenona (ZEA) y deoxinivalenol (DON). La primera es responsable de un síndrome estrogénico en cerdos y vacunos (11, 17), mientras que el DON, conocido también como vomitoxina, es un tricoteceno citotóxico que produce emesis y rechazo del alimento en animales como cerdos y pollos (2, 12). Ambas toxinas se forman en los granos infectados antes de ser cosechados. ZEA se encuentra generalmente en maíz, en menor cantidad en trigo y también se ha detectado en alimentos para cerdos (12). DON es uno de los tricotecenos más comúnmente hallados en trigo, maíz y alimentos balanceados en USA, Canadá, Sudáfrica y Japón (10, 12, 18, 23). Esta toxina se ha convertido en una preocupación para las autoridades sanitarias de esos países, pues en los análisis que se han realizado en productos a base de harina de trigo se ha detectado DON en un nivel alto de contaminación, comprobándose que no se eliminó ni se destruyó totalmente durante el proceso de molienda ni tampoco durante la panificación (1, 8, 15).

En estudios realizados en la Argentina sobre la incidencia de aflatoxinas, zearalenona y tricotecenos en trigo, maíz y en sus productos elaborados durante dos cosechas (Rizzo, com. pers.), se ha encontrado DON en un 80% de las muestras a base de harina de trigo y ZEA con una escasa frecuencia. Aunque el nivel de contaminación de los productos estudiados estuvieron por debajo de los límites internacionales, fue notable la alta incidencia de DON y la escasa incidencia de ZEA en trigo. A pesar de eso se detectaron estas dos toxinas simultáneamente en muestras de galletitas a base de harina de trigo.

Debido a la importancia de estas toxinas, se han hecho experiencias con aislamientos de *F. graminearum* de distintos países para estudiar el efecto de varios factores, tales como sustratos, pH, tamaño del frasco, concentración de oxígeno y dióxido de carbono, temperaturas, tiempo de incubación y porcentaje de humedad sobre la producción de DON y ZEA (6, 7, 16, 22). Las investigaciones que se han realizado para relacionar el crecimiento del hongo con la síntesis de toxinas son escasas. El-Bahrawy *et al.* (5) compararon varias cepas y valoraron la producción de DON, la utilización de carbohidratos, el pH y el crecimiento fúngico en un medio de cultivo líquido. En sustratos naturales sólidos la relación entre el crecimiento micelial y la elaboración de toxinas no ha sido analizada; por tanto, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la relación existente entre la producción de DON y ZEA y el crecimiento micelial de *F. graminearum* cultivado en distintos sustratos naturales sólidos bajo diferentes condiciones ambientales.

Materiales y métodos

Se utilizó una cepa de *F. graminearum* (GZA), productora en forma simultánea de DON y ZEA aislada de semillas de trigo procedentes de la localidad de Barrow (provincia de Buenos Aires). Se la mantuvo como cultivo monospórico en agar de patata glucosado (APG) a temperatura ambiente.

Sustratos

Se utilizaron trigo (T), arroz pulido (AP) y arroz con sus glumelas, es decir, con cáscara (AC). Se colocaron 100 g de cada sustrato en frascos Erlenmeyer de 500 ml. Para humedecer los granos se mantuvieron inmersos en agua corriente durante 30 minutos. Después de eliminar el exceso de agua los frascos se esterilizaron en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

Inoculación y condiciones de cultivo

La cepa de *F. graminearum*, GZA, proveniente de cultivos monospóricos, sembrada en cajas de petri con APG, fue incubada a 20° C durante 4 días bajo un régimen de 12 horas de luz cercana al ultravioleta (NUV) y 12 horas de oscuridad. Del borde de esas colonias se extrajeron discos de 8 mm de diámetro mediante un sacabocados y se sembraron asépticamente en los frascos con los diferentes sustratos. Se incubaron durante 21 días de manera estática en distintas cámaras de cultivo, a 11, 17, 21 y 27° C ($\pm 2^\circ$ C). El régimen lumínico consistió en 16 horas de luz suministrada por tubos fluorescentes, (180 lúmenes $m^{-2}.s^{-1}$ entre 400 y 700 nm) y 8 horas de oscuridad. Otros grupos de frascos con los mismos sustratos se incubaron en las mismas cámaras y temperaturas, pero en oscuridad total. La combinación de los 3 sustratos, las 4 temperaturas y los 2 regímenes lumínicos originaron 24 tratamientos que se realizaron por duplicado.

Finalizado el período de incubación los cultivos se secaron en estufa con circulación de aire a 60° C y se pulverizaron con molinillo de granos para determinar en cada uno la presencia de DON y ZEA y el crecimiento micelial.

Extracción de DON y ZEA

Se utilizó el método de Bottalico *et al.* (3) ligeramente modificado. Se pesaron 4 g de cada muestra y se introdujeron en Erlenmeyer de 250 ml junto con 18 ml de una solución metanol-agua (40 : 60), 0,5 g de cloruro de sodio y 9 ml de n-hexano. Los frascos se agitaron en agitador de vaivén durante 30 minutos y los extractos se filtraron a través de papel de filtro. Se tomaron 5 ml de la capa inferior del filtrado (metanol-agua) y se concentraron a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo seco se resuspendió 2 veces en 3 ml de acetato de etilo. Las dos fracciones obtenidas con el acetato de etilo se mezclaron y se evaporaron. El residuo se resuspendió en 200 μ l de cloroformo.

Determinación semicuantitativa de las toxinas por cromatografía en capa fina (CCF)

En placas de Silicagel 60 (Merck n.º 5553) se depositaron 10 μ l de los extractos de las 24 muestras y 3 μ l de cada uno de los estándares (DON en una solución metanólica de 100 μ g/ml y ZEA 50 μ g/ml de benceno).

Las placas se desarrollaron en una solución benceno-acetona (3 : 2). Para visualizar DON las placas se sumergieron en una solución de cloruro de aluminio (15 g de $Cl_3Al \cdot 6H_2O$ más 15 ml de agua destilada y 85 ml de etanol absoluto); luego se calentaron a 110° C durante 10 minutos. Las manchas se observaron bajo luz UV de 365 nm (fluorescencia azul-verdosa). Para visualizar ZEA

se observó directamente bajo UV de 254 nm (fluorescencia verde) y se confirmó rociando las placas con bencidina, obteniéndose una coloración púrpura oscura.

Las cantidades relativas de las toxinas presentes en los extractos fueron estimadas por comparación visual con los estándares utilizados.

Cuantificación del crecimiento micelial de F. graminearum (GZ4) en sustratos sólidos naturales (expresado como µg de glucosamina/mg de micelio seco)

Se utilizó el método aplicado por Priyadarshini y Tulpule (13). Se basó en la estimación química de la quitina, principal constituyente de la pared celular fúngica, transformándola en unidades glucosamina que se cuantifican colorimétricamente (14).

Para la aplicación de este método previamente se determinó el factor de conversión (µg de glucosamina/mg de micelio seco del hongo desarrollado «in vitro»). El hongo se sembró en Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml de Czapek enriquecido con 1% de peptona. Se incubó en forma estática a 24° C y oscuridad durante 21 días. Finalizado el período de incubación, el cultivo se filtró y la masa de micelio se lavó con agua destilada. El peso de la masa micelial se determinó transfiriendo alícuotas de 0,3, 0,6 y 0,9 ml de la suspensión de micelio a cápsulas de porcelana previamente taradas que se secaron en estufa a 104° C hasta peso constante. Las mismas cantidades de la suspensión de micelio se procesaron y se determinó la cantidad de glucosamina como lo describió Ride y Drysdale (14), con las modificaciones sugeridas por Priyadarshini y Tulpule (13). El valor obtenido constituye el factor de conversión para la cepa GZ4 de *F. graminearum*.

Para determinar el crecimiento micelial de las muestras constituidas por los sustratos sólidos, una vez secadas y pulverizadas, se tomaron entre 20 y 50 mg de cada una por duplicado, se procesaron y se estimó la cantidad de glucosamina (14).

Resultados y discusión

La cepa de *F. graminearum*, GZ4, creció en los tres sustratos ensayados sin desarrollo conidial, produjo DON y ZEA durante los 21 días de incubación en cantidades variables de acuerdo con el sustrato y las condiciones de cultivo evaluadas (Tabla 1).

El AP fue el que condicionó la mayor producción de ambas toxinas. Este sustrato, que es considerado uno de los mejores medios de cultivo, además de contar con una elevada proporción de hidratos de carbono que pueden ser metabolizados por el hongo en forma inmediata, posee mejor calidad proteica que la mayoría de los cereales, y esta calidad está en función de la composición de las proteínas del arroz. Ueno *et al.* (20), estudiando la producción de fusarenona-x, hallaron que sobre nueve aminoácidos incorporados a los medios de cultivo, la metionina y el triptofano fueron los que favorecieron la mayor producción de esta toxina.

En los tres sustratos las cantidades mayores de DON se obtuvieron a 27° C y el aumento de la temperatura favoreció su biosíntesis. El comportamiento de la cepa GZ4 fue similar a otros aislamientos empleados por distintos investigadores (7, 21, 22), aunque las cantidades de DON y ZEA elaboradas por la cepa utilizada en este ensayo fueron considerablemente inferiores.

La producción de ZEA fue diferente en los tres sustratos. En T y AP fue superior con temperaturas medias de incubación, 21° y 17° C, respectivamente, coincidiendo con los resultados de Eugenio *et al.* (6). También Greenhalgh *et al.* (7) observaron que cuando *F. graminearum* se incubó a 19,5° C y utilizando como sustrato arroz, el producto principal elaborado por el hongo fue la ZEA.

Los resultados de la presente experiencia permiten inferir que la biosíntesis de ZEA es menos exigente que la de DON en cuanto a requerimientos térmicos, al menos en aquellos sustratos donde los hidratos de carbono están disponibles en forma inmediata. Mientras que en AC la mejor res-

TABLA 1
 PRODUCCION DE DON Y ZEA POR *FUSARIUM GRAMINEARUM* GZ4 EN DISTINTOS
 SUSTRATOS, TEMPERATURAS Y REGIMENES LUMINICOS A LOS 21 DIAS DE INCUBACION

Condiciones de cultivo		Sustratos					
		Trigo		Arroz pulido		Arroz con cáscara	
Temp. (°C)	Rég. lum.	DON	ZEA	DON	ZEA	DON	ZEA
11	LUZ	Trazas	ND	ND	Trazas	ND	ND
	OSC.	ND	ND	ND	2+	ND	ND
17	LUZ	Trazas	ND	3+	5+	1+	1+
	OSC.	1+	1+	4+	6+	ND	2+
21	LUZ	1+	2+	ND	1+	1+	3+
	OSC.	2+	3+	ND	3+	ND	1+
27	LUZ	2+	Trazas	5+	2+	4+	5+
	OSC.	3+	ND	5+	2+	1+	2+

DON: Deoxinivalenol. ZEA: Zearalenona. DON +: 1,8 µg/g de muestra seca. ZEA +: 0,72 µg/g de muestra seca. ND: No detectado.

puesta se obtuvo a 27° C, (Tabla 1), como lo demostraron Schoroeder y Hein (16), quienes obtuvieron cantidades considerables de ZEA a 25° C en forma constante.

Al evaluar la acción de la luz se notó que su presencia ejerció un efecto inhibitorio sobre la producción de estas toxinas en el AP y en el T. Fue evidente que la oscuridad total resultó un factor favorable, excepto en el AP a 27° C, donde fue indiferente para la producción de DON y ZEA. Con el sustrato AC la luz ejerció una influencia positiva sobre la producción de ambas toxinas.

El contenido de glucosamina en el micelio de *F. graminearum* (GZ4) (= Factor de conversión) en cultivo líquido resultó 120 µg/mg de micelio seco. El crecimiento micelial en los sustratos sólidos incubado bajo distintas condiciones ambientales se halla en la Tabla 2.

