

Estudio del metabolismo hidrocarbonado del «*aspergillus ochraceus*» bajo la influencia de agentes químicos

POR EL

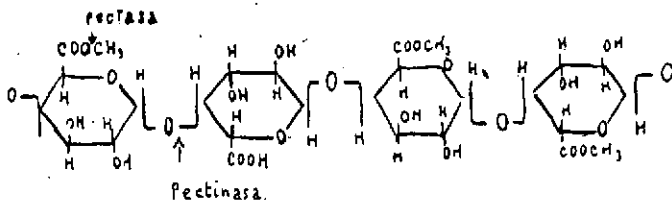
DR. ANGEL ORTUÑO MARTINEZ

Profesor Adjunto de la Facultad de Ciencias

INTRODUCCION

La idea que nos indujo a realizar este trabajo de investigación, iniciado en octubre de 1946, fué en principio de carácter práctico: la eliminación de pectinas en los jugos cítricos por hidrólisis enzimática (acción pectinásica) por medio de cultivos directos sobre los mismos, haciendo posible así la cristalización inmediata del ácido cítrico que contienen.

En el desdoblamiento enzimático de la pectina, éster metílico de grado de esterificación variable de un ácido poligalacturónico, intervienen, según se conocen desde los trabajos de Ehrlich, dos enzimas, la *pectinasa* o *poligalacturonasa*, que desdobra por hidrólisis los enlaces glucosídicos entre los eslabones de ácido galacturónico y la *pectasa* o *pectinestearasa*, que determina la saponificación de los grupos carboxílicos con formación de alcohol metílico y ácido pectínico.



Este proceso, también de interés en otro aspecto, el de la formación y estabilización de jaleas y jugos de frutas, se realiza en la actualidad de

un modo totalmente empírico, por fermentación espontánea, sin controlar ni los géneros ni las especies de microorganismos que las producen. Nosotros elegimos en principio como material de trabajo dos especies de hongos: *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus ochraceus*. De ellos no se conocía en aquella fecha trabajo alguno en que se estudiase sus actividades sobre substratos pectínicos. Únicamente Waksman y Allen (1) habían estudiado en 1933 un *Penicillium*, que no llegaron a caracterizar, y el *Aspergillus niger*, pero los resultados conseguidos no coinciden con los nuestros.

Simultáneamente a la comunicación de nuestros primeros resultados (abril de 1948) (2), conocimos un trabajo de Phaff (3) en el que estudia la actividad de una cepa de *Penicillium chrysogenum* sobre substratos pectínicos, encontrando que producen pectinasa; y otros de Gäumann (4) en los que se ocupan del comportamiento enzimático del *Aspergillus niger*, observando la producción de pectinestearasa por el hongo, solamente en presencia de pectina.

Posteriormente a dicha fecha se encuentran citados en la bibliografía otros trabajos sobre este tema, así Beavan y Brown (5) investigaron las enzimas pécticas del hongo *Byssochlamys fulva* sin conseguir caracterizar la presencia de dichas enzimas. Eleanor J. Calesnick y otros (6), estudian el comportamiento de la pectinestearasa procedente de hongos, la que consideran distinta de la producida por plantas superiores. Jermyn y Tomkins (7) determinan la marcha de la hidrólisis del ácido péctico, producida por poligalacturonasa procedente de hongos, cromatografiando sobre papel los fragmentos de la misma. Holdenn (8) utiliza poligalacturonasa de hongos sobre fibras de hojas de tabaco y Reid (9), finalmente encuentra, en el *Byssochlamys* estudiado anteriormente por Beavan, ambas enzimas.

También se han observado en los últimos años enzimas pectínicas de origen bacteriano por Raynaud, Woodi y Talboys (10) (*).

Todos estos trabajos son posteriores a la publicación de nuestra segunda comunicación (11), en la que estudiamos el comportamiento de las *pectinasas* y *poligalacturonasas* aisladas de los citados hongos.

De la comparación entre las actividades de ambos hongos, así como de las enzimas pectinásicas segregadas por ellos, hemos deducido, en principio, un comportamiento análogo, que se diferencia cuantitativamente con una mayor actividad en las enzimas producidas por el *Aspergillus ochraceus*.

(*) Wolf recoge en una tabla las enzimas producidas por hongos parásitos sobre la madera; entre aquéllas la pectinasa. (*The Fungi*, p. 46, T. II, New York, London, 1947).



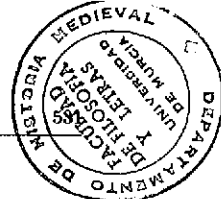
Este hecho nos llevó a una generalización y particularización simultánea en nuestra labor; ya que, por una parte, la continuamos limitándonos a sólo la especie de *Aspergillus*, y por otra, la ampliamos a un estudio general y detallado sobre dicha especie, extendiéndonos preferentemente en la influencia de diversos agentes químicos sobre la morfología macro y microscópica del hongo y las relaciones de las mismas con la actividad metabólica, apreciada ésta desde diferentes puntos de vista y siempre empleando como medios de cultivo substratos hidrocarbonados.

Nuestra hipótesis, como instrumento de trabajo, está fundamentada en los modernos conocimientos de la *Biofisicoquímica*.

Para explicar los diversos fenómenos de la materia protoplasmática de los hongos, consideramos dos estructuras químicas en continua alteración: por una parte, la correspondiente a la unidad viva, y por otra, la composición química del medio ambiente en que se desarrolla.

BIBLIOGRAFIA

- (1) WAKSMAN, S. A. y ALLEN, M. C.: *J. Am. Soc.* 55 - 3408 - (1933).
- (2) SOLER, A. y ORTUÑO, A.: *An. R. Soc. F. y Q.* 4 - 511 - (1948).
- (3) PHAFF, H. J.: *Arch. Biochem.* 13 - 67 - 81 - (1947) en *Chem. Abst.* - (1947) - 6301.
- (4) GAUMAN, E. y ERIKA BOHNI: *Helv. Chim. Acta.* 30 - 1591 - (1947).
- (5) BEAVAN, G. H. y BROWN, F.: *Biochem. J.* 45 - 221 - (1949).
- (6) CALESNICK, E. J. y otros: *Archiv. Bioch.* 29 - 432 - (1950), en *C. A.* - (1951).
- (7) JERMYN, M. A. y TOMKINS, R. G.: *Biochem. J.* 47 - 437 - (1950).
- (8) HOLDENN, M.: *Biochem. J.* 47 - 415 - (1950).
- (9) REID, W. W.: *Nature* 166 - 76 y 569 - (1950).
- (10) RAYNAUD: *Ann. Ins. Pasteur*, - 77 - 341 - (1949), en *C. A.* (1951) - 210.
- (11) SOLER, A. y ORTUÑO, A.: *An. R. Soc. F. y Q.* 46 - 741 - (1950).



I

ESTRUCTURA BIOFISICOQUÍMICA DE LOS HONGOS

EL PROTOPLASMA

Planteamos la organización químico-física del protoplasma de los hongos no como un líquido desprovisto de estructura, ni un saco repleto de una solución coloidal o enzimática, sino un complejo sistema disperso integrado por una vasta formación de partículas: iones, moléculas y agregados moleculares, formando un sistema coloidal de fases numerosas con diversos grados de estructura comprendidos desde la organización macroscópica hasta la inframicroscópica, existiendo elevadas organizaciones estructurales biocatalíticas con distribuciones espaciales apropiadas y las más favorables orientaciones moleculares.

Químicamente, todo el conjunto protoplásmico está integrado por albuminoides, nucleoproteídos, fosfoproteídos, lipoides, grasas, hidratos de carbono, ácidos, sales, etc., pero las proteínas con los líquidos y el agua representan los principales componentes.

El protoplasma está diferenciado en orgánulos: núcleos, nucleolosomas, condriosomas (diferenciados en mitocondrias, condriomitos y condriocontos), dictiosomas y microsomas, en los que las propiedades dependen de su constitución química y de su grado de dispersión.

Las reacciones químicas en regiones particulares del protoplasma marchan a la par con sus diferenciaciones estructurales, constitución química y grado de dispersión.