El método químico y colorimétrico aplicado para cuantificar el crecimiento micelial resultó muy sensible, pudiéndose detectar muy pequeñas cantidades de micelio. Pese a que otros investigadores (13) lo hallaron fácil y rápido, en la presente experiencia se comprobó que el procesado de las muestras es sumamente prolongado, tornándolo poco aplicable para un número elevado de muestras.

No obstante, cuando se emplean sustratos sólidos naturales, donde no es posible separar el micelio que coloniza los granos, este método químico y colorimétrico permite cuantificar el crecimiento fúngico.

Los resultados de las Tablas 1 y 2 indican la presencia de amplias variaciones en valores absolutos entre los distintos sustratos y condiciones de cultivo con respecto no sólo a la producción de DON y ZEA, sino también al crecimiento micelial calculado como valores de glucosamina.

Cuando *F. graminearum* se incubó a 11° C el crecimiento fue muy reducido en todos los sustratos; a partir de los 17° C hasta los 27° C la masa micelial fue aumentando. En T y AP, a 17°, 21° y

TABLE 2
CRECIMIENTO MICELIAL DE *FUSARIUM GRAMINEARUM* GZA, DETERMINADO A PARTIR DEL CONTENIDO DE QUITINA, EN SUSTRATOS SOLIDOS NATURALES Y CON DISTINTAS CONDICIONES DE INCUBACION

Condiciones de cultivo		Crecimiento micelial* (mg micelio seco/g de muestra)		
Temp. (°C)	Rég. lum.	Trigo	Arroz pulido	Arroz con cáscara
11	LUZ	55.00**	35.44	40.83
	OSC.	59.00	48.12	30.00
17	LUZ	165.62	147.27	122.50
	OSC.	172.13	172.08	120.83
21	LUZ	164.83	160.62	75.90
	OSC.	187.55	169.87	90.25
27	LUZ	173.02	152.75	94.39
	OSC.	176.07	152.28	77.95

*: Factor de conversión: 1 mg de micelio seco, igual a 120 µg de glucosamina.

***: Cada valor representa el promedio de dos repeticiones.

27° C, el comportamiento de la cepa en términos generales no mostró valores muy variables, mientras que en AC el crecimiento a 17° C fue apreciablemente mayor que a 21 y 27° C (Tabla 2). En este último sustrato, bajo las condiciones de cultivo, el crecimiento micelial fue escaso y en general también la producción de toxinas, especialmente DON. Este comportamiento se atribuyó a la barrera física que la cáscara del grano opuso al hongo, viéndose impedida la utilización del almidón en forma inmediata. Esta falta de actividad se percibió por la ausencia de pigmentos al finalizar el período de incubación, ya que la presencia de los mismos puede ser correlacionada con el agotamiento de los nutrientes en el sustrato (7).

En T y AP, en cuanto al crecimiento micelial, se hallaron resultados semejantes, aunque levemente superiores sobre el primer sustrato. No se halló una relación directa entre el crecimiento micelial y la producción de DON y ZEA. El AP fue el que favoreció la mayor producción de toxinas, pero no fue el que permitió un crecimiento fúngico mayor. En el mismo sustrato las temperaturas de 17° y 21° C dieron lugar al crecimiento máximo, pero no resultaron las óptimas, por ejemplo, para la producción de DON.

Con respecto al factor luz, su efecto sobre el crecimiento micelial fue similar al observado en la producción de toxinas. En T y AP se hallaron valores levemente superiores bajo las condiciones de oscuridad excepto a 27° C, donde el efecto fue indiferente. Mientras que en AC el comportamiento fue errático y la respuesta variable con las distintas temperaturas de incubación.

A partir de los resultados pudo observarse que la cantidad de toxina producida no fue concordante con el crecimiento fúngico; el incremento o decrecimiento de la masa micelial no corrió paralelo con el aumento o descenso de la producción de ambas toxinas. Por lo tanto, la producción de DON y ZEA podría estar supeditada a la calidad del sustrato y los factores ambientales más que al grado de invasión de *F. graminearum* en el grano.

Agradecimientos

A los ingenieros agrónomos Jorge Ringuelet y Elsa Cerimele por la colaboración recibida durante el desarrollo de este trabajo. Esta investigación fue parcialmente subsidiada por la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires.

Bibliografía

1. Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Pawlosky, R. J. and Pusch, D. J. (1985). Effect of cleaning, milling and baking on deoxynivalenol in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 482-486.
2. Adams, R. and Tuite, J. (1976). Feeding *Gibberella zeae* damaged corn to laying hens. *Poult. Sci.* **55**, 1991-1993.
3. Bottalico, A., Lerario, P. and Visconti, A. (1983). Mycotoxins occurring in *Fusarium* infected maize ears in the field in some European countries. *Proceeding of International Symposium on Mycotoxins*. Caire, Egypt. 375-382.
4. Carranza, J. M. (1961). Podredumbre radical y tizón de los cereales en la República Argentina producido por *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Rev. Fac. Agronomía* **37**, 33-58.
5. El-Bahrawy, A., Hart, L. P. and Pestka, J. J. (1985). Comparison of deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* isolates in corn steep-supplemented Fries medium. *J. Food Prot.* **48**, 705-708.
6. Eugenio, C. P., Christensen, C. M. and Mirocha, C. J. (1970). Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*. *Phytopathology* **60**, 1055-1057.
7. Greenhalg, R., Neish, G. A. and Müller, J. D. (1983). Deoxynivalenol acetyl deoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 625-629.
8. Hart, L. P. and Braselton, Jr. W. E. (1983). Distribution of vomitoxin in dry milled fractions of wheat infected with *Gibberella zeae*. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 657-659.
9. Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y. and Ueno, Y. (1983). Chemotaxonomy of *Gibberella zeae*. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 657-659.
10. Marasas, W. F. O., Kriek, N. P. J., Van Rensburg, S. J., Steyn, M. and Schalkwyk, G. C. (1977). Occurrence of zearalenone and deoxynivalenol, mycotoxins produced by *Fusarium graminearum* Schwabe, in maize in Southern Africa. *S. Afr. J. Sci.* **73**, 346-349.
11. Mirocha, C. J., Harrison, J., Nichols, A. A. and McClintock, M. (1968). Detection of fungal estrogen (F^{-2}) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* **16**, 797-798.
12. Mirocha, C. J., Pathre, S. V., Schauerhamer, B. and Christensen, C. M. (1976). Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 553-556.
13. Pryadarshini, E. and Tulpule, P. (1978). Relationship between fungal growth and aflatoxin production in varieties of maize and groundnut. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 249-252.
14. Ride, J. and Crysdale, P. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissues. *Physiol. Plant Pathol.* **2**, 7-15.
15. Scott, P. M., Kanhere, R., Lau, Y. P., Dexter, J. E. and Greenhalg, R. (1983). Effects of experimental flour milling and bread baking on retention of deoxynivalenol (vomitoxin) in hard red spring wheat. *Cereal Chem.* **60**, 421-424.
16. Schroeder, H. W. and Hein, H. (1975). A note on zearalenone in grain sorghum. *Cereal Chem.* **52**, 751.
17. Stob, M., Baldwin, R. S., Tuite, J., Andrew, F. N. and Gillette, K. G. (1962). Isolation of an anabolic, uterotrophic compound of corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature* **196**, 1318.
18. Torenholm, H. L., Cochrane, W. P., Cohen, H., Elliot, J. J., Farnworth, E. R., Friend, D. W., Hamilton, R. M. G., Neish, G. A. and Standish, J. F. (1981). Survey of vomitoxin contamination of the 1980 white winter wheat crop in Ontario, Canada. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 992-994.
19. Tuite, J., Shaner, G., Rambo, G., Foster, J. and Caldwell, R. W. (1974). The *Gibberella* ear rot epidemics of corn in Indiana in 1965 and 1972. *Cereal Sci. Today* **19**, 238-241.
20. Ueno, Y., Ishikawa, Y., Amakai, K. and Tsunoda, H. (1970). Environmental factors influencing the production of fusarenon-x, a cytotoxic mycotoxin of *Fusarium nivale* Fn 2B. *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 304-312.
21. Vesonder, R. F., Ellis, J. J. and Rohwedder, W. K. (1981). Elaboration of vomitoxin and zearalenone by *Fusarium* isolates and biological activity of *Fusarium*-produced toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 1132-1134.
22. Vesonder, R. F., Ellis, J. J., Kwolek, W. F. and DeMarini, D. J. (1982). Production of vomitoxin in corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* NRRL 6101. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 967-970.
23. Yoshizawa, T. and Morooka, N. (1977). Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2933-2934.

Aproximación a la dinámica de la contaminación microbiológica del río Segre en Lérida

A. Palau y A. Palomes*

Laboratorio de Microbiología. Departamento de Tecnología de Alimentos (UPC).

Avda. Alcalde Rovira Roure, 177. 25006 Lleida. España.

(Recibido abril 24/septiembre 28, 1990)

Summary

The water rivers contains a basal autochthonous population of micro-organisms which is local and temporal and it is modified by the incoming sewage. In this paper a simple model is applied to estimate the faecal bacterial load poured from the town of Lérida to the Segre River and the downstream assimilation capacity of this river. In spite of the inherent limitations and imprecisions due to sampling operations and calculations, the numerical results are related to other published results. The evolution of faecal bacterial population downstream of Lérida does not follow the theoretical model without a growth coefficient. The showed data on faecal pollution (bacteriological and viral detectors) are the only ones which have been published on the final section, the most disturbed, of the Segre River.

Key words: bacterial, load, assimilation, capacity, rivers.

Resumen

En condiciones naturales los ríos contienen poblaciones de microorganismos adaptadas al medio y persistentes en el tiempo. Las aportaciones externas de aguas residuales aumentan la carga microbiana, pero su persistencia en el medio es local y transitoria. En este artículo, aplicando un modelo sencillo, se lleva a cabo una estimación de la carga bacteriana vertida por la ciudad de Lérida al río Segre y de la capacidad de autodepuración de éste. A pesar de las imprecisiones y limitaciones inherentes al muestreo y a los cálculos, los resultados numéricos obtenidos muestran una cierta coherencia en relación a datos o referencias conocidas. La dinámica de la población bacteriana fecal en el tramo final del río Segre no se ajusta a un modelo sin coeficiente de crecimiento. Los datos presentados se refieren a contaminación fecal bacteriana y vírica (enterovirus) y son los únicos publicados sobre el tramo final del río Segre, que, por otro lado, es el más contaminado.

Introducción

Los análisis microbiológicos sobre aguas fluviales aportan una valiosa información acerca de la actividad de los núcleos de población de ribera y de la capacidad de autodepuración del propio río.

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

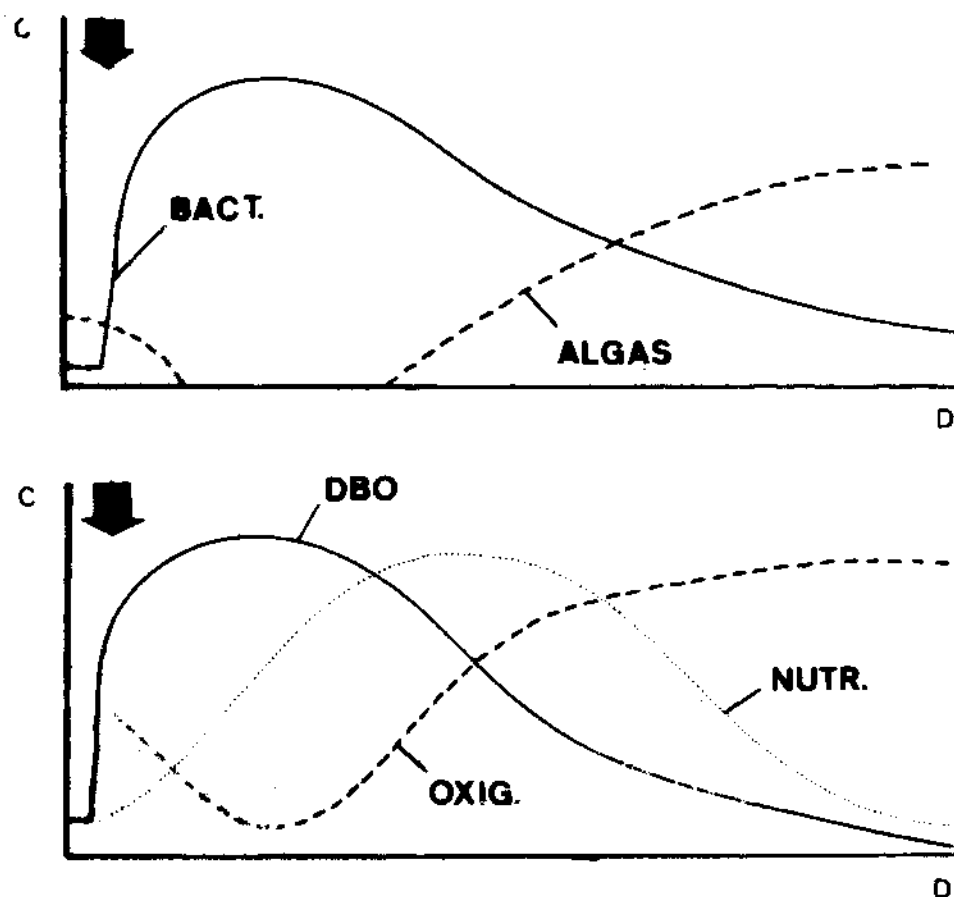


Fig. 1. Dinámica teórica esperable en la evolución de algunos parámetros físico-químicos y poblacionales, aguas abajo de un punto de vertido de aguas residuales de tipo urbano, señalado en los gráficos con una flecha. En abscisas («C») puede leerse concentración o abundancia; en ordenadas («D»), distancia al punto de vertido o tiempo transcurrido desde el vertido.

En condiciones naturales, los ríos contienen importantes poblaciones de microorganismos que, por otro lado, son las únicas capaces de persistir en el tiempo. Las aportaciones externas de aguas residuales aumentan la carga microbiana, pero su persistencia en el medio es local y transitoria, quedando supeditada a varios factores tales como el tipo de flujo del río, el caudal, el régimen térmico, la concentración en oxígeno disuelto y nutrientes, el pH, la mineralización, la presencia de depredadores... (10). Todos estos factores hacen que las poblaciones alóctonas de microorganismos, en función de su propia capacidad específica de resistencia, tiendan a disminuir aguas abajo de un punto de vertido.

Esta dinámica da lugar a las típicas representaciones gráficas (Fig. 1.) (13), que se repiten aguas abajo de cualquier vertido de aguas residuales y que en definitiva no son más que el reflejo de la capacidad de autodepuración de los ríos. Las desviaciones respecto a las curvas teóricas dependen de la magnitud del vertido y de las características del medio receptor.

Con este artículo se pretende exponer una metodología aplicada en la estimación de la carga bacteriana urbana y su dinámica aguas abajo del punto de vertido para el caso del río Segre a su paso por la ciudad de Lérida.

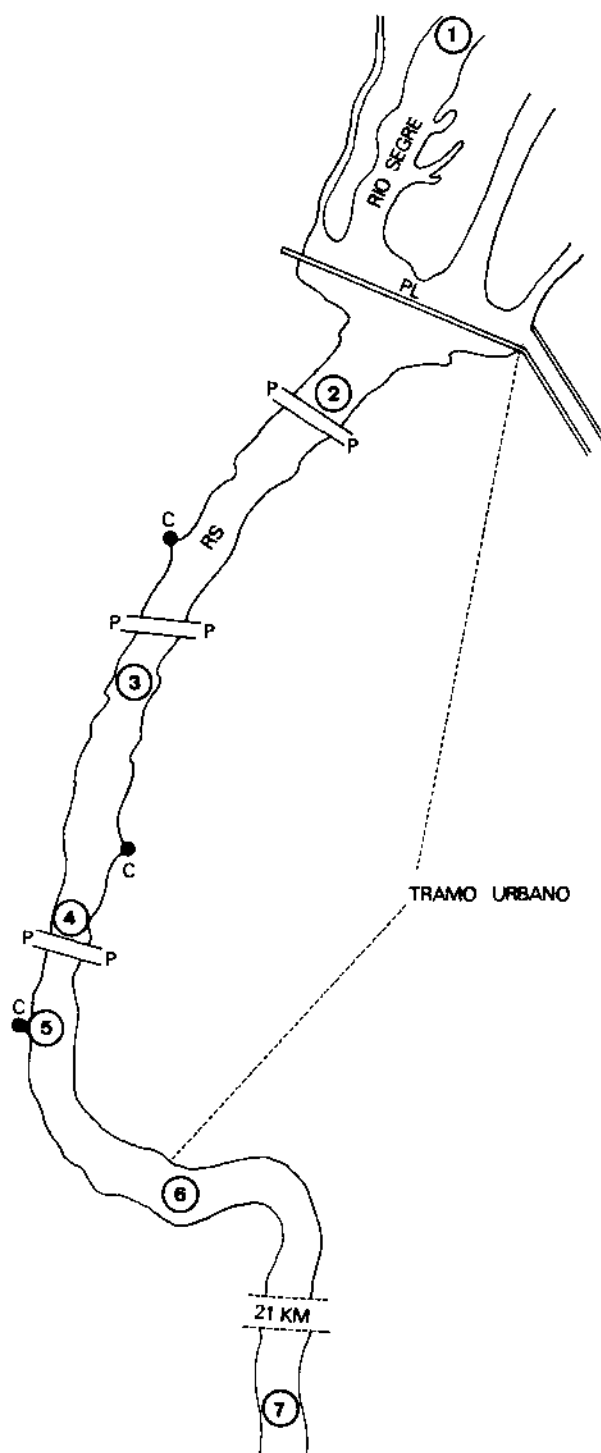


Fig. 2. Situación orientativa de los puntos de muestreo en el tramo urbano del río Segre en Lérida (números 2, 3, 4 y 5), aguas arriba de éste (n.º 1) y aguas abajo (n.º 6 y n.º 7). «PL» = Presa de Lérida; «P» = Puentes; «RS» = Río Segre; «C» = Colectores urbanos definidos existentes en el momento del muestreo. El colector muestreado corresponde al punto n.º 5.

Material y métodos

La Figura 2 muestra la situación orientativa de las estaciones de muestreo en la zona de estudio. El primer punto se situó aguas arriba de cualquier vertido urbano atribuible a la ciudad (número 1); el punto número 2, dentro ya del tramo urbano pero aguas arriba de cualquier colector controlado; los puntos números 3 y 4, en el río a su paso por la ciudad; el punto número 5, en el colector final, y los puntos números 6 y 7, a 1 y 21 km aguas abajo del citado colector final.

El punto de muestreo número 2 estaba bajo los efectos de la presa de Lérida, un pequeño reservorio de agua que contribuye a la decantación de materias en suspensión y por tanto de microorganismos, y que además recibe aguas procedentes de canales laterales, lo que pudo suponer una cierta dilución. En el punto de muestreo número 3, situado aguas abajo de un afluente natural del Segre en el interior de la ciudad, el río Noguerola, que actuaba como recolector de aguas residuales de algunos sectores urbanos, no se observan (Tabla 1) incrementos de la carga bacteriana, posiblemente a causa de que durante el muestreo quedó fuera de la «pluma de dispersión» de las aguas del citado afluente-colector.

Cabe decir que en estos últimos 21 km existen una serie de vertidos concretos incontrolados no cuantificados de pequeños núcleos de población y desagües de acequias de riego.

Para la elaboración de este artículo se ha combinado la estructura y metodología establecida en su día para un estudio físico-químico y biológico amplio realizado sobre todo el río Segre, desde su origen (Francia) hasta su desembocadura (8), con unos datos no publicados obtenidos por los mismos autores correspondientes a una campaña realizada en abril de 1984 sobre los puntos de muestreo anteriormente reseñados.

Un aspecto a remarcar acerca del ámbito espacial escogido para este estudio es que las aguas residuales que la ciudad vierte son mayoritariamente de origen orgánico, de manera que no cabe la posibilidad de que el río vea limitada o interrumpida su capacidad de autodepuración por la presencia de aguas residuales industriales (metales pesados, compuestos tóxicos recalcitrantes...). Además, los vertidos son directos, sin tratamiento alguno, y ocurren en un tramo relativamente corto (menos de 2 km).

Si bien no se aborda la dinámica temporal de las poblaciones microbianas en el río, los valores de concentración obtenidos se ajustan a los intervalos de confianza reseñados en el citado estudio más amplio de todo el río Segre (8) para cada una de las determinaciones microbiológicas realizadas. Los resultados quedan dentro de la variabilidad anual y no son atribuibles a ninguna situación particular y/o extraordinaria.

Para la evaluación anual de los coeficientes de autodepuración del tramo estudiado, entre las estaciones de muestreo números 6 y 7 se han utilizado los datos publicados existentes (8) en forma

TABLA 1
RESULTADOS DE LOS ANALISIS REALIZADOS Y DE LOS INDICES CALCULADOS

Pto. muestreo	1	2	3	4	5	6	7
OT/100 ml	2,4.10 ⁵	4,3.10 ⁴	2,4.10 ⁵	4,2.10 ⁵	2,3.10 ⁷	7,0.10 ⁵	2,4.10 ⁵
OF/100 ml	1,3.10 ⁵	4,3.10 ⁴	4,3.10 ⁴	4,2.10 ⁵	1,3.10 ⁷	7,0.10 ⁵	9,3.10 ⁴
EF/100 ml	7,0.10 ²	2,4.10 ³	9,3.10 ²	1,5.10 ³	1,3.10 ⁶	4,3.10 ⁴	4,3.10 ²
<i>Indices:</i>							
OT/CF	1,85	1,00	5,58	1,00	1,00	1,77	2,58
OF/100	185,71	17,92	46,24	280,00	16,28	10,00	216,29

CT = Coliformes totales. CF = Coliformes fecales. EF = *Escherichia coli* fecales.

de valores medios mensuales que engloban los resultados obtenidos en 26 campañas de muestreo, aproximadamente quincenales, realizadas desde julio de 1983 hasta junio de 1984.

En el momento del estudio, la ciudad de Lérida vertía sus aguas residuales al Segre a través de tres colectores, que en la actualidad han sido reagrupados y entubados hacia un punto de vertido común aguas abajo de la ciudad. Debido a la inaccesibilidad, sólo se obtuvieron muestras en uno de los colectores.

Los datos empleados se refieren a colimetrías (coliformes totales y coliformes fecales, *E. coli*) y estreptometrías (estreptococos fecales), que se obtuvieron mediante la técnica del número más probable (3, 11). Los datos virológicos que se presentan (enterovirus) fueron obtenidos por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona, mediante el método de adsorción-elución sobre polvo de vidrio (5, 12).

Resultados

Características microbiológicas generales de la zona de estudio

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en los diferentes puntos de muestreo, junto con los valores de dos sencillos índices indicadores del tipo de contaminación bacteriana.

La relación entre coliformes totales (CT) y fecales (CF) se usa como índice aproximado para establecer la proporción de coliformes totales con origen entérico. Para un valor de CT/CF de «1» se deduce que todos los coliformes totales son de origen fecal y no de otras fuentes (suelo, agua...). En la Tabla 1 los valores resultantes de este índice se mantienen muy próximos a la unidad o iguales a ella, lo que permite establecer un predominio de la componente bacteriana fecal sobre la natural en todo el tramo estudiado. El otro índice reseñado en la misma tabla (CF/EF) compara la contaminación fecal bacteriana de origen preferentemente humano (coliformes fecales) con la de origen preferentemente animal (estreptococos fecales) (11). En este caso, los valores mayores que la unidad indican cargas fecales preferentemente de origen humano, mientras que los valores inferiores a «1» presuponen una mayor componente fecal animal. Se deduce que en la carga fecal presente en el tramo de estudio la componente humana es la más importante.