En el límite entre el citoplasma y cada uno de los orgánulos del protoplasma existen tenues membranas lipodeas de naturaleza tonoplásmi-



ca, que se interponen entre el orgánulo y el citoplasma. Tienen notables propiedades de semipermeabilidad, oscilante y selectiva, susceptibles de variar, ya por la proporción iónica, bien por la cantidad y naturaleza de fosfolípidos que fijen y por la orientación de los grupos hidrófilos y lipófilos, acidófilos, y basófilos, en sus superficies interna y externa. La naturaleza proteínica de estos orgánulos es específica, propia y con enlaces y terminaciones químicas diferentes unos de otros. Cada uno de ellos es, en cierto modo, autónomo dentro del conjunto; pero no puede existir fuera de éste. Los virus pueden ser considerados como elementos de esta naturaleza y que, por tanto, sólo en el seno citoplásmico pueden multiplicarse; pero fuera de él conservan su vitalidad latente. Las relaciones químico-físicas entre piezas protoplásmicas tan distintas se establecen por la masa viva citoplásmica general, en la que todas están incluidas. La actividad química entre el citoplasma general y sus distintas partes diferenciadas, así como en el seno de cada una de ellas es realizada, ordenada y dirigida por agentes químicos catalíticos.

El protoplasma de los hongos es un sistema organizado, delicadamente equilibrado de materias químicas complejas combinadas en ciertas proporciones y patrones, interaccionando armoniosamente y desarrollando ciclos de vida largos y variados.

La actividad bioquímica del protoplasma de los hongos no es efecto de la organización de un conjunto de proteínas en red complicada, sumergida en fase dispersante no menos compleja, sino que resulta de las reacciones o acciones mutuas entre sistemas heterogéneos, tales como los componentes del citoplasma y núcleo, que puestos en presencia producen series continuas de procesos vitales.

Los caracteres exhibidos por los hongos están determinados por la constitución y composición química del protoplasma y por las condiciones del medio ambiente, externo e interno, en cooperación con los cuales dicho protoplasma emprende su desarrollo.

La especificidad en la composición de los hongos se corresponde con la especificidad morfológica. *Todo cambio morfológico es precedido por un cambio químico que es su inmediato determinante.*

En los hongos, el conidio o espora es un sistema protoplásmico que realiza el desarrollo de la mayoría de los caracteres exhibidos por la especie a que pertenece, pero en realidad no son transmitidos en el sentido literal de la expresión: ellos se desarrollan de nuevo en cada generación. El sistema protoplásmico que realiza este desarrollo es en sí una herencia directa de la generación anterior; por lo tanto, lo transmitido es una masa de protoplasma capaz de desarrollar los caracteres bajo condiciones de ambiente apropiadas. Dado que cada generación comienza como

una porción de protoplasma derivado de la generación anterior, es de esperar semejanzas entre las dos bajo condiciones uniformes de ambiente.

En los hongos, el citoplasma participa en la determinación de los caracteres. Los núcleos nunca se desarrollan solos: siempre es un sistema nucleocitoplásmico el que experimenta el desarrollo. Cuando el citoplasma asociado con el núcleo es alterado, los caracteres también se alteran, mostrando la importancia de la interacción nucleocitoplásmica en el desarrollo del carácter. De aquí que, en líneas puras el citoplasma contribuye a la semejanza de éstos, y la semejanza es un aspecto principal en la herencia.

La insistencia en considerar al núcleo como un sistema de elementos necesarios para el desarrollo y su organización cromosómica como la clave del fenómeno mendeliano, está seguramente garantizado, pero ello no debería obscurecer el hecho de que «*la base física de la herencia*» en un sentido amplio, incluye todos los elementos protoplásmicos relativamente estables que afectan el carácter desarrollado, donde quiera que éstos elementos estén localizados, ya sea que su actividad resulte en semejanza o desemejanza de los caracteres. Aunque nos inclináramos a considerar el protoplasma de los hongos como un «medio de cultivo» en el cual el núcleo de alguna manera elabora los caracteres, debe recordarse que este medio, aun más que los mismos caracteres, es heredado directamente de las generaciones anteriores.

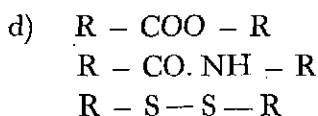
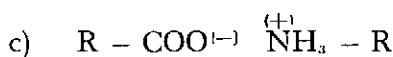
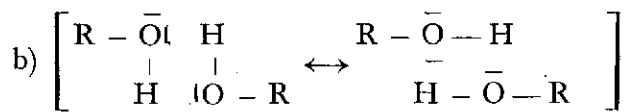
Las proteínas de la materia protoplásmica de los hongos están constituidas por cadenas de α -aminoácidos unidos por enlaces carboamídicos, originando cadenas de polipéptidos de longitud considerable. Estas cadenas son prácticamente indiferentes desde el punto de vista químico, apenas si son capaces de reaccionar con otros compuestos, pero ellas determinan realmente la estructura del protoplasma. Este hecho es consecuencia de la presencia de las cadenas laterales y sobre todo de los grupos localizados en las mismas. De estos grupos depende el comportamiento de la molécula frente al agua y otros constituyentes del protoplasma, como en la formación de la «red molecular» constituida por acoplamiento de varias cadenas polipeptídicas inicialmente independientes.

Así, los fosfátidos se adicionan a los grupos lipófilos e hidrófilos formando complejos, en los que la unión no está determinada por fuerzas de valencia, pues se pueden separar de nuevo los fosfátidos por medio del éter. También los esteroides se unen con los polipéptidos con intervención de enlaces hidrógeno, siendo mayor la capacidad de fijación de las lecitinas que de las esterinas, ya que las primeras poseen dos grupos po-

lares y las segundas no presentan, naturalmente, carácter polar. En las esterinas también debe tomarse en consideración la posibilidad de formación de ésteres con intervención de sus funciones alcohol y de los carboxilos libres sobre las cadenas polipépticas. Las grasas no reaccionan con los grupos funcionales en cadenas laterales y únicamente se puede admitir un acoplamiento de tipo de enlaces de Van der Waals entre los radicales alquílicos del ácido graso y las cadenas laterales no sustituidas del polipéptido.

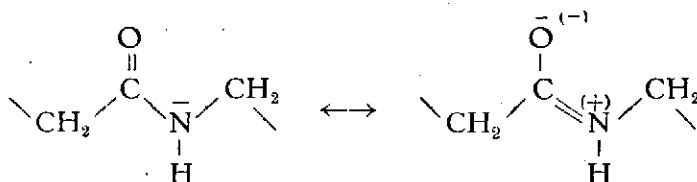
El acoplamiento entre moléculas de polipéptidos, originando lo que hemos llamado red molecular, se realiza por intermedio de las citadas cadenas laterales pudiendo originar estructuras de variada estabilidad. Estas estructuras pueden ser consecuencia de la formación de los siguientes tipos de enlaces:

- a) Enlaces de Van der Waals entre cadenas laterales no sustituidas.
- b) Enlaces por acoplamiento de dipolos o formación de puentes hidrógeno, como los que se producen entre grupos oxhidrilos alcohólicos.
- c) Enlaces iónicos consecuencia de la salificación de los carboxilos libres de una cadena con los grupos amino de otras.
- d) Enlaces no polares con formación de nuevos grupos funcionales no disociados como el éster a partir de carboxilo y oxhidrilo alcohólico de cadenas diferentes, el amídico formado por carboxilo y amino, y finalmente el disulfuro orgánico originado en la oxidación de dos grupos tiol vecinos.



Pero al aproximarse las cadenas de polipéptidos como consecuencia de los anteriores tipos de enlaces, entran en juego, reforzándolos, los acoplamientos entre las estructuras doble ión que colabran en el sistema

resonante del enlace carboamídico (*). Ellos originan redes tridimensionales.



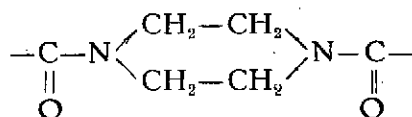
En nuestro criterio este último tipo de enlace intermolecular será el de mayor importancia para la estabilización de la citada red protoplásmica, ya que si bien las energías ligadas a los enlaces entre cadenas laterales son mayores, estos tipos de enlaces serán, a partir de simples consideraciones estadísticas, menos frecuentes.

La red molecular albuminoidea determina espacios o alvéolos abiertos, ocupados por el jugo celular y en los cuales se introducen las cadenas laterales libres, sumergiéndose en el jugo. Es éste un líquido acuoso complejo, en que hay electrólitos junto a micelas más o menos grandes, de albuminoides, de hidratos de carbono, de cuerpos fosforados, de lipoides, etc.

Estos distintos elementos del jugo están en agitación desordenada y perpetua por el movimiento browniano y, a la vez, moviéndose con un cierto orden, en obediencia a las fuerzas de sus cargas eléctricas. El movimiento browniano impide que, en caso alguno, pueda llegarse a una disposición equilibrada, estable, en la ordenación de tan diversas partículas. Esto, sin duda tiene gran importancia para la actividad viviente, con sus características de continuidad.