Cálculo del vertido de la población de Lérida

Del caudal de aguas residuales y del aporte directo de carga microbiana de la población de Lérida al río Segre, sólo se disponía de los datos referentes a uno de los tres colectores existentes, concretamente del más distal (punto número 5; Fig. 2).

El vertido total de la ciudad, tanto en términos de carga microbiana como de caudal de aguas residuales, se ha estimado a partir de los datos expuestos en la Tabla 1 referidos a coliformes fecales. Para la elaboración de los cálculos se han empleado los siguientes valores:

- Concentración de coliformes fecales en el colector muestreado : $1,34 \cdot 10^7 / 100$ ml.
- Caudal del colector muestreado : 200 l/s.
- Carga fecal humana por persona y día (Gerlach, 1981) : 100 g.
- Concentración de coliformes fecales en la carga fecal humana (OMS, 1977): $1,00 \cdot 10^9 / \text{g}$.

De donde:

$$\begin{aligned} 1,34 \cdot 10^7 \text{ col. fec} / 100 \text{ ml} \times 200 \text{ l/s} &= 2,31552 \cdot 10^{15} \text{ col. fec/día.} \\ 2,31552 \cdot 10^{15} \text{ col. fec/día} : 1,00 \cdot 10^9 \text{ col. fec/g} &= 2,315.520 \text{ g/día.} \\ 2,315.520 \text{ g/día} : 100 \text{ g/habitante y día} &= 23.155 \text{ habitantes.} \end{aligned}$$

Como que la población total de Lérida en el momento del estudio era de 109.397 habitantes, y suponiendo que todos ellos vierten al alcantarillado municipal, se deduce que la población que vierte al resto de colectores es de 86.242 habitantes.

Para el cálculo preciso del vertido total de la ciudad, se necesitarían las concentraciones de coliformes fecales en los otros dos colectores existentes no muestreados. Como aproximación se ha partido de la carga fecal teórica vertida al río por los 86.242 habitantes. Así, utilizando los mismos factores de conversión que en el caso anterior:

$$\begin{aligned} 86.242 \text{ habitantes} \times 100 \text{ g/habitante y día} &= 8.624.200 \text{ g/día.} \\ 8.624.200 \text{ g/día} \times 1,00.10^9 \text{ col. fec/g} &= 8,6242.10^{15} \text{ col. fec/día} \end{aligned} \quad [1]$$

Teniendo en cuenta que el caudal circulante por el río en el momento del muestreo era de 25,9 m³/s, el aporte de coliformes fecales deducido aplicado directamente sobre el citado caudal, representa un incremento de concentración en el río de 3.854 col. fec/ml, valor que es muy similar al que se obtienen de la diferencia entre la concentración en coliformes fecales aguas abajo de los dos colectores no muestreados ($4,2 \times 10^5$ col. fec/100 ml) y la de aguas arriba de éstos ($4,3 \times 10^4$ col. fec/ml), que resultó ser de 3.770 col. fec/ml; esta referencia indica, por otro lado, que el volumen de agua aportado por los dos colectores en conjunto era relativamente pequeño respecto al caudal circulante en el momento en el que se realizó la campaña de muestreo.

La aproximación al cálculo de la concentración de coliformes fecales en los colectores no muestreados, y a partir de ahí la estima de su caudal conjunto, se puede plantear en términos de una media ponderada aplicada a una mezcla de dos soluciones de distinta concentración y volumen. Así, considerando los citados dos colectores como uno solo:

$$\frac{\text{N.º col. fec. aguas arriba colectores}}{Q_1} + \frac{\text{N.º col. fec. aporte colectores}}{Q_2} = \frac{\text{N.º col. fec. aguas abajo colectores}}{Q_1 + Q_2}$$

Conociendo Q_1 , estos cocientes pueden expresarse, de un modo equivalente, en términos de número de coliformes fecales por día, permitiendo con ello aprovechar el dato obtenido en [1] y a partir de ahí estimar la carga diaria de coliformes fecales por día aguas abajo de los colectores:

$$\begin{aligned} \text{Número col. fec. aguas arriba/día} + \text{Número col. fec. aporte colectores/día} &= \\ &= \text{Número col. fec. aguas abajo colectores/día.} \end{aligned}$$

Donde sustituyendo por los valores conocidos:

$$(4,3.10^2 \text{ col. fec/ml} \times 2,23776.10^{12} \text{ ml/día}) + 8,6242.10^{15} \text{ col. fec/día} = 9,58643.10^{15} \text{ col. fec/día.}$$

El valor obtenido representa la carga diaria en coliformes fecales que pasa por el punto situado aguas abajo de los dos colectores no muestreados, de manera que, conociendo la concentración en este punto (Tabla 1), puede plantearse una nueva expresión:

$$\frac{\text{N.º col. fec. aguas abajo colectores/día}}{(Q_1 + Q_2)/\text{día}} = \text{N.º col. fec. aguas abajo colectores/ml.}$$

Donde se conocen todos los términos excepto Q_2 , que vendrá expresado en ml. Sustituyendo por los valores conocidos, resolviendo la ecuación y después de ajustar las unidades, resulta que el caudal circulante por el conjunto de los dos colectores no muestreados es de unos 518 l/s, que sumados a los 200 l/s aportados por el colector muestreado, suponen un volumen de aguas residuales generado por parte de la ciudad de 718 l/s, estima que resulta coherente con el caudal de agua potable suministrado a la ciudad, que viene a ser del orden de 700-800 l/s.

La concentración media de coliformes fecales en los dos colectores puede ahora estimarse fácilmente: $8,6242 \cdot 10^{15}$ col. fec/día : 518 l/s = $1,93 \cdot 10^7$ col. fec/100 ml, que es una estima del mismo orden y, por tanto, en principio también coherente, con la concentración de coliformes fecales encontrada en el colector muestreado (Tabla 1) y con el volumen de población de la ciudad. En el colector de la ciudad de Soria (1), que a los efectos de este estudio puede servir como referencia válida, se obtuvo un valor medio de $3,6 \cdot 10^7$ col. fec/100 ml.

Aproximación a la estimación de la capacidad de autodepuración

La capacidad de autodepuración del río Segre desde que recibe los aportes hasta la estación de muestreo situada a 20 km aguas abajo, se ha evaluado mediante un modelo sencillo que parte de una serie de supuestos que permiten simplificar los cálculos y ajustarse, como aproximación, a la evolución teórica de la población bacteriana expuesta en la Fig. 1, aguas abajo de un punto de vertido. Las hipótesis de cálculo para el tramo considerado son las siguientes:

- Se supone que no hay un crecimiento bacteriano significativo. Sólo se considera la mortalidad.
- Los aportes externos son constantes por unidad de recorrido.
- No existen variaciones significativas de caudal.

Conocidas la concentración inicial y final en el tramo considerado, la expresión de partida para el modelo es la siguiente:

$$\frac{dq_0}{dx} = -K_i q_0 + S_i$$

donde « q_0 » es la concentración microbiana inicial, « K_i » es la constante de mortalidad y « S_i » las unidades de carga microbiana aportadas por unidad de recorrido del río y 100 ml. Operando con la anterior expresión se obtiene:

$$q_i = \frac{S_i}{K_i} (1 - e^{-K_i(x-x_0)}) + (q_0) e^{-K_i(x-x_0)}$$

con « $x-x_0$ » como longitud del tramo considerado y « q_i » la concentración microbiana final. Despejando « S_i » se llega a la siguiente expresión:

$$S_i = K_i [(q_i) - (q_0) e^{-K_i(x-x_0)}] / [1 - e^{-K_i(x-x_0)}] \quad [2]$$

Para calcular la constante de mortalidad en el tramo considerado y bajo las hipótesis establecidas, como $dq_0/dx = -K_i q_0$ para un modelo sin crecimiento microbiano como el presente, entonces:

$$K_i = \ln(q_0) - \ln(q_i) / (x-x_0) \quad [3]$$

A partir de las concentraciones de coliformes y estreptococos fecales en el punto de muestreo número 6 (« q_0 ») y las del punto número 7 (« q_i »), separadas entre sí por una longitud de río de 20 km, se obtienen los coeficientes de mortalidad de 0,10/km (« K_{cf} ») para los coliformes fecales y de 0,23/km (« K_{ef} ») para los estreptococos fecales, valores ambos muy bajos al compararlos, respectivamente, con los 0,50 km y 0,76/km obtenidos en un tramo superior del mismo río Segre (8), o con

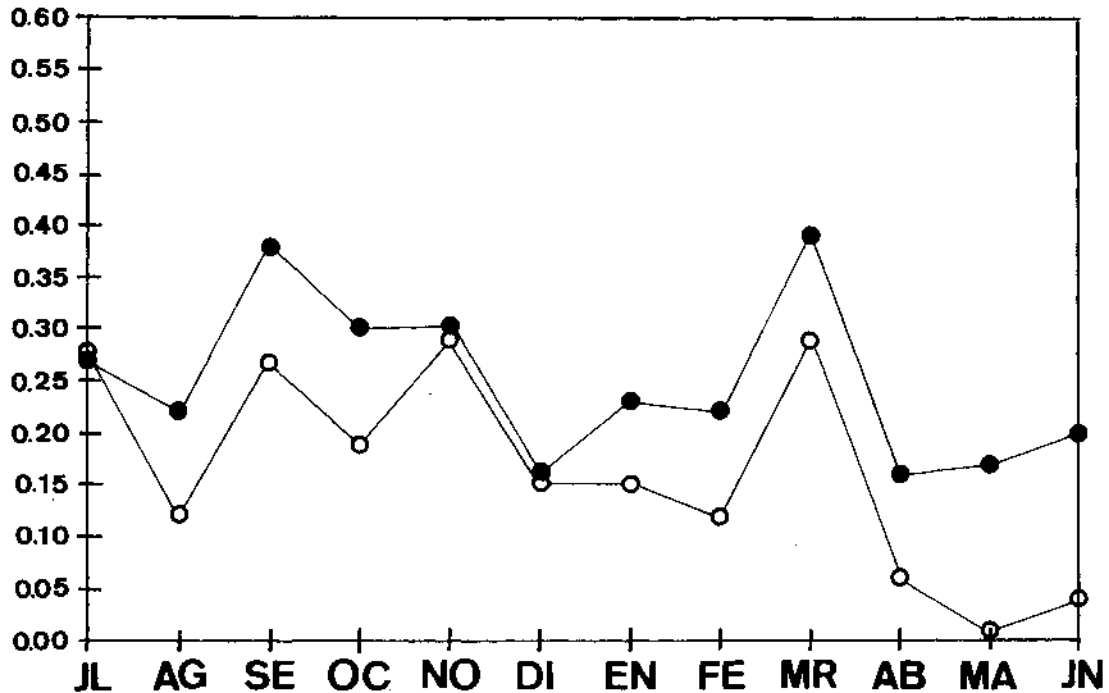


Fig. 3. Evolución a lo largo del año de los coeficientes de mortalidad para los coliformes fecales (○) y los estreptococos fecales (●) entre los puntos de muestreo n.º 6 y n.º 7, según los datos publicados en (8).

0,89 y 0,70/km estimados en el río Duero, aguas abajo de Soria (1). La diferencia entre los coeficientes de mortalidad estimados presupone una menor tasa de supervivencia de los estreptococos frente a los coliformes fecales. Esta apreciación es una constante a lo largo del año como muestra la Fig. 3; sin embargo, no puede extrapolarse fuera del contexto del río y del tramo considerado, si se atiende a las interpretaciones a menudo contradictorias publicadas al respecto (11).

En principio, cabría pensar que la causa de esos coeficientes de mortalidad tan bajos guarda relación con la existencia de aportes incontrolados al río dentro del tramo considerado entre los puntos números 6 y 7. Esto puede estimarse a partir de la expresión [2], de la que se deduce un aporte de $8,3 \cdot 10^2$ y de $0,1 \cdot 10^1$ est. fec/100 ml. km, valores ambos bastante bajos, lo que plantea una aparente contradicción frente a los « K_{cf} » y « K_{ef} » estimados.

A partir de la misma expresión [3], despejando el término « $x-x_0$ », es decir, la longitud del tramo considerado, es posible calcular la distancia necesaria para que el río retorne a unas determinadas concentraciones microbianas. Esta estimación puede interpretarse como una aproximación cuantitativa a la apreciación del impacto ambiental de la ciudad de Lérida sobre el río.

Tomando como referencia el punto de muestreo número 2 situado aguas arriba de los colectores (« q_1 ») y la carga microbiana en el punto número 6 aguas abajo de éstos (« q_0 »), resulta que la distancia a recorrer por el río hasta conseguir unas condiciones equivalentes al punto número 1 es de 27,9 km para los coliformes fecales y de 13,1 km para los estreptococos fecales.

De la misma forma, para que las aguas del río sean aptas para el baño aguas abajo de la ciudad de Lérida, la distancia a recorrer por el Segre hasta alcanzar los valores de concentración recomendados por la CEE en materia de aguas de baño, resulta de ser de 88,5 km para los coliformes fecales y de 27,6 km para los estreptococos fecales. La longitud del tramo de río que va desde la ciudad de Lérida hasta la desembocadura en el Ebro es de unos 43 km.

TABLA 2
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACION DE ENTEROVIRUS

Pto. muestreo	1	5	6	7
Enterovirus (UFC/101)	2,50	91,20	37,65	2,20
Desviación típica	4,30	120,00	48,40	3,70
% positividad	30,00	100,00	80,00	30,00

Valores correspondientes a la media de cinco muestras recogidas en cada punto entre enero y mayo de 1984.

TABLA 3
REFERENCIAS COMPARATIVAS DE DATOS VIROLOGICOS

Río (tramo-localidad)	Titulación media (101)	% positividad
Río Segre (pto. n.º 6)	37,65 UFC	80,00
Río Duero (Soria)	1,58 UFC	16,20
Río Besós (Sant Adrià del Besós)	15-170 NMPUC	90-100
Río Llobregat (El Prat de Llobregat)	2 NMPUC	50-60
Río Furan (Saint Etienne)	1.700,00 UFC	****
Río Sena (Orly)	45,00 UFC	****
Río Rhin (Estrasburgo)	560,00 UFC	****

Río Duero (1), ríos Besós y Llobregat (6), río Furan (5), río Sena (12), río Rhin (2).

La Fig. 3, basada en datos publicados (8), sirve para ver la tendencia de variación anual de los coeficientes de autodepuración del tramo final estudiado aguas abajo de Lérida. Básicamente se observan dos épocas con valores máximos y dos más con valores mínimos que pueden interpretarse a partir de la combinación entre caudales circulantes y temperatura del agua. El primer máximo corresponde al período post-estival, con temperaturas del agua aún relativamente altas y caudales aún reducidos (final del estiaje, septiembre). En estas condiciones la tasa de sedimentación de los estreptococos fecales puede ser alta. Al avanzar el año, el caudal circulante aumenta con las lluvias otoñales, de manera que la carga fecal vertida por la ciudad de Lérida puede recorrer el tramo estudiado en menos tiempo (mayor velocidad del agua), dando el efecto de una disminución de la capacidad de autodepuración. Para marzo la reducción de caudales y las bajas temperaturas del agua podrían haber determinado, respectivamente, un aumento de la tasa de sedimentación y un decremento de la supervivencia bacteriana, lo que se traduciría en un aumento de los coeficientes de autodepuración. Para la época del deshielo (mayo), cabría pensar en una interpretación similar a la del período de lluvias, sólo que con efectos de un orden de magnitud muy superior de acuerdo con el mayor volumen de agua circulante.

Análisis virológicos

La Tabla 2 muestra los únicos datos virológicos (enterovirus) existentes acerca del río Segre (8). La complejidad analítica, y de ahí el más restringido conocimiento de su dinámica en los ríos, hace que la virología no se contemple muy a menudo dentro de los estudios limnológicos, como tampoco se hace con pesticidas, herbicidas, hidrocarburos o metales pesados por razones similares.

La estación de muestreo correspondiente al colector urbano de Lérida (número 5) es, lógicamente, la que dio los promedios más elevados, con un 100% de positividad. En el paso del río a través de la ciudad se observa un gran incremento en las concentraciones víricas, lo que confirma el impacto estimado con los parámetros bacteriológicos.

A pesar de la notable resistencia de los enterovirus frente a los factores ambientales e incluso frente a los desinfectantes más comunes (9), en términos absolutos su evolución, a medida que el río se aleja de la ciudad (puntos números 6 y 7), presenta una reducción del orden del 94%, que es un valor muy similar al obtenido para los coliformes fecales con un 87% y para los estreptococos con un 99%.

La Tabla 3 compara los datos propios con los obtenidos en otros ríos. Se trata de una tabla que incluye valoraciones bajo diferentes métodos que si bien no son directamente comparables, sí que pueden utilizarse como referencia en términos de orden de magnitud, por lo que la titulación vírica media del Segre a la salida de Lérida puede considerarse notable. En comparación con el río Duero en Soria (1), la titulación es unas 24 veces mayor en el Segre, con un factor de positividad de 2,9, a pesar de que la carga fecal de coliformes es del mismo orden.

Discusión

El río Segre llega a la ciudad de Lérida con un contenido microbiano de origen fecal en sus aguas notable. En base a los índices calculados, este contenido es atribuible preferentemente a los aportes de aguas residuales de origen humano.

A la entrada del río en la ciudad se aprecia una cierta dilución en los valores de concentración debido a la presencia de la presa de Lérida, que aumenta la tasa de sedimentación y retención bacteriana, en especial para los estreptococos fecales. La entrada de acequias y flujos de agua laterales no estrictamente residuales puede contribuir en cierta medida a la citada dilución.

Los aportes de aguas residuales de la ciudad de Lérida, estimados en un caudal de 718 l/s, con una concentración del orden de $1,77 \cdot 10^7$ col.fec/100 ml, determinan un incremento significativo de la carga microbiana fecal, bacteriana y vírica. Para este último caso, las concentraciones obtenidas y sobre todo su porcentaje de positividad pueden considerarse notables.

El tramo final del río Segre presenta una carga fecal notable (índice CT/CF; Tabla 1) y unos coeficientes de mortalidad y autodepuración ($\langle K_d \rangle$, $\langle K_e \rangle$) muy bajos, junto con unos aportes ($\langle S_{ef} \rangle$, $\langle S_{ef} \rangle$) también poco importantes. Teniendo en cuenta que en el modelo aplicado $\langle S_p \rangle$ es una variable dependiente de $\langle K_p \rangle$, a unos valores de $\langle K_p \rangle$ altos corresponderían valores de $\langle S_p \rangle$ también mayores que podrían interpretarse como los responsables del mantenimiento de una carga fecal compensatoria de los altos coeficientes de mortalidad. Por el contrario, en el caso concreto de este artículo, la aparente contradicción entre los valores de $\langle K_p \rangle$ y $\langle S_p \rangle$ obtenidos admite dos interpretaciones. Puede ser que los aportes entre el punto número 6 y el número 7 sean discontinuos y puntuales de manera que contribuyan al mantenimiento de una carga basal bacteriana de origen fecal que determine unas estimaciones bajas de $\langle K_p \rangle$ y, consecuentemente, de $\langle S_p \rangle$. Puede ser también que la población bacteriana fecal mantenga una cierta actividad de crecimiento bajo unas condiciones del medio adecuadas; de esta forma, un $\langle K_p \rangle$ estimado en base a un modelo sin crecimiento bacteriano sería también bajo. En ambos casos, el modelo aplicado sin coeficiente de crecimiento no se ajusta a la dinámica teórica de la población bacteriana fecal del río Segre aguas abajo de Lérida.

En los términos planteados, la asimilación (autodepuración) del vertido de Lérida es muy baja y no se completa hasta transcurridos unos cuantos kilómetros aguas abajo de la ciudad, entre 13,1 y 27,9 km. Como consecuencia de todo ello las aguas del tramo no son aptas, teóricamente, ni siquiera para usos recreativos.

En cuanto a la evolución de los coeficientes de autodepuración a lo largo del año, el propio régimen de caudales del río, de tipo nivo-pluvial y sus consecuencias sobre la relación capacidad de transporte-sedimentación de sus aguas, parecen ser suficientes para explicarla, por encima de otros factores abióticos.

Los datos víricos obtenidos muestran un patrón de distribución espacial paralelo a los datos

bacteriológicos que sirve para confirmar los resultados obtenidos en términos de autodepuración, así como para situar al río Segre dentro de un rango comprometido de contaminación vírica.

Bibliografía

1. Arribas, R. (1983). Estudio de la contaminación viral del Duero a su paso por Soria. Tesis de licenciatura. Dpto. Microbiología. Universidad de Barcelona.
2. Block, J. C., Joret, J. C., Morlot, M and Moliguet, J. M. (1983). Recherche des entérovirus dans les eaux superficielles par adsorption-elution sur microfibre de verre. *Techn. Sci. Mun.* 3, 181-184.
3. Guinea, J., Sancho, J. and Parés, R. (1979). Análisis microbiológico de aguas. Ed. Omega. Barcelona.
4. Gerlach, S. A. (1981). *Marine Pollution*. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York.
5. Lucena, F. (1979). Contribution a l'étude de la concentration des virus par adsorption-elution sur poudre de verre. Application a la recherche des virus dans le milieu hydrique. Tesis doctoral. Universidad de Nancy (Francia).
6. Lucena, F., Finance, C., Jofré, J., Sancho, J. and Schwartzbrod, L. (1982). Viral pollution determination of superficial waters (river waters and sea-waters) from the urban area of Barcelona (Spain). *Water Res.*, 16, 173-177.
7. OMS. (1977). Directives applicables a la surveillance sanitaire de la qualité des eaux littorales. Bureau Regionale de l'Europe. Copenhagen.
8. Palau, A. and Palomes, A. (1986). Diagnóstico físico-químico y biológico del río Segre. Dpto. Ciencia del Suelo y Climatología y Dpto. Microbiológico. ETSIA. Lleida.
9. Petrovicová, A. (1989). Detection of coliphages and enteroviruses in drinking water and its sources. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 33, 285-287.
10. Rheinheimer, G. (1981). The influence of physical and chemical factors on aquatic micro-organisms. *In: Aquatic Microbiology*, pp. 83-100.
11. Rodier, J. (1981): Análisis de las aguas. Ed. Omega. Barcelona.
12. Sarret, G. A., Dauglot, C. D. and Villagines, R. (1977). Nouvelle méthode permettant la détermination quantitative des virus présents dans les eaux de surface. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 285, 1359-1361.
13. Schwoerbel, J. (1975). Métodos de hidrobiología. Ed. Blume. Madrid.

Structure of the DNA of five bacteriophages infecting *Micromonospora*

José L. Caso, Carlos Hardisson and Juan E. Suárez*

Area de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo.

Julián Clavería, s/n. 33006 Oviedo (Spain).

(Received September 3/October 15, 1990).

Summary

The physical maps of the DNA of five bacteriophages (Mm1, ØM2, ØM3, Mm4 and Mm5) which infect *Micromonospora* are presented. The restriction analyses showed that all of them had linear, double-stranded DNA, but only four (Mm1, ØM2, Mm4 and Mm5) presented cohesive ends. The phages showed no relationship in terms of their restriction maps or of DNA-DNA hybridization, with the exception of Mm4 and Mm5, which resulted to be very similar. Phage Mm5 presented a high level of resistance to chelating agents, although deletion mutants, all of them showing a single deletion of 1.4 kb, were obtained by using extremely selective conditions.