En los alvéolos, las afinidades especiales de los grupos libres de los aminoácidos o de otros ligados a la red, atraen con especial energía a determinadas partículas, a la vez que otras son rechazadas. Las moléculas dipolares de agua se concentran sobre los grupos hidrófilos, orientándose como lo harían pequeños imanes, para formar la capa acuosa con su carga correspondiente. Por el contrario, las moléculas de agua son rechazadas por los grupos hidrófobos o lipófilos, a cuyo alrededor se disponen los

(*) Brill propone más que un acoplamiento de dipolos, un enlace entre oxígeno y nitrógeno por puente de hidrógeno, hipótesis también admitida por A. Frey-Wyssling, pero a la que hasta oponer el hecho de la existencia de propiedades mecánicas tan buenas como en las poliamidas de amina primaria (en las que por no poseer cadenas laterales, solamente entran en juego en la estructura supermolecular los grupos amida), en las de amina secundaria, como por ejemplo las derivadas de la piperacina



que por carecer de hidrógeno sobre átomo de nitrógeno, no pueden crear el puente propuesto.

lipoides y cuerpos de propiedades análogas, probablemente orientándose de modo a dirigir hacia el grupo la porción de su molécula más fuertemente lipófila.

Así en los límites entre alvéolos de una y otra tendencia las moléculas y micelas complejas se orientarán formando una capa, que dirige hacia el lado hidrófilo los grupos ácidos, oxhidríflicos, aldehídicos u otros de estas propiedades que pueda contener; y hacia el alvéolo lipófilo se dispondrán los radicales alquílicos y fenílicos, de propiedades hidrófobas.

Así nos explicamos la disposición y modo de formación de las membranas tonoplásmicas de tan notables propiedades de semipermeabilidad selectiva. Las moléculas albuminoideas en suspensión en el jugo pueden disponerse en películas de esta naturaleza, orientándose de forma que sus cadenas laterales estén en sentidos opuestos según sean hidrófilas o lipófilas.

Los cationes tienden a dirigirse a los grupos ácidos de las ramas laterales libres de la red, y los aniones hacia los básicos. Su desplazamiento está influido por el espesor de la respectiva envoltura acuosa (que es distinta, según la naturaleza del ión), por la viscosidad del jugo, variable de un punto a otro, y por las perturbaciones que, en su marcha, producen los repetidos choques del movimiento browniano. Ellos, además, tendrán que atravesar aquellas películas o finas capas, formadas como hemos dicho antes.

En el jugo protoplásmico de los hongos, la expresada heterogeneidad en la distribución de iones y partículas determina valores de tensión superficial distintos de un punto a otro. Esto dará lugar a la formación de capas de separación, membranas de gran fragilidad, de naturaleza distinta a las antes mencionadas; pero que dividirán los alvéolos ya dichos en otros más pequeños y más inestables, en continua variación, siguiendo las modificaciones físico-químicas del punto considerado.

El protoplasma tiene, a la vez que la estructura fibrilar y reticular debida al enlace de las grandes cadenas proteínicas, otra alveolar determinada por las membranas de orientación molecular; y estos alvéolos divididos en otros más pequeños con aspecto de finísima espuma que se deshace y rehace continuamente, son los producidos por la tensión superficial. El valor de la presión osmótica depende únicamente del número de partículas (sean iones, moléculas, micelas), que la solución o pseudo-solución contiene. Como en el jugo protoplásmico, aquel número varía de un punto a otro y de un momento a otro, igualmente variará la presión osmótica. Una circulación hídrica y otra iónica existirá por esta causa a través de los alvéolos y en sentidos diversos según los momentos. Esta circulación al determinar variaciones en la concentración de sus-

tancias disueltas, ocasiona cambios, en los grados de imbibición, absorción y adsorción de las cadenas principales y de sus ramas, con las consiguientes variaciones de pH y condiciones físico-químicas en general.

Se deduce, por la constitución de la red protoplásmico y del jugo que la baña, que no puede existir un pH idéntico en todos los puntos de este jugo, ni el pH tendrá un valor constante para cada punto o cada alvéolo.

Por lo tanto, todas las propiedades de las cadenas albuminoideas que dependen del pH del medio dispersante varían de una zona a otra, aun dentro de la misma cadena, de un momento a otro de la dimensión tiempo y de una temperatura a otra, en lo que considerablemente influye la agitación browniana.

Variando el pH en los pequeños espacios alveolares, una cadena albuminoidea está sometida a valores distintos a lo largo de su eje principal. En alguna de sus zonas puede hallarse en su punto isoelectrico, el de máxima solubilidad. En otras, un pH separado de la zona neutra puede determinar su ruptura o fragmentación y fijar grupos terminales en los extremos resultantes. Así, una cadena podrá dividirse en dos; pero también podrá descomponerse, para ser después completamente desasimilada.

En ésta, como en cualquier otra condición física o química, se mantiene en la sustancia viva una continua actividad dinámica. En el jugo hay sustancias químicas que funcionan como amortiguadores, tendiendo a corregir las variaciones bruscas; ellas no impiden el cambio, sino que lo amortiguan, actuando como freno.

Por adsorción, la cadena tiene un cierto número de iones de determinada naturaleza. Pero aquellos cambios en el valor del pH determinan consiguientes variaciones en esta adsorción selectiva, dando lugar a que unos iones sean reemplazados por otros. Iniciado el cambio en un punto, el fenómeno influirá sobre el punto siguiente, éste determinará la variación del sucesivo y, de esta manera, pueden establecerse corrientes iónicas a lo largo de las cadenas o de fascículos de cadenas.

Los iones que se desplacen pueden ser grandes micelas o iones coloidales que arrastren tras sí sus envolturas acuosas y las sustancias que retienen. Si las condiciones determinantes del desplazamiento persisten, afectan a la vez a varias cadenas, y si se continúan en un determinado sentido, se producirá una corriente citoplásmica y hasta una verdadera circulación intracelular.

Aunque en razón a las condiciones de heterogeneidad que hemos descrito no hay reposo posible dentro del protoplasma viviente de los hongos, las corrientes citoplasmáticas visibles al microscopio, tan ostensibles en algunos casos, sólo podrán establecerse cuando sean muchas las cadenas afectadas y todas ellas en el mismo sentido.

En el protoplasma los grupos laterales fijan compuestos fosforados de diversos tipos y, entre ellos, fosfolípidos. De estos, algunos actúan como protectores; otros como filtros selectivos; que dejan llegar al grupo determinadas sustancias y rechazan otras; o bien son enzimáticos y funcionan como fermentos en la síntesis de sustancias orgánicas determinadas.

La extraordinaria sensibilidad a los estímulos deriva de tan gran inestabilidad y heterogeneidad. Pero se precisa una ordenación adecuada de las cadenas y de sus grupos funcionales en un orden y sentido prefijados.

Los estímulos mecánicos, físicos o químicos provocan determinados cambios en la posición y distribución de iones que, propagándose a lo largo de las cadenas proteínicas o de las fascículos de cadenas, despiertan actos o reacciones, a veces muy intensas y en regiones amplias y muy distantes del lugar estimulado.

La modificación determinada por los estímulos puede traducirse en deslizamientos de los iones a lo largo de las cadenas o de sus ramas, según hemos explicado. Pero también puede consistir en movimientos ondulatorios, rítmicos de los iones, sin verdadero desplazamiento.

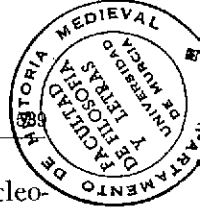
Todo lo dicho nos induce a admitir que en el protoplasma en toda célula de los hongos la coordinación funcional entre sus distintas partes u orgánulos será mantenida, principalmente, por corrientes oscilatorias iónicas en las cadenas de proteínas, como igualmente la coordinación externa, con las condiciones, siempre variables, del medio.

Se ha comprobado la necesidad de la presencia de los iones K, Na y Ca en proporción equilibrada. Separadamente son tóxicos; pero no reunidos en la relación orgánica porque su efecto es antagónico. Antagónico es también su papel en la regulación de la permeabilidad de las membranas; el Na⁺ es el que más hace aumentar esta permeabilidad; el Ca²⁺ la disminuye.

EL NÚCLEO

El núcleo no puede ser considerado como un simple orgánulo protoplásmico, sino como un conjunto o reunión de orgánulos diversos que integran un sistema relativamente voluminoso y claramente delimitado.