Key words: Micromonospora, bacteriophages, DNA mapping, cohesive ends, deletion mutants.

Resumen

Se presentan los mapas físicos del DNA de cinco bacteriófagos (Mm1, ØM2, ØM3, Mm4 y Mm5) que infectan *Micromonospora*. Los análisis de restricción demostraron que todos ellos poseen DNA de doble cadena y lineal, pero sólo cuatro (Mm1, ØM2, Mm4 y Mm5) presentan extremos cohesivos. Los fagos no muestran ningún parentesco en términos de sus mapas de restricción ni de hibridación DNA-DNA, con la excepción de Mm4 y Mm5, que resultaron ser muy similares. El fago Mm5 presenta un alto nivel de resistencia a los agentes quelantes, aunque utilizando condiciones selectivas muy extremas se obtuvieron mutantes, todos ellos con una única delección de 1,4 kb.

Introduction

The genus *Micromonospora* includes bacteria with complex life cycles (7, 17, 20), some of which play important roles in industry and nature as producers of antimetabolites and hydrolytic enzymes (10, 21, 22).

In spite of its obvious applied importance very few reports have been published on the biology of the genus, and in particular on its genetics (1, 9, 15). In an attempt to develop conditions that

(*) Corresponding author.

could enable the manipulation of interesting *Micromonospora* strains we have studied several bacteriophages, named Mm1, ØM2, ØM3, Mm4 and Mm5. Some of their general biological properties have been previously described by us (2), and we also have developed a transfection system (3).

All the five phages were naked and showed an icosahedral head and a long non-contractile tail, although they differed in size and in the structure of the distal part of the tail (basal plate present or absent). All of them were temperate, and four immunity groups could be established (Mm4 and Mm5 were included in the same group). These last two phages presented up to 11 structural polypeptides in a very similar pattern, and they could infect 13 out of 20 strains of *Micromonospora*, whereas the other three could only form plaques in a single strain. Finally, the genetic material of the five phages was seen to consist of a single molecule of double-stranded DNA.

In this report we describe in more detail the characteristics of these DNAs as well as the possibility of obtaining deletion mutants, a necessary requisite to develop a phage-based cloning system for *Micromonospora*.

Material and methods

Bacteria and bacteriophages

Micromonospora sp. IMET 8002 was routinely used as the host for phage propagation under the conditions specified in our previous paper (2). This bacterial strain, as well as phages Mm1, Mm4, and Mm5, were a kind gift of prof. Helmut Prauser, Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena, Germany. Phages ØM2 and ØM3 were isolated from garden soil in our laboratory, as previously described (2).

DNA techniques

The isolation of phage DNA was done from high titer lysates by hot SDS disruption of the particles, as described (19).

Restriction endonucleases were supplied by Boehringer Mannheim and used under the conditions specified by Maniatis *et al.* (11).

Separation of restriction fragments was done in 0.6 % agarose gels (Type II, low EEO, Sigma) submerged in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0) and run at 1.1 volts/cm for 16 h. DNA was stained with ethidium bromide (1 µg/ml), and fragment sizes were determined using *Hind*III-generated fragments of phage lambda DNA as standards (4).

The presence or absence of cohesive ends was determined by two methods:

- a) Treatment of phage DNA with T4 DNA-ligase (Boehringer Mannheim) (8), followed by digestion with restriction enzymes and separation of DNA fragments in agarose gels, along with similar samples which were not subjected to any DNA-ligase treatment.
- b) Phage DNA samples were digested with restriction enzymes and divided in two aliquots: one of these was kept at room temperature, 10 min, before loading in agarose gels, whereas the other was heated at 75°C, 10 min, immediately before loading. Samples were then electrophoresed in parallel.

Transference of restriction fragments from agarose gels to nitrocellulose filters (BA-85, Schleicher and Schuell) was done as described by Southern (16).

Probe DNAs were prepared by nick-translation using ³²P-labelled dCTP (New England Nuclear), as previously described (13).

DNA-DNA hybridizations were performed as described by Maniatis *et al.* (11), at 68°C overnight, but followed by two washes in 2 × SSC, 0.5 % SDS and another two in 0.1 × SSC, 0.1 % SDS at room temperature for 15 min.

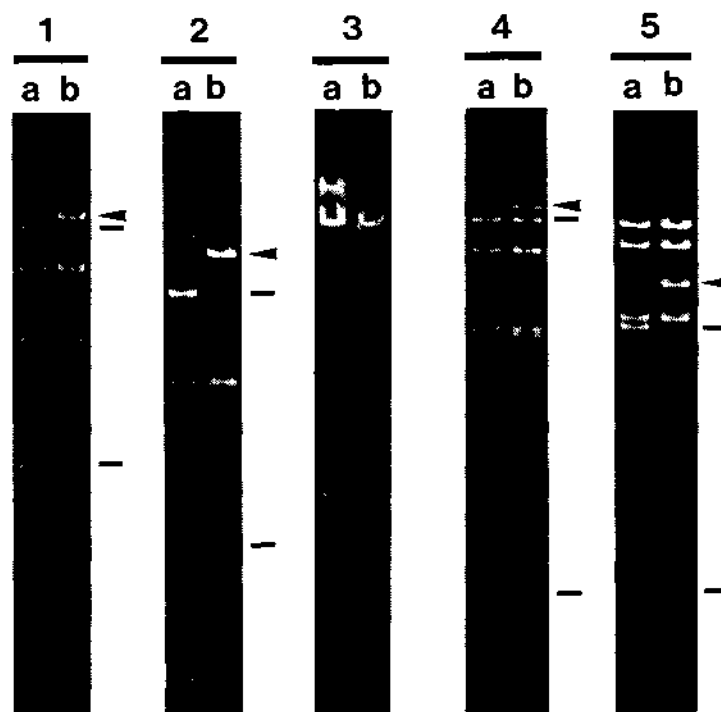


Fig. 1. Determination of the presence of cohesive ends in the DNA of phages Mm1, ØM2, ØM3, Mm4 and Mm5. Samples of each phage DNA were digested with restriction enzymes with (lanes «b») or without (lanes «a») previous treatment with DNA-ligase, and electrophoresed in parallel, as described in the text. 1: Mm1 DNA digested with *Bam*HI + *Bgl*II. 2: ØM2 DNA digested with *Eco*RI + *Hind*III. 3: ØM3 DNA digested with *Cla*I. 4: Mm4 DNA digested with *Hind*III. 5: Mm5 DNA digested with *Hind*III. Bars mark the fragments containing cohesive ends, and arrows show the fragments produced after their ligation. No cohesive ends could be detected in ØM3 DNA.

Isolation of Mm5 deletion mutants

Mm5 virions were treated with up to 0.5 M EDTA or 0.25 M sodium pyrophosphate (Na-PPi) in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), at temperatures ranging from 37 to 55°C for 30 min. Samples treated in this way were diluted and plated out by the conventional double layer technique. After giving rise to plaques, the progeny of surviving virions was resuspended and subjected again to the same treatment; a total of four rounds of treatment were performed in each case. After each treatment round, 10 to 50 individual plaques were picked and propagated separately, and their DNAs were extracted, digested, and electrophoresed in order to detect deletions.

Results and discussion

Cohesive ends

The presence or absence of cohesive ends in the DNA molecules of phages Mm1, ØM2, ØM3, M4 and Mm5, could be demonstrated through their prior ligation, followed by digestion and separation of the resulting fragments. It is shown in Fig. 1 that the ligase treatment of the DNA of four phages (Mm1, ØM2, Mm4 and Mm5) resulted in the disappearance (or weakening) of two restric-

tion fragments, which was accompanied by the appearance (or strengthening) of another band whose size was the sum of the missing fragments. This was the expected result if naturally occurring cohesive ends were present in the phage DNA. The same results were obtained by comparison of restricted samples subjected to heating (75°C, 10 min) or kept at room temperature immediately before electrophoresis: the expected fusion bands appeared in unheated samples (although weaker than those obtained with ligase), but were not visible in heated samples (not shown).

On the contrary, although restriction analyses clearly showed phage ØM3 DNA to be a linear molecule, no cohesive ends could be detected by any of the two methods, which seems to indicate that cohesive ends are not present in ØM3 DNA.

Restriction mapping

The DNA of the five phages was treated with the following restriction enzymes: *Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Xba*I and *Xho*I. The number of recognition sites for each enzyme in the five DNAs has been previously reported (2). We have obtained additional data from single and double digests of each DNA with the enzymes cutting in up to four sites, and both from linear and ligated DNA samples, which allowed us to draw the physical maps presented in Fig. 2. In some cases, as in phage Mm1 DNA, only two enzymes (*Bam*HI and *Bgl*II) cut in less than four sites, while the rest had none or more than ten sites; in other cases, as in Mm4 and Mm5 DNAs, the maps could be constructed for five enzymes, thus giving a more accurate mapping of the DNA.

Surprisingly, we have found that ØM3 DNA was only cut by 3 out of the 13 enzymes (*Bgl*II, *Cla*I and *Sal*I), in spite of being the longest of the five phages DNA (around 65 kb). Because of this, we assayed nine more enzymes on phage ØM3 DNA, most of them recognizing four base pairs or modified, or degenerated, sequences; eight of them (*Bcl*II, *Bst*EII, *Hae*III, *Hind*II, *Hpa*II, *Mbo*I, *Msp*I and *Xho*II) cut ØM3 DNA in more than ten sites, while *Sac*I did not cut it at all. Furthermore, since ØM3 fragments carrying cohesive ends (terminal fragments) could not be identified, we could only partially build its physical map for enzymes *Bgl*II (1 site) and *Cla*I (3 sites).

Another remark must be made concerning the maps of phages Mm4 and Mm5 DNAs: when they were compared, it could be seen that their left half was essentially identical, while the right side, and especially the region closest to the right cohesive end, showed several differences.

DNA-DNA hybridizations

DNA-DNA hybridizations were performed to test the degree of homology between the DNA molecules of the five phages. ³²P-labelled probes prepared from Mm1, ØM2 and ØM3 DNAs did not hybridize with the DNA of any of the other phages. In contrast, probes made with Mm4 or Mm5 DNAs hybridized with all the restriction fragments of Mm5 or Mm4, respectively (not shown). These results confirmed previous data (2) pointing towards the absence of any relationship among the phages studied, with the exception of Mm4 and Mm5. Nevertheless, Mm4 and Mm5 are definitely different entities, not only due to their distinct efficiency and morphology of the plaques they form on common hosts (2), but also due to the dissimilarities found in their restriction maps (see above).