Las proteínas existentes en el núcleo se caracterizan por su gran complicación estructural. Sin embargo, los polipéptidos que resultan en sus degradaciones son de estructura poco complicada. Por hidrólisis de estos polipéptidos se obtiene una gran cantidad de aminoácidos básicos (arginina, lisina, histidina). Además de los polipéptidos existen en los núcleos los ácidos nucleicos, también de estructura catenaria. Los ácidos



nucleícos se encuentran unidos a las proteínas formando los nucleoproteídos.

El ácido nucleíco está compuesto de grupos químicos de tres tipos principales:

- a) grupos de ácido fosfórico.
- b) grupo de hidrato de carbono, pentosa (algunas veces hexosas).
- c) y las bases purínicas y pirimidínicas.

El ácido nucleíco, como las proteínas, con las cuales está asociado, tiene la notable capacidad de formar cadenas largas. En ciertos estados una forma de ácido nucleíco puede ser identificado en el nucléolo y en algunos casos en el citoplasma.

Un nucleótido importante es el ácido adenílico, que, por hidrólisis, da ácido fosfórico, ribosa y adenina. También tienen mucha importancia los cofermentos de Warburg y Euler, que se componen de dos o tres moléculas de ácido fosfórico, dos de ribosa, una de adenina y una de nicotinamida.

Los mononucleótidos se encuentran esterificados entre sí, formando los polinucleótidos. Así, el ácido zimónucleíco, que aislado de la levadura, está formado de cuatro mononucleótidos. Este ácido no existe solamente en el núcleo, también en el citoplasma. Los polinucleótidos de los núcleos celulares se diferencian de los del citoplasma porque una parte de sus nucleótidos no dan ribosa por hidrólisis, sino que su pentosa es la desoxirribosa o timinosa. Esta desoxipentosa es químicamente análoga a la ribosa, estando sustituido el grupo OH del segundo átomo de ésta por un átomo de H. Esta pequeña variación en la estructura química hace a los polinucleótidos del núcleo mucho más sensibles a la hidrólisis que los del citoplasma. Los polinucleótidos nucleares tienen una tendencia mayor que los del citoplasma a polimerizarse, originando cadenas muy largas de estructura muy uniforme.

La consistencia física del núcleo en conjunto depende como es obvio, de la consistencia y proporción relativa de sus diversos componentes: membrana, cariolinfa y cromonemas. En un campo eléctrico los núcleos libres o células muy ricas en material nuclear, tienden a dirigirse al ánodo, demostrando que llevan una carga negativa mientras que el citoplasma o células con poca cromatina tienden a dirigirse en sentido contrario.

En el núcleo, la cromatina es la que lleva la carga negativa, siendo positivas la cariolinfa y comúnmente los nucléolos.

Las nucleoproteínas que forman parte de la constitución del núcleo, entran en él en proporción mayor que en el citoplasma. Son específicamente distintas de las que intervienen en la red citoplásmica; y también las



condiciones físico-químicas del jugo nuclear difieren de las del citoplásmico.

El núcleo posee una sustancia ávida por los colores básicos. Es poco atacada por las enzimas proteolíticas, siendo difícil su dispersión por autólisis; pero se reconoce una diastasa, la nucleasa, que la dispersa fácilmente.

En el seno del núcleo se halla el nucleolo (o nucleolos). En su constitución entran principalmente una proteína que no se tiñe con la hematoxilina férrica y un éster sulfúrico de un polisacárido, que es coloreable.

El nucleolo es basidófilo. Está constituido por nucleoproteínas, pero sin ácido nucleico libre.

Papel de los ácido nucleicos

Se ha creído que los ácidos nucleicos son las sustancias de las que depende la herencia, pero su constitución química es relativamente uniforme, faltándole la variabilidad y la diversidad que la Genética exige. Por ello, los ácidos nucleicos sólo desempeñan un papel de carácter protector en la división nuclear. Análogamente, los grupos fosfóricos de los ácidos nucleicos podrían proteger, uniéndose con ellos, a algunas configuraciones atómicas lábiles de la cadena proteica, impidiendo así su destrucción durante el proceso de repartición de los cromosomas.

Loustau considera que el ácido nucleico actúa como protector de las cadenas laterales, atraído y retenido con mayor o menor energía, según las condiciones del momento. Por ello pueden conservar su constitución particular a través de las vicisitudes por las que pasan aquellos orgánulos cromáticos durante los procesos de la reproducción. La protección será más o menos eficaz según sean las especiales propiedades químicas de cada grupo funcional de la rama.

El órgano productor de muchos fermentos es el núcleo. A sus elementos constituyentes o nucleolosomas se les supone los formadores de las enzimas que realizan el primer encadenamiento de aminoácidos. Estas primeras cadenas o péptidos son después moduladas por la acción enzimática de los genes, dotándolas de cadenas laterales. Las moléculas albuminoides que atraviesan la membrana nuclear constituyen las micelas albuminoideas que son modificadas por los fermentos microsómicos y transformadas en proteínas citoplásmicas.

LOS CROMOSOMAS

Los cromosomas están formados por cadenas de las proteínas nucleares especiales, con estructura inframicroscópica, semejante a la que hemos descrito para el citoplasma; pero más densa. Los enlaces o puentes de esta red proteínica cromosómica son distintos de los citoplásmicos y sus cadenas laterales predominantemente básicas.

El material que forma los cromonemas, que son constituyentes importantes de los cromosomas, es principalmente una nucleoproteína, formada por proteína y ácido nucleico. Este material, muy coloreable, ha sido llamado nucleína, o más comúnmente *cromatina*. Las proteínas que la forman son relativamente simples.

Los ácidos nucleicos y las proteínas absorben los rayos ultravioletas con desigual intensidad. Aplicando esta técnica al estudio de los cromosomas se ha demostrado que el funcionalismo de los cromosomas se debe, desde un punto de vista químico a las interacciones entre los polipéptidos del retículo y los ácidos nucleicos. Las cadenas laterales de los polipéptidos son el substrato de los genes, siendo *el gene una configuración atómica específica existente en las cadenas laterales*. La participación longitudinal de los cromosomas en la mitosis, formándose dos cromosomas iguales, sería la separación de dos cadenas paralelas e iguales de polipéptidos. El intercambio de genes sería químicamente la separación de un grupo atómico de una cadena lateral, que pasaría a combinarse con otra cadena lateral de otro polipéptido.

Los estudios de absorción de rayos ultravioletas conducen a la conclusión de que las bandas cromosómicas están compuestas de uno o más discos de gránulos cromosómicos que se extienden a través del cuerpo cilíndrico del cromosoma. Estos gránulos se denominan cromómeros, aunque su variación en tamaño y número, aun en una banda dada, indica que aquí este término no designa unidades del mismo rango. El cromosoma consta de un gran número de cromonemas que se han multiplicado mientras el núcleo crecía sin que ninguna mitosis los separara; sus cromómeros quedan estrechamente asociados o unidos lateralmente como discos.

La estructura más fina de los cromosomas es actualmente un tema muy discutido, aunque se está de acuerdo en que las bandas transversales son aspectos naturales que tienen la utilidad citogenética.

Un hecho de la más grande importancia es que las bandas forman un patrón que es constante para un cromosoma dado.

De particular importancia es la naturaleza química de los filamentos cromáticos y de los cromosomas, de los cuales aquellos son los principa-

les constituyente, ya que principalmente, de su composición depende el propio poder del núcleo, determinando el curso del desarrollo y los fenómenos de la herencia.

Cuando tiene lugar la reproducción, los cromosomas son transmitidos a la generación siguiente a través de las esporas. Su composición físico-química es tal, que ellos tienen efectos específicos y profundos sobre el curso del desarrollo y, por lo tanto, sobre los caracteres de los hongos. Como una consecuencia de todo esto, juegan un papel principal en la herencia.

Cada cromosoma debe ser considerado como un individuo persistente que se reproduce sólo por división y en este sentido mantiene su individualidad a través de los sucesivos ciclos nuclear y vital. En cada ciclo nuclear pasa a través de una serie de alteraciones, los que pueden oscurecer su continuidad, aunque no quitarle validez. No hay comprobación de que las masas individualizadas de matriz persistan, pero todas las pruebas obtenidas indican que el cromonema persiste con su diferenciación longitudinal característica en estructura y función. Los cromonemas en el estadio metabólico están relativamente libres de la matriz envolvente y más expuestos a los otros materiales nucleares, lo que indica que los cromosomas ejercen sus efectos sobre las actividades de las células principalmente en este momento.

Los diversos materiales nucleares o unidades elementales necesarios para la vida del organismo, son llevados casi en todas partes en varios cromosomas más bien que en uno solo o en gran número. Este pequeño grupo o genoma, se considera como un sistema organizado de miembros interdependientes, y no como una colección simple de materiales.

La cariolinfa consta principalmente de proteínas no tan polimerizadas como las de los cromosomas.

El gene han sido generalmente considerado como un cuerpo pequeño con un grado considerable de independencia estructural y fisiológica, quizá el último miembro de las series *organismo-célula-núcleo-cromosoma-cromómero-gene*, siendo el mismo gene una sola molécula de proteína o pequeños grupos de moléculas. El concepto de gene se emplea principalmente como el de un instrumento útil en la investigación biológica y bioquímica. Esta situación es comparable a aquella que se planteaba en física y química sobre el concepto de átomo, empleado durante tanto tiempo con éxito, aunque se conocía respecto a su naturaleza mucho menos que en la actualidad. La esperanza de que nuestro conocimiento del gene se haga más íntima es alentada por las investigaciones de los aspectos bioquímicos de la acción génica.

Wist ha estudiado en los ascomicetos, cómo variaciones en las condi-

ciones nucleares hacen posible relacionar reacciones químicas particulares con ciertos genes. Así establece la asociación de la citogenética con la bioquímica.

Admitimos que los genes son condiciones constitucionales localizadas en los cromosomas que pueden ser tratadas como unidades en la investigación genética y bioquímica.

Las cadenas de polipéptidos que soportan los genes no pueden estar expuestas al arrastre por las corrientes intraprotoplasmáticas. Ellas son las que guardan los caracteres constantes y característicos de la especie y están localizadas en un punto determinado y protegidas contra la intensa actividad química que reina en el protoplasma. La misión del núcleo es la de preservar estas cadenas, pues la estructura del núcleo es análoga a la del protoplasma; pero el retículo nuclear es una red más complicada y de mallas más pequeñas que la del citoplasma, por lo que es más compacta y menos disgregable.

Si se separa una cadena de la molécula, desaparecen las acciones que ella ejercería y se modifican además las cadenas laterales vecinas. Así se explica la dependencia mutua entre genes próximos. Dos genes serán independientes uno de otro cuando las cadenas laterales en que asientan estén localizadas en partes muy distantes de la cadena central del polipéptido que les sirve de soporte.

Los genes ocupan en los cromosomas una posición constante, que ha podido ser determinada con toda precisión. Alineados en fila a todo lo largo de ellos, se han podido precisar hasta las distancias relativas que separan a unos de otros de cuantos contienen cada cromosoma.

La síntesis de metabolitos esenciales está controlada por los genes, siendo heredada cada deficiencia sintética como si estuviera asociada a la mutación de un gene determinado.

Cada reacción particular está controlada por un solo gene. La alteración o destrucción permanente de un gene da lugar a un cambio bioquímico.

Un cambio en la posición de las cadenas laterales correspondería a un desplazamiento de los genes y un cambio en la configuración de una cadena lateral produciría una mutación. Con el nombre de mutación se conoce una variación brusca que se transmite por herencia.

Orgánulos del citoplasma

Los orgánulos que forman el condrioma de los hongos son las mitocondrias, condriomitos y condriocontos, abundantemente esparcidos por

todo el citoplasma. Sus proteínas difieren de las del citoplasma. En el jugo que impregna la red proteínica se ha reconocido la presencia de fosfolípidos y de hidratos de carbono.

Los componentes del condrioma desempeñan funciones de síntesis y asimilación. Los agentes activos de su trabajo químico son los fermentos que elaboran o que retienen por adsorción en las ramas laterales de su red proteínica.

Los dictiosomas forman el aparato de Golgi. Son como pequeñas vacuolas de contenido denso y constituido por lipoides. Se consideran como los elementos citoplásmicos elaboradores de grasas y lipoides. Los grupos lipófilos predominan en las ramas laterales de sus cadenas proteínicas dispuestos en capa periférica en dirección centrípeta y conteniendo los fermentos sintetizadores de las sustancias lipoideas que constituyen estos orgánulos.

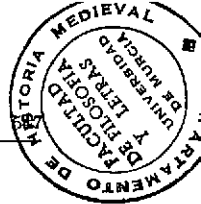
Los microsomas son los más pequeños orgánulos citoplásmicos (miden desde 600 U.A. hasta 60-200 milimicras), compuestos principalmente de ribosonucleoproteínas o fosfolípidos. Constituyen los centros de localización y formación de las enzimas elaboradoras de las cadenas albuminoideas.

De la misma manera que los genes, los microsomas pueden experimentar una mutación espontánea o inducida por agentes mutantes físicos o químicos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ANDERSON: *Bacteriological Chemistry*. Edinburgh, Livingstone, 1946.
- ANSON, EDSAL y COL: *Advances in Protein Chemistry*. New York y London, Lewis Co. 1944.
- BAKER: *Golgi Bodies*. *Nature* 155 - 118 - (1945).
- BELLING: *Genes and chromomeres in flowering plants*. *Nature* 121-831-(1928).
- BENEDICENTI: *La vita come Fenomeno Chimico-fisico*. Milano, Bocca, 1943.
- BLADERGROEN, W.: *Chimie Physique Medicale*. Bale, 1943.
- BOSE, S. R.: *The question of Golgi bodies in the higher Fungi*. *Ann. of Botany* 45 - 303 - (1931).
- Function of Plant Vacuoles*. *Nature* 154 - 488 - (1944).
- BOWEN: *On the nature of mitochondria*. *Nature* 134 - 207 - (1924).
- Studies on the structure of plant Protoplasma*. *Science*, 1926 y 1927.
- COSSAIGNE: *Origine et evolution du vacuoma chez quelques Champignons*. *Rev. gen. Botanique*, 43 - 140 - (1931).
- DANIELLI, J. F.: *Cell physiology and pharmacology*. New York, 1950.
- DARLINGTON: *Heredity, Development and Infection*. *Nature* 154-164-(1944).
- Paracrinkle Virus and Inheritance*. *Nature* 154 - 489 - (1944).
- FOSTER, J. W.: *Chemical Activities of Fungi*. New York, 1949.
- FREY-WYSSLING, A.: *Submicroscopis Morfology of Protoplasma and its derivatives*. New York, 1948.
- LOUSTAU GÓMEZ, J.: *Estructura de la Materia Viva*. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1948.
- Estudios sobre el Nucleolo en Células Vegetales*. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1943.
- Clave determinativa del género Penicillium*. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1950.
- NEGRONI, P.: *Morfología y Biología de los hongos*. *Técnica micológica*. Buenos Aires, 1938.
- PORTER, J. R.: *Bacterial Chemistry and Physiology*. New York, 1947.
- RAPER, K. B. y THOM, C.: *A Manual of the Penicillia*. Baltimore, 1949.
- ROCASOLANO, G.: *Tratado de Bioquímica*. Zaragoza, 1928.
- RUIZ, S.: *Bioquímica de los Elementos*. Instituto Santiago Ramón y Cajal. C. S. I. C., 1946.
- SHARP, L. W.: *Fundamentos de Citología*. Buenos Aires, 1947.
- SKINNER, C. E., EMMONS, C. W., TSUCHIYA, H. M.: *Molds, Yeasts and Actinomycetes*. New York, 1947.
- TANNER, F. W.: *Bacteriology*. New York, 1948.
- WAKSMAN, S. A. y STARKEY, R. L.: *The soil and the microbe*. New York, 1950.
- WOLF, F. A. y WOLF, F. T.: *The Fungi*. New York, London, 1947.
- WORK, TH. S. y WORK, E.: *Quimioterapia*. Aguilar, Madrid.





II

EL SUBSTRATO

Es indiscutible la influencia de los agentes químicos, físicos y químico-físicos sobre las actividades biológicas de los seres vivos, que particularizaremos, limitándonos al objeto de nuestros estudios: «Los hongos» en general y concretamente a la especie «*Aspergillus ochraceus*».

Esta influencia no se manifiesta únicamente en la actividad bioquímica de la especie, sino también en los caracteres morfológicos, siendo nuestro objeto comprobarlas en variadas condiciones de medio.

Creemos que el camino más seguro para penetrar en el difícil problema que estos seres nos presentan, es el estudio experimental de la acción de los elementos componentes del sistema viviente del hongo, considerándolos como compleja agrupación heterogénea cuyas propiedades están íntimamente ligadas con sus características físico-químicas productoras del equilibrio dinámico, en el cual la materia que lo constituye no deja de transformarse liberando energía, estimulada por la acción de agentes químicos.

Las transformaciones materiales de los hongos son fenómenos bioquímicos, correlativos a procesos vitales, dentro, pues, de las reacciones catalíticas.