Obtention of deletion mutants from phage Mm5

The presence of cohesive ends in four of the five phages, as well as their temperate nature, opened the possibility of using them as cloning vectors precursors through the isolation of deletion

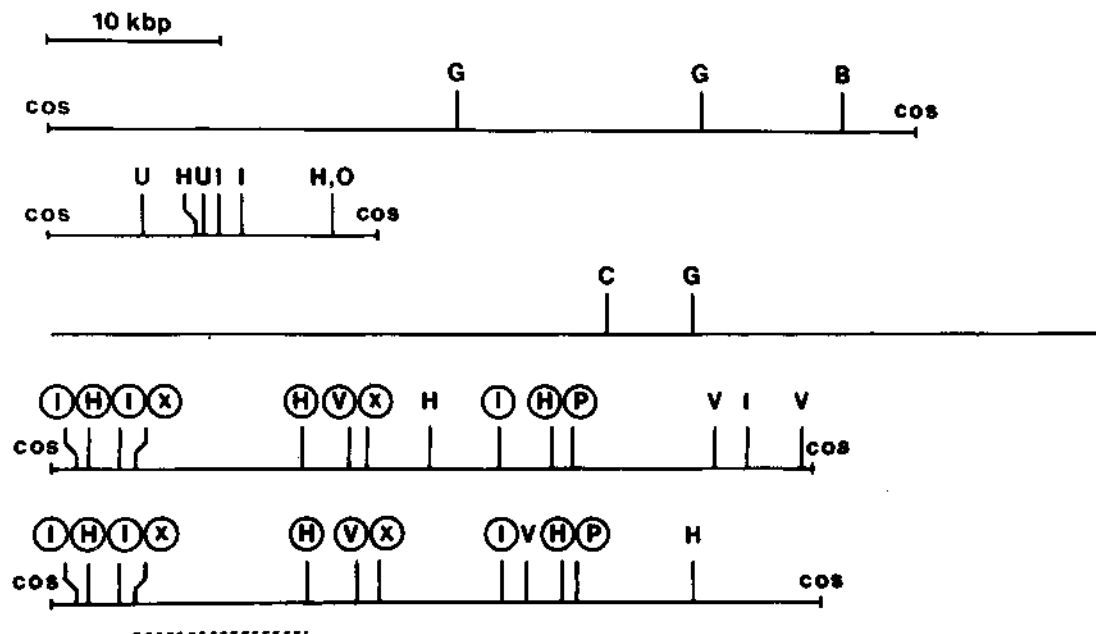


Fig. 2. Restriction maps of the DNA of phages Mm1 (50.6 kb), ØM2 (18.9 kb), ØM3 (65.5 kb), Mm4 (44.0 kb) and Mm5 (44.4 kb) (from top to bottom, respectively). Abbreviations: B, *Bam*HI; G, *Bgl*II; C, *Cla*I; I, *Eco*RI; V, *Eco*RV; H, *Hind*III; P, *Hpa*I; U, *Pvu*II; X, *Xba*I; O, *Xho*I; cos, cohesive ends. In ØM2 DNA a *Hind*III site and a *Xho*I site are almost coincident and have been marked as a single site. In ØM3 DNA two additional *Cla*I sites, giving rise to 23.9, 5.4 and 2.7 kb fragments, lie to the left of the signaled *Cla*I site, but they could not be properly located because of the lack of other restriction sites or cohesive ends. Letters enclosed in a circle show the restriction sites shared in common by Mm4 and Mm5. Dotted line marks the Mm5 DNA region where ca. 1.4 kb deletions could be observed.

mutants. We have chosen phage Mm5 as a cloning vector precursor because of its wide host range, broader than those of Mm1 and ØM2, and because of its regularly higher yields when compared to Mm4, which shows the same host range.

The selection of Mm5 deletion mutants was attempted with chelating agents. Surprisingly, EDTA did not affect Mm5 viability at any concentration up to 0.5 M (data not shown). On the other hand, conditions of treatment with sodium pyrophosphate (40 mM, 37°C, 30 min) that allow high rates of mortality and consequently efficient selection of deleted mutants in other phages (5, 6, 12, 14, 18) only marginally affected Mm5: the percentage of survival ranged from 26% after the first cycle of treatment to 52% after the fourth (100% = ca. 10^6 PFU). In fact, after separately propagating 70 individual plaques obtained after this treatment, all of them showed a DNA indistinguishable from the wild type DNA by restriction analysis with *Hind*III, indicating that the deletions, if any, were too small to be detected. By using different selective conditions (lowering the NaPPi concentration to 25 mM, but increasing the incubation temperature to 55°C, 30 min) dramatic decreases in the survival rate were obtained, ranging from 0.002% after the first round to 3.5% after the fourth (100% = ca. 10^{11} PFU). Ten individual plaques were isolated after the first cycle of treatment, and none presented deletions; however, four out of ten had deletions after the second round, as did all the isolates from the third and fourth rounds (ten and fifty, respectively). Curiously enough, the 64 mutants isolated apparently had suffered the same deletion, i.e., the loss of a segment of about 1.4 kb located in the 9.8 kb fragment flanked by *Xba*I and *Hind*III sites on the left side of Mm5 DNA map (see Fig. 2).

The fact that drastic selective conditions had to be applied to get any deletions from Mm5

DNA and that all of them lied in the same region of the genome could possibly indicate that Mm5 DNA is not very tightly packed into its capsid, and could therefore be considered as a naturally occurring deletion mutant. Alternatively, the possibility also exists that the amount of dispensable DNA was small from the very beginning. Finally, a combination of both circumstances cannot be excluded.

Acknowledgements

This work was supported by Grant PB85-0403 of the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica of Spain. J. L. C. was the recipient of a grant from the Plan de Formación del Personal Investigador of Spain.

References

1. Beretta, M., Betty, M. and Polsinelli, M. (1971). Genetic recombination in *Micromonospora*. J. Bacteriol. **107**, 415-419.
2. Caso, J. L., Hardisson, C. and Suárez, J. E. (1986). Characterization of five *Micromonospora* bacteriophages. J. Gen. Microbiol. **132**, 3367-3373.
3. Caso, J. L., Hardisson, C. and Suárez, J. E. (1987). Transfection in *Micromonospora* spp. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 2544-2547.
4. Daniels, D. L., Schroeder, J. L., Szybalski, W., Sanger, F. and Blattner, F. R. (1983). A molecular map of coliphage Lambda. In: R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl and R. A. Weisberg (eds) Lambda II, pp. 469-517. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
5. Flock, J. I. (1977). Deletion mutants of temperate *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 105. Mol. Gen. Genet. **155**, 241-247.
6. Grund, A. D. and Hutchinson, R. (1987). Bacteriophages of *Saccharopolyspora erithraea*. J. Bacteriol. **169**, 3013-3022.
7. Hardisson, C. and Suárez, J. E. (1979). Fine structure of spore formation and germination in *Micromonospora chalcone*. J. Gen. Microbiol. **110**, 233-237.
8. Hepburn, A. G. and Hindley, J. (1979). Small scale techniques for the analysis of recombinant plasmids. J. Biochem. Biophys. Meth. **1**, 299-308.
9. Kim, K. S., Cho, N. Y., Pai, H. S. and Ryu, D. D. Y. (1983). Mutagenesis of *Micromonospora rosaria* by using protoplasts and mycelial fragments. Appl. Environ. Microbiol. **46**, 689-693.
10. Lechevalier, M. P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: K. P. Schaal and G. Pulverer (eds). Actinomycetes, pp. 157-166. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart and New York.
11. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
12. Parkinson, J. S. and Huskey, R. J. (1971). Deletion mutants of bacteriophage Lambda. Isolation and initial characterization. J. Mol. Biol. **56**, 369-384.
13. Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. **113**, 237-245.
14. Rosner, A., Gutstein, R. and Aviv, H. (1980). Isolation of viable deletion mutants of *Streptomyces* actinophage (Pal6) and their molecular characterization. Mol. Gen. Genet. **178**, 337-341.
15. Ryu, D. D. Y., Kim, K. S., Cho, N. Y. and Pai, H. S. (1983). Genetic recombination in *Micromonospora rosaria* by protoplast fusion. Appl. Environ. Microbiol. **45**, 1854-1858.
16. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**, 503-517.
17. Suárez, J. E., Barbés, C. and Hardisson, C. (1980). Germination of spores of *Micromonospora chalcone*: physiological and biochemical changes. J. Gen. Microbiol. **121**, 159-167.
18. Suárez, J. E. and Chater, K. F. (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: A bifunctional replicon comprising pBR322 inserted into a *Streptomyces* phage. Nature **286**, 527-529.
19. Suárez, J. E. and Chater, K. F. (1981). Development of a DNA cloning system in *Streptomyces* using phage vectors. Ciencia Biologica (Portugal) **6**, 99-110.
20. Suárez, J. E. and Hardisson, C. (1985). Morphological characteristics of colony development in *Micromonospora chalcone*. J. Bacteriol. **162**, 1342-1344.
21. Suzuki, K., Uyeda, M. and Shibata, M. (1985). *Serratia marcescens* lytic enzyme produced by *Micromonospora* sp. strain No. 152. Agric. Biol. Chem. **49**, 1719-1726.
22. Wagman, G. H. and Weinstein, M. J. (1980). Antibiotics from *Micromonospora*. Ann. Rev. Microbiol. **34**, 537-557.

Método de aislamiento, cultivo y bioensayo de toxicidad con protozoos ciliados

Genoveva Esteban^{*1} y Carmen Téllez²

¹ Centro de Investigaciones del Agua. CSIC La Poveda. 28500 Arganda del Rey. Madrid. España.

² Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid. España.
(Recibido junio 6/septiembre 17, 1990)

Summary

A method of isolation and culture of ciliated protozoa as well as a method of bioassay which gives the results of the toxicity tests through the recounts of the organisms, are described.

Key words: ecotoxicity, ciliate, bioassays.

Resumen

Se describe un método de aislamiento y cultivo de protozoos ciliados, así como un método de bioensayo que permite conocer los resultados de toxicidad a través del recuento de los organismos.

Los microorganismos, incluidos los protozoos, son y han sido durante muchos años útiles indicadores de las condiciones ambientales, y tanto la calidad como la precisión de la información que puede obtenerse con ellos empieza a reconocerse ahora. Así, se ha señalado frecuentemente (1, 2, 3, 4, 5) la importancia de desarrollar técnicas predictivas que permitan saber el efecto de determinados compuestos tóxicos en la vida acuática de un río o de una corriente receptora de descargas industriales. La mayoría de estas predicciones sobre agresiones ambientales se han apoyado primeramente, y muchas veces únicamente, en pruebas de toxicidad con especies aisladas, siendo estos bioensayos muy útiles como un primer paso en los estudios de ecotoxicidad.

En este trabajo se describe un método de aislamiento de protozoos ciliados de su ecosistema original, así como el método de cultivo y un bioensayo de toxicidad. El ciliado utilizado para este estudio ha sido *Colpidium campylum* Stokes, 1885, ciliado libre nadador consumidor de bacterias y frecuente en el proceso de tratamiento biológico por lodos activados de las aguas residuales urbanas. Este método puede aplicarse también a otras especies de ciliados. Las muestras fueron tomadas en una planta depuradora de aguas residuales por lodos activados de la provincia de Madrid. Para el aislamiento del ciliado se preparan placas Petri desechables con gotas de solución salina diluida distribuidas por la superficie de la placa en líneas (Fig. 1). Se toma la muestra del agua residual y se vierte sobre un pocillo de vidrio. Aquí, con ayuda de un microscopio estereoscópico, se recogen con