Es evidente la necesidad de incorporar sales minerales en los substratos que sirvan de alimento a los hongos para atender a las necesidades del desarrollo y crecimiento, y también para reemplazar las que normalmente eliminan, pues son componentes celulares indispensables.

Ya hemos indicado que las materias salinas se encuentran en el citoplasma celular de los hongos formando disoluciones ionizadas en mayor



o menor grado y originando preferentemente la presión osmótica por la que muchos fenómenos vitales se realizan en estos organismos; sus iones, con la carga eléctrica que por su valencia les corresponde, disponen de una gran cantidad de energía, y se combinan entre sí o intervienen en otras reacciones bioquímicas. La acción de las sales es función de la valencia de ión, o sea, de su carga eléctrica, que es el factor que actúa modificando la estabilidad del sistema vivo de los hongos; también debe tomarse en consideración el volumen del ión.

La acción fisiológica de las sales la interpretamos como consecuencia de la influencia de sus iones sobre los coloides citoplásmicos. En los fenómenos de imbibición, en la adsorción por las proteínas, tan importante para el sostenimiento de la cantidad normal de agua, los iones actúan eficazmente: Entre éstos se establece un antagonismo que parece definido por la valencia, y entre los de la misma valencia, por su número atómico (realmente, su volumen atómico o iónico). Este antagonismo existe definidamente entre los iones alcalinos (monovalentes), y los alcalino-térreos (divalentes); aquellos actúan porque facilitan la imbibición, aumentando la permeabilidad de la membrana celular, mientras que los alcalinos-térreos ejercen una acción curtiende sobre ésta, y por consiguiente, la permeabilidad disminuye. Los iones divalentes regulan las acciones de los monovalentes.

Thom (1) considera como elementos imprescindibles para el normal desarrollo de los hongos, los cuales entran en su composición, los siguientes:

O, H, C, N, P, S, Na, K, Mg, Cl, Fe

Uno de los motivos de estudio, y para nosotros de mayor interés, es el de las propiedades que dependen de la naturaleza química de las sustancias que se forman en el sistema de estos organismos o *macrocomponentes* y las que se producen como consecuencia del mayor o menor grado de dispersión de los *oligoelementos*.

Enfocando el problema químicamente, los hongos como tales organismos vivos, aparecen, con frase de Santos Ruiz, como un tipo de *oligarquía en la cual una multitud inmensa compuesta de átomos plásticos sería gobernada por una minoría de átomos catalíticos* (2).

El complejo orgánico de los hongos retiene por adsorción o químicamente *infinitamente pequeños químicos* en estado atómico o iónico o formando parte de moléculas complejas (enzimas respiratorias, la anhidrasa carbónica, ácido fólico, etc.). Foster enumera las enzimas que contienen iones metálicos o que son activadas por los mismos; entre ellas no se encuentran ambas enzimas pectínicas.

La importancia de los *oligoelementos* es tal, que con fundamento se dice que sin su presencia no sería posible la vida. Por ello la necesidad de hacer resaltar la importancia de los *infinitamente pequeños químicos*. Estos no son materiales de construcción, pero multitud de trabajos realizados en el campo de la Bioquímica (*), han puesto en claro, que estas sustancias, aunque en concentraciones pequeñísimas, obran como catalizadores principalmente de reacciones esenciales a la nutrición, y, por consecuencia, desempeñan en estos organismos un papel biológico de primer orden.

Se ha generalizado el estudio de los efectos comparativos de las *fitohormonas* y los *reguladores de crecimiento* sobre vegetales superiores, investigándose centenares de productos de constitución muy diversa y con poca o ninguna semejanza con las *hormonas vegetales* propiamente dichas, pero que sin embargo, poseen actividad fitohormonal, en ocasiones, intensísima.

En este trabajo intentamos dilucidar si los agentes químicos, comprendiendo entre éstos las sales inorgánicas, compuestos orgánicos catalogados como *reguladores de crecimiento* y otros no catalogados como tales, participan en el metabolismo de los glúcidos por los hongos, activándolo o retardándolo.

Por nuestras experiencias, podemos decir que el papel que desempeñan en la fisiología de los hongos los agentes químicos es múltiple, siendo una de sus características fundamentales el producir efectos muy sensibles cuando son aplicados convenientemente.

Tanto interés concedemos a las orientaciones expuestas, que llegamos a suponer que probablemente, cuantas reacciones se producen como consecuencia del metabolismo de los hongos, podrán ser modificadas por agentes que en algunos casos se conocen y que en otros permanecen todavía desconocidos.

Nos hemos apoyado en este criterio para excitar o inhibir el mecanismo de la catálisis bioquímica de los hongos variando la velocidad de sus correspondientes reacciones, cultivados aquellos sobre substratos hidrocarbonados. Señalamos a este respecto que nos hemos visto obligados a determinar «a priori» dosis convenientes, ya que se trata de productos que actúan biológicamente y por tanto, rebasando un cierto límite, no sólo no favorecen, sino que imposibilitan el desarrollo del microorganismo.

Los *Macrocomponentes* o *Macroelementos* ejercen su acción sobre el hongo en una forma masiva, ya que se comportan como constituyentes

(*) Experiencias de Raulin, Buchner, Bertrand, Pawlow, Jacoby, Bredig, Henry, Berry, Tryllat, Malleve, y otros investigadores.

de alimentación. Estos son además del C, H y O, aportados por el compuesto orgánico del substrato, en nuestro caso un hidrato de carbono, N, P, S, K, Na, Mg y Cl, que son suministrados al hongo en forma iónica simple o compuesta.

Nosotros hemos elegido como fuentes de dichos elementos los que componen el substrato tipo Czapek que consideramos para nuestras experiencias el más conveniente por su sencillez, modificado únicamente, en algunos casos el hidrato de carbono, *pectina*, en lugar de sacarosa.

Los *Microcomponentes* o *Microelementos*, también llamados *Oligoelementos*, tienen una función marcadamente minoritaria de tipo catalítico, entre ellos se han estudiado, por diversos autores, el Fe, Co, Mo, Zn y Mn.

Nosotros nos hemos limitado exclusivamente al estudio de la influencia del Mo apoyándonos en los trabajos de Steinberg (3), Jensen y Spencer (4) y Mulder (5), que se ocupan de la acción de dicho elemento sobre el metabolismo nitrogenado de plantas superiores y hongos, entre éstos el *Aspergillus niger*, aunque no sobre el *Aspergillus ochraceus*, en medios con nitratos como única fuente de nitrógeno, encontrando que dicho elemento es esencial para la activación de una enzima *nitratoreductasa*. Las concentraciones máximas, en molibdato sódico utilizadas por el último, es de 0,02 mgrs. por 100 c. c. de cultivo, no llegándose a estudiar los efectos de concentraciones superiores.

En estrecha relación con este grupo, consideramos a las ya mencionadas sustancias *reguladoras de crecimiento* o *Fitohormonas*, y a las que como el *naftaleno* y otros hidrocarburos aromáticos, si bien no se encuentran catalogados como tales, observamos, sin embargo, que presentan en dosis mínimas, una marcada influencia sobre el desarrollo del hongo.

En otras se ha reconocido una actividad mutante o simplemente productora de variaciones.

De este grupo complejo de sustancias orgánicas hemos elegido algunos representantes de cada tipo, con objeto de observar las diferencias de comportamiento de los mismos y poder en trabajos posteriores extenderlos a otros compuestos químicamente relacionados con ellos o de comportamiento análogo sobre otros organismos.

Así, dentro del grupo de las *fitohormonas artificiales* hemos elegido el *ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético* (abreviadamente 2,4-D) cuya actividad como regulador de crecimiento en plantas superiores es sobradamente conocida.

La influencia de estas sustancias sobre organismos vegetales inferiores ha sido estudiada poco ampliamente y con resultados contradictorios.

Así, Stevenson y Mitchell (6) encuentran que a concentraciones hasta del 0,08 % retarda el crecimiento de ciertas bacterias, pero no influye sobre la actividad metabólica y el desarrollo de hongos de los géneros *Fusarium* y *Penicillium* y Lewis y Hammer (7) tampoco observan inhibición sobre dichos hongos a concentraciones del 0,1 %. Por el contrario Guiscafre-Arrillaga (8), Richards (9) y Mani (10), sí observan disminución en la velocidad de crecimiento para algunos hongos filamentosos: *Penicillium digitatum* y *P. notatum*, *Fusarium dianthi*, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*, presentándose a concentraciones superiores al 1 por mil variadas deformaciones en el micelio.