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

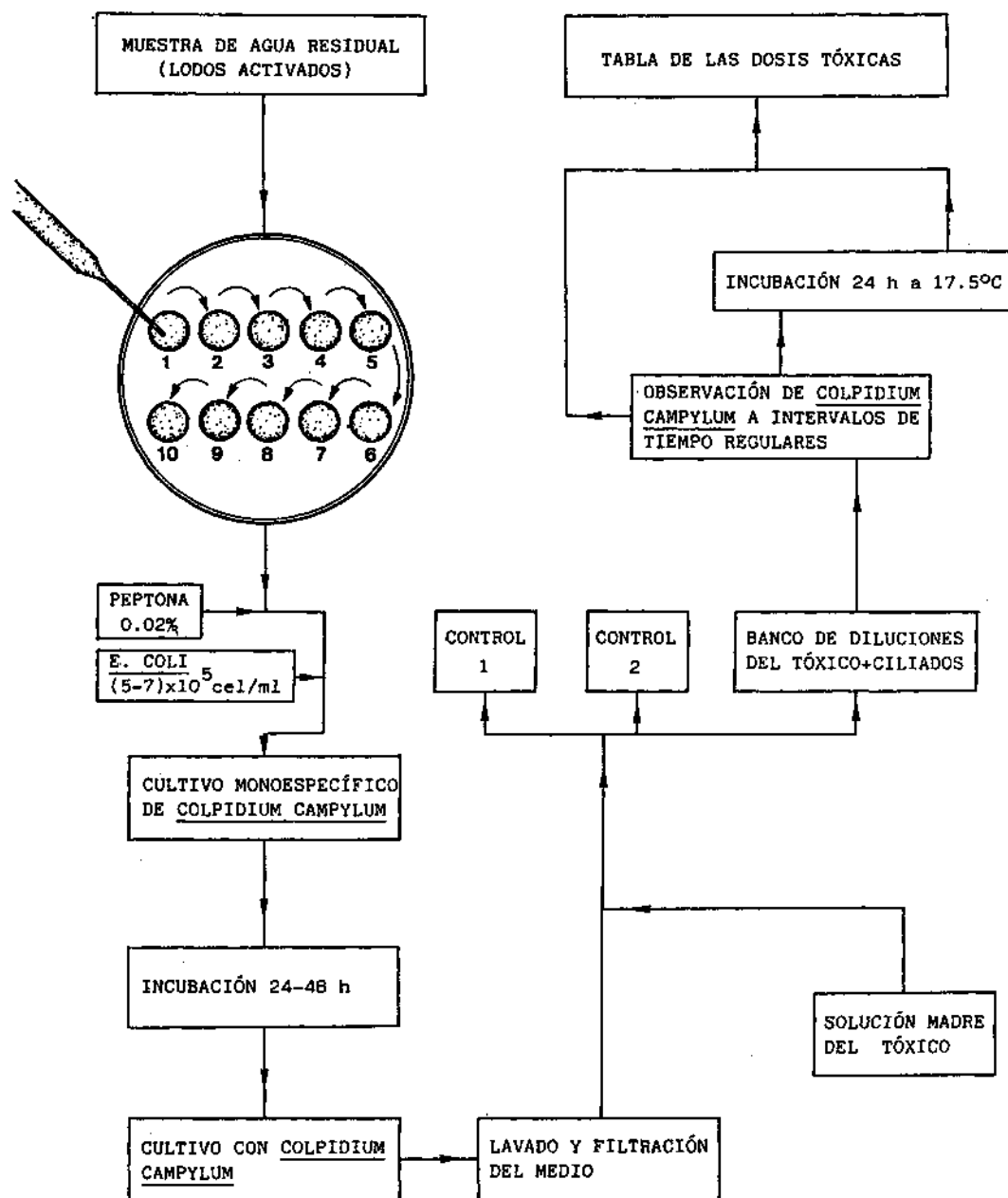


Fig. 1. Esquema del bioensayo empleado para los estudios tóxicos con *Colpidium campylum*.

micropipeta los protozoos ciliados de interés para el estudio y se pasan a la gota número 1 de la placa Petri. De esta primera gota se vuelven a recoger, mediante otra micropipeta esterilizada, los *C. campylum* y se traspasan a una nueva gota, la número 2. Este proceso se repite sucesivamente hasta conseguir haber aislado el ciliado del resto de protozoos y otros organismos de la muestra inicial del agua residual o de la muestra objeto de estudio. El cultivo de los ciliados se realiza a partir de la última gota, en la que se tiene la certeza que el ciliado está completamente aislado.

Como alimento para *Colpidium campylum* se inoculó *Escherichia coli*, aislada del agua residual de la misma depuradora y cultivada en un medio líquido preparado con peptona al 0,02%, como el empleado para los ciliados, después de dejarlo incubarse 24 horas. La concentración final óptima para el cultivo de *Colpidium campylum* se consiguió después de realizar ensayos previos de aproximación con distintas dosis, observando el rendimiento máximo en número de individuos/ml obtenido en 48 horas. El número final de bacterias por mililitro en los tubos de ciliados fue de $5-7 \times 10^5$ células. La bacto-peptona fue seleccionada como medio de cultivo nutritivo para el crecimiento de las bacterias que se añaden a cada tubo de *Colpidium campylum*. De esta forma se obtenía un caldo apropiado donde las bacterias podían seguir dividiéndose aunque los ciliados fueran alimentándose de ellas. Con ello se consigue que la falta de alimento no constituya un factor limitante en el ciclo de vida de los ciliados.

Los cultivos se realizaron en tubos de 100 ml (peptona, 15 ml de solución estéril al 0,1%; agua desionizada, 80 ml; suspensión bacteriana, 0,2 ml, equivalente a $5-7 \times 10^5$ cel/ml; ciliados, 50 células). Los tubos se incuban a 17,5° C durante 48 horas. Es importante señalar que los rendimientos son mejores una vez que el ciliado se ha aclimatado al medio. El crecimiento de los ciliados de cada cultivo se estudió mediante recuento, al estereomicroscopio ($\times 40$ aumentos), del número de protozoos, obteniéndose la media final después de repetir de 3 a 5 veces cada recuento.

Para el ensayo de toxicidad se emplean los cultivos de *Colpidium campylum* después de 48 horas de incubación a 17,5° C. Se lavan varias veces (como mínimo tres) con agua desionizada para evitar que la materia orgánica del cultivo enmascare los resultados al impedir que la sustancia tóxica que interesa evaluar actúe directamente sobre los ciliados. Para este filtrado son útiles los filtros Millipore de 8 μ m de diámetro de poro, ya que no permiten el paso de los ciliados, pero sí el de las bacterias y materia orgánica. Este medio resuspendido es el que se emplea en los experimentos de toxicidad. Una vez concluido este paso se realizan los recuentos del número/ml de ciliados. Con los ciliados resuspendidos en medio libre de bacterias y materia orgánica se realizan las primeras aproximaciones de las concentraciones y dosis que deben emplearse en las pruebas tóxicas, siempre por encima y por debajo de aquel valor que sea tóxico para más del 50% de la población en 24 horas. Para ello se parte de una concentración elevada del tóxico, por ejemplo 1 mg/l, aumentando o disminuyendo la dosis según el efecto que provoque en los ciliados. Una vez preparada suficiente cantidad de suspensión con protozoos, se divide en series, de forma que una se emplea como CONTROL de la conducta de los ciliados sin haber adicionado ningún tóxico; otra serie se utiliza para estudiar el efecto de la sustancia tóxica sobre los protozoos. Al inicio de los bioensayos se van haciendo observaciones cada 5 minutos. Después, y a lo largo del estudio, se van anotando las observaciones para construir una tabla con dosis y tiempos al objeto de determinar la concentración letal para los organismos a los 5, 10, 30, 35 minutos o el tiempo que quiera estimarse.

Después de cada tiempo, tanto las muestras control como las de los ciliados expuestos al tóxico se examinan para determinar los efectos nocivos y establecer comparaciones. Se toman muestras para realizar los recuentos, previo examen al estereomicroscopio para comprobar si los ciliados comienzan a ser afectados. De la muestra control no se realizan recuentos porque permanece igual que al iniciar el ensayo, excepto cuando se estudian períodos largos de tiempo, como son los de 24, 48 o 96 horas. Una vez hechos los recuentos, la determinación de la supervivencia se realiza mediante la expresión:

$$S = \frac{N}{N_0}$$

Donde N_0 es el número de células contadas en el instante inicial ($t = 0$) y N el número de células contadas al cabo del tiempo requerido. Por tanto, N_0 se refiere siempre al control. A continuación se estiman los porcentajes de supervivencia referidos a un determinado tiempo, que es fijado de acuerdo con los intereses del estudioso del tema. Asimismo pueden, construirse curvas de super-

vivencia y calcular, de acuerdo con el criterio de Carter y Cameron (6), el límite de tolerancia medio (LTM) o concentración letal media (CL50), el tiempo letal 50 (TL50), la concentración del umbral de letalidad y la dosis letal, necesarios en cualquier estudio de toxicidad.

La viabilidad celular se comprueba al microscopio estereoscópico, bajo el supuesto que todas las células móviles son viables. Los ciliados de la muestra control nadan normalmente, pero en condiciones tóxicas para la célula todo movimiento de natación cesa y hay un cambio visible en la forma y comportamiento celular. De esta manera se aprecia fácilmente la letalidad. Para asegurarse por completo de ello, se hacen subcultivos de los ciliados considerados como muertos, comprobándose la determinación visual. Los cambios de la célula que se estudian son el tamaño de los individuos, la forma, el modo de natación, el ritmo de la vacuola contráctil y la lisis/no lisis de la membrana plasmática, todo en condiciones de toxicidad. Por otra parte, los niveles subletales pueden afectar a la infraciliación y la estructura de los ciliados, por lo cual se realizan impregnaciones específicas (7).

En conclusión, se ha desarrollado un método simple para el aislamiento y cultivo de protozoos ciliados, proponiéndose un ensayo de toxicidad. El método tiene diversas ventajas sobre otros ya existentes, en especial el de Carter y Cameron (6) en lo que respecta a la toxicidad, que es el más difundido. Entre ellas cabe destacar las siguientes: no se parte de una especie de ciliado aislada previamente, se acorta el tiempo de aislamiento y se emplea un método de cultivo más sencillo. Además, permite probar varios medios de cultivo al mismo tiempo, así como ensayar diversos tóxicos simultáneamente, detallando el cálculo de la supervivencia de los ciliados. El método, por último, no presenta ninguna complejidad para cualquier investigador que desee iniciarse en esta metodología.

Bibliografía

1. Cairns J. Jr. (1970). New concepts for managing aquatic life systems. *Journal WPCF*, **42** (1), 77-82.
2. Cairns, J. Jr. (1980). Beyond single species toxicity testing. *Marine Environ. Res.*, **3**, 157-159.
3. Cairns, J. Jr. (1983). The case for simultaneous toxicity testing at different levels of biological organization. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium, ASTM STM 802*, pp. 111-127. W. E. Bishop, R. D. Cardwell, and B. B. Heidolph, (eds.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
4. Cairns, J. Jr. (1988). What constitutes validation of predictions based on laboratory evidence? *In: W. S. Adams, G. A. Chapman and W. G. Landis (eds.), Aquatic toxicology and hazard assessment: Vol. X pp. 361-368. ASTM STP 971*, W. S. Adams, G. A. Chapman, and W. G. Landis, (eds.) American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
5. Cairns, J. Jr. (1988). Politics, economics, science-going beyond disciplinary boundaries to protect aquatic ecosystems. *Toxic contaminants and ecosystem health; a Great Lakes Focus*, pp. 1-16. Ed., Marlene S. Evans, John Wiley & Sons, Inc.
6. Carter, J. W. and Cameron, I. L. (1973). Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*. *Wat. Res.*, **7**, 951-961.
7. Fernández-Galiano, D. (1976). Silver impregnation method of the ciliated protozoa: procedure yielding good results with the silver carbonate method. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **95**, 557-560.

Microbiología

PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

PUBLICACION SEMESTRAL (2 números al año)

BOLETIN DE SUSCRIPCION AÑO 1991

INDIQUE CON CLARIDAD SUS DATOS

N.º SUSCRIPTOR

IMPORTE SUSCRIPCION

ESPAÑA (I.V.A. INCLUIDO) 5.900 PTAS.
EUROPA 60 \$
RESTO PAISES 72 \$

ENVIAR BOLETIN DE SUSCRIPCION

EDITORIAL GARSI, S. A.
LONDRES, 17
28028 MADRID (ESPAÑA)

DIRECCION DE ENVIO

Nombre y apellidos
Dirección N.º Piso
Cdo. Postal Población
Provincia Especialidad

FORMA DE PAGO:

- CHEQUE NOMINATIVO QUE ADJUNTO.
 DOMICILIACION BANCARIA.

ORDEN DE PAGO. DOMICILIACION BANCARIA

Nombre titular de la cuenta
Banco C/C N.º
Caja de Ahorros C/C N.º
Sucursal Calle
N.º Cdo. Postal Población
Provincia

Ruego a Vds. tomen nota de que hasta nuevo aviso deberán adeudar en mi cuenta el recibo presentado anualmente por MICROBIOLOGIA (Ed. Garsi, S. A.).

..... de 19
FIRMA DEL TITULAR