Del grupo de sustancias en cierta relación química con los reguladores de crecimiento seleccionamos el naftaleno. Este hidrocarburo constituye el núcleo de importantes fitohormonas sintéticas como los ácidos α -naftil-acético y α -naftoxi-acético y sus derivados en el carboxilo.

Solamente ha sido investigada por Bolcato (11) la influencia de dicho hidrocarburo en el metabolismo de cepas del género *Aspergillus* sin especificar. Creemos que se trata del *A. niger*, ya que se estudia la producción de ácido cítrico. Actuando tanto en medio aéreo, como en el cultivo observa inhibición en la esporulación y una disminución en la relación ácido cítrico producido-sacarosa consumida.

Otra sustancia estudiada es el *acenafteno*, compuesto en el que se ha reconocido actividad mutante sobre organismos, por ejemplo en las larvas del «*Bombyx mori*» que produce cambios en color, anomalías morfológicas y puede llegar a inhibir por completo la emergencia de dichas larvas, como observaron Havas y Kahal (12). Ark (13) ha observado variaciones permanentes sobre algunas bacterias y por Gavadan y Brevion (14) alteraciones en el mecanismo fotosintético junto a inhibición de la carioquinesis en la *Helodea*. Murthy (15) y colaboradores, por una parte, y Bauch (16) por otra, observan también mutaciones y cambios de crecimiento sobre levaduras, formándose nuevas razas con mayores células y manteniéndose la variación en generaciones posteriores. Finalmente Ivanov y Makrinova (17) encuentran que la presencia de acenafteno inhibe la velocidad de crecimiento del *Aspergillus niger*, intensificándose la acidez del medio de cultivo, así como el rendimiento en ácido cítrico respecto de cultivos testigos, si bien el período de desarrollo es mayor, en el primer caso.

El *hidrato de cloral* y el *etil-uretano*, sustancias también seleccionadas en nuestro trabajo, lo han sido por su reconocida actividad mitoclásica. Sobre hongos no parecen haber sido utilizadas.

Finalmente nos hemos ocupado del efecto de la *p-benceno-sulfonamida*, apoyados en la referencia de un trabajo de Thomas y Chevais reco-

gida por Work y Work (18) en la que se indica la posibilidad de una modificación en plantas superiores y en la *Drosophila*, pero sin confirmación posterior.

Los resultados obtenidos por nosotros, detallados y discutidos en la parte experimental de este trabajo nos confirman la capacidad de todas estas sustancias para producir variaciones que se manifiestan, no solamente sobre la morfología y capacidad reproductiva de la especie que estudiamos, sino también, como es lógico, sobre su actividad metabólica en el caso de substratos hidrocarbonados en general, y en particular pecínicos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) RAPER, K. B. y THOM: *A Manual of Penicillia*, p. 64. Baltimore, 1949.
- (2) SANTOS RUIZ: *Bioquímica de los elementos*, p. 18. Monografías de Ciencias Modernas. C. S. I. C., 1946.
- (3) STEINBERG, R. A.: *J. Agr. Research*. 55 - 891 - (1937), citado en FOSTER, J. V.: *Chemical activities of Fungi*. Academic. Press. New York, 1949, p. 276.
- (4) JENSEN, H. L. y SPENCER, D.: *Proc. Linnæan Soc. N. S. Wales* 72 - 1 y 73 - (1947), citado en Foster.
- (5) MULDER, E. G.: *Rev. Plant and Soil* 1 - 94 - (1948).
- (6) STEVENSON, E. C. y MITCHELL, J. W.: *Science* 101 - 642 - (1945).
- (7) LEWIS, R. W. y HAMMER, CH. L.: *Michigan Agr. Expt. Sta. Quart. Bull.* 29-112-(1946) en C. A. (1947) - 1795.
- (8) GUISCAFRE-ARRILLAGA, J.: *Plant Disease Repr.* 32 - 248 - (1948), en C. A. (1948) - 5601.
- (9) RICHARDS, R. R.: *Botan. Gaz.* 110 - 523 - (1949), en C. A. (1949) - 6704.
- (10) MANI, P. y STRASZEWSKA, Z.: *Compt. rend. soc. biol.* 144 - 313 - (1950).
- (11) BOLGATO, V.: *Enzymologia* 12 - 356 - (1948).
- (12) HAVAS, L. J. y KAHAN, J.: *Nature* 161 - 570 - (1948).
- (13) ARK, P. A.: *J. Bact.* 51 - 699 - (1949), en WORK y WORK. *Quimioterapia*. Trad. V. Villar. Aguilar, Madrid, p. 289.
- (14) GAYANDA, P. y BREBION, G.: *Mém. services chim état.* 32 - 410 - (1945), en C. A. (1948) - 5087.
- (15) MURTHI, SUBRAMIAN y KRISHNA: *Proc. Indian Acad. Sci.* 30 B - 185 - (1949), en C. A. (1951) - 8083.
- (16) BAUCH, R.: *Wochschr. Braun.* 59 - 1 y 9 - (1941), en C. A. (1942) - 6573.
- (17) IVANOV, N. N. y MAKINOVNA, N. A.: *Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R.* 30 - 356 - (1941), en C. A. (1941) - 8004.
- (18) THOMAS, H. W. y CHEVAIS, S. S.: *Compt. rend. soc. biol.* 137 - 185 - (1943), en WORK, obra citada, p. 280.

III

PARTE EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PECTINÁSICA Y PECTÁSICA DEL *ASPERGILLUS OCHRACEUS* EN COMPARACIÓN CON LA DEL *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

Como hemos indicado en la iniciación de este trabajo, nos propusimos estudiar el comportamiento de dos especies micológicas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* sobre un substrato pectínico. En el trabajo de Waksman y Allen, a partir de *Aspergillus niger* y de dos especies de los géneros *Penicillium* y *Fusarium*, que no llegaron a caracterizar, dedujeron que existe una diferencia marcada de actividad en el comportamiento del *Aspergillus*, por una parte, y de los *Penicillium* y *Fusarium* por otra. Respecto del primero caracterizaron una intensa actividad vital desde la iniciación del cultivo, manifestada por el rápido consumo del ácido galacturónico liberado por hidrólisis de la cadena poligalacturónica que constituye la pectina; con relación a los dos hongos utilizados encuentran una hidrólisis muy activa en los días iniciales del desarrollo del cultivo, manifestada por un fuerte aumento en el poder reductor del medio ligadas simultáneamente a una menor actividad y desarrollo miceliar. A partir de dicho momento, alrededor de los siete días, se inicia una etapa en la que los ácidos sencillos producidos anteriormente son consumidos con rapidez, intensificándose el desarrollo del micelio.

Los citados investigadores se ocupan exclusivamente de la actividad pectinásica de los hongos (desdoblamiento hidrolítico de la cadena pectínica en moléculas de ácidos galacturónico), sin tomar en consideración

la posible acción pectásica (saponificación de los grupos carbometoxilados, con aparición de carboxilos libres y puesta en libertad de alcohol metílico).

Por nuestra parte, después de aislar y caracterizar las especies de hongos indicados, hemos intentado comprobar si los comportamientos frente al substrato pectínico presentaban una marcha paralela a la indicada por Waksman. Al mismo tiempo intentamos llegar a la diferenciación por caminos analíticos de las dos actividades: *Pectinásica* y *Pectásica*.

Para ello hemos utilizado como criterios:

1.º Actividad pectinásica o poligalacturonásica.

a) Variación en el poder reductor del medio de cultivo como consecuencia de la liberación de grupos aldehídos de los eslabones de ácido galacturónico bloqueados en la pectina inicial en enlaces glucosídicos.

b) Variación de la viscosidad de la disolución ligada a la longitud de cadenas de las macromoléculas lineales de pectina.

2.º Actividad pectásica o pectinestearásica.

a) Variación en el contenido de metoxilos de porciones de pectina reprecipitada de la disolución sometida a la actividad del hongo.

b) Variación de la acidez actual de la disolución, la que en principio debería aumentar como consecuencia de la liberación de grupos carboxílicos, inicialmente esterificados.

Técnica y resultados

1.º Cultivos sobre la disolución pectínica

Aislamos tras una serie de cultivos en medio Czapek-agar y consiguiente selección, dos especies perfectamente definidas: *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium chrysogenum*.

Sobre disoluciones asépticas de pectina a concentración del 2 % y a las que se han añadido como sustancias nutritivas inorgánicas las sales de la composición Czapek, realizamos las siembras de las especies indicadas, incubándose a la temperatura de 25° C.

2.º Poder reductor

Hemos determinado la variación en funciones aldehidos liberadas durante la actividad pectinásica del hongo, utilizando el reactivo Benedict. Las determinaciones han sido realizadas independientemente en las zonas superior e inferior del medio de cultivo; como preveíamos, encontramos un contenido siempre mayor en reductores en la segunda, ya que siendo homogénea la acción de la enzima, no lo será el consumo de



las sencillas moléculas liberadas por parte del hongo colocado exclusivamente en la superficie del medio. Referimos los reductores, como hacen Waksman y Allen, a glucosa, pero también incluimos los resultados calculados en galactosa, más próxima en su poder reductor al ácido galacturónico.

3.º Viscosidad

Hemos determinado la viscosidad específica de la disolución a lo largo del período de cultivo, utilizando un viscosímetro Ostwald y a la temperatura de 25°.

4.º Índice de metoxilo

Hemos determinado a lo largo del período de experiencia el índice de metoxilo de muestras de pectina separadas de la disolución, precipitándolas con etanol y siendo desecadas en vacío a 50-60 grados centígrados.

5.º Acidez actual de la disolución

Hemos seguido la variación en el pH de la disolución hasta valor prácticamente constante, por determinaciones potenciométricas con electrodo de calomelanos a la temperatura de 24 grados centígrados.

6.º Residuo

En todos los cultivos estudiados va apareciendo, simultáneamente a la demolición del substrato, un sedimento pardo oscuro, que llega a alcanzar el 5,77 % en el caso del *Aspergillus ochraceus* y el 3,9 % en el *Penicillium chrysogenum* de la pectina inicial.

Analizados estos residuos encontramos los siguientes resultados:

| | Índice de metoxilo | Lignina | Reductores calculados en galacturónico |
|------------------------------|--------------------|---------|--|
| <i>Aspergillus</i> | 1,6 % | 44,8 % | 13,1 % |
| <i>Penicillium</i> | 0,77 % | 39,1 % | 11,2 % |

Aun sin llegar a establecer un criterio exacto sobre la naturaleza del mismo, podemos adelantar nuestra opinión de que se trata de un complejo lignina-ácido poligalacturónico, muy resistente a la hidrólisis.



TABLAS

I

Valoraciones de reductores a consecuencia de la hidrólisis de la pectina por la acción enzimática del «*Aspergillus ochraceus*»

Factor Benedict: 5 cc. = 0,011 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado para 5 cc. de Benedict | Cantidad de reductores, grs por litro en glucosa | Cantidad de reductores, grs por litro en galactosa |
|----------|--|---|---|
| Siembra: | | Zona superficial | |
| 5 | 2,6 cc. | 4,23 | 5,06 |
| 9 | 2,4 cc. | 4,58 | 5,47 |
| 13 | 2,15 cc. | 5,11 | 6,11 |
| 17 | 3,4 cc. | 3,23 | 3,86 |
| 21 | 4,1 cc. | 2,68 | 3,20 |
| 29 | 5,2 cc. | 2,11 | 2,52 |
| Siembra: | | Zona inferior | |
| 5 | 2,2 cc. | 5 | 5,98 |
| 9 | 2,1 cc. | 5,23 | 6,25 |
| 13 | 2 cc. | 5,5 | 6,58 |
| 17 | 2,7 cc. | 4,07 | 4,87 |
| 21 | 3,8 cc. | 2,89 | 3,45 |
| 29 | 4,3 cc. | 2,55 | 3,05 |

2

Valoraciones de reductores a consecuencia de la hidrólisis de la pectina por la acción enzimática del «*Penicillium chrysogenum*»

Factor. Benedict: 5 cc. = 0,011 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado para 5 cc de Benedict | Cantidad de reductores, grs por litro en glucosa | Reductores, grs por litro en galactosa |
|----------------------------|---|--|--|
| Siembra : Zona superficial | | | |
| 5 | 2,9 cc. | 3,79 | 4,53 |
| 9 | 2,7 cc. | 4,07 | 4,87 |
| 13 | 2,1 cc. | 5,23 | 6,25 |
| 17 | 2,45 cc. | 4,48 | 5,36 |
| 21 | 3,10 cc. | 3,54 | 4,23 |
| 29 | 4,20 cc. | 2,61 | 3,12 |
| Siembra : Zona inferior | | | |
| 5 | 2,3 cc. | 4,78 | 5,71 |
| 9 | 2,2 cc. | 5 | 5,98 |
| 13 | 2 cc. | 5,5 | 6,58 |
| 17 | 2,3 cc. | 4,78 | 5,71 |
| 21 | 2,6 cc. | 4,23 | 5,06 |
| 29 | 3,4 cc. | 3,23 | 3,86 |

3

Viscosidad. Substrato del «*Aspergillus ochraceus*»

| Días | Tiempo de caída del líquido substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|---------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Inicial | 18,8 | 2,685714 | 1,685714 |
| 3 | 12,5 | 1,785714 | 0,785714 |
| 4 | 12,5 | 1,785714 | 0,785714 |
| 5 | 10,2 | 1,457142 | 0,457142 |
| 6 | 10,2 | 1,457142 | 0,457142 |
| 7 | 10,2 | 1,457142 | 0,457142 |
| 8 | 10,2 | 1,457142 | 0,457142 |
| 9 | 8,3 | 1,185714 | 0,185714 |
| 10 | 8,1 | 1,157142 | 0,157142 |
| 11 | 8,1 | 1,157142 | 0,157142 |
| 12 | 8,1 | 1,157142 | 0,157142 |

Tiempo de caída del agua: 7 "

4

Viscosidad. Substrato de «*Penicillium chrysogenum*»

| Día | Tiempo de caída del líquido substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|---------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Inicial | 18,8 | 2,685714 | 1,685714 |
| 3 | 12,5 | 1,785714 | 0,785714 |
| 4 | 11,3 | 1,614285 | 0,614285 |
| 5 | 9,2 | 1,314285 | 0,314285 |
| 6 | 8 | 1,142857 | 0,142857 |
| 7 | 8 | 1,142857 | 0,142857 |
| 8 | 8 | 1,142857 | 0,142857 |
| 9 | 8 | 1,142857 | 0,142857 |
| 10 | 7,8 | 1,114285 | 0,114285 |
| 11 | 7,8 | 1,114285 | 0,114285 |
| 12 | 7,6 | 1,085714 | 0,085714 |

Tiempo de caída del agua: 7 "

5

Índice de metoxilo de las muestras tomadas del substrato pectínico líquido correspondiente al «*Aspergillus ochraceus*», precipitadas con etanol y desecadas al 50-60°

| Días | Cantidad de pectina empleada en cada valoración | Hiosulfato gastado 0,05 N. Factor=1,0264 | Índice de metoxilo en tanto por ciento |
|-----------------------------|---|--|--|
| Inicial | 0,0354 grs | 5,4 cc. | 4,03900 de OCH ₃ |
| 3 | 0,0228 grs | 2,6 cc. | 3,01977 » » |
| 4 | 0,0311 grs | 3,3 cc. | 2,80989 » » |
| 5 | 0,0336 grs | 3,4 cc. | 2,67963 » » |
| 6 | 0,0302 grs | 2,9 cc. | 2,54203 » » |
| 7 | 0,0318 grs | 1,4 cc. | 1,16583 » » |
| Sedimento | 0,0262 grs | 2,1 cc. | 2,08474 » » |
| Sedimento lavado y desecado | 0,0698 grs | 4,6 cc. | 1,60190 » » |

6

Índice de metoxilo de las muestras tomadas del substrato pectínico líquido correspondiente al «*Penicillium chrysogenum*» precipitadas con etanol y desecadas a 50 - 60°

| Días | Cantidad de pectina empleada en la valoración | Tiosulfato gastado 0,05 N. Factor=1,0264 | Índice de metoxilo en tanto por ciento |
|-----------------------------|---|---|--|
| Inicial | 0,0354 grs | 5,4 cc | 4,03900 de OCH ₃ |
| 3 | 0,0224 grs | 2,4 cc. | 2,83726 » » |
| 4 | 0,0308 grs | 3,1 cc. | 2,66530 » » |
| 5 | 0,0296 grs | 2,5 cc. | 2,23658 » » |
| 6 | 0,0321 grs | 1,8 cc. | 1,48492 » » |
| 7 | 0,0311 grs | 1,1 cc. | 0,93663 » » |
| Sedimento | 0,0502 grs | 1,5 cc. | 0,78172 » » |
| Sedimento lavado y desecado | 0,0404 grs | 1,2 cc. | 0,77171 » » |

7

Determinaciones potenciométricas del pH con electrodo de calomelanos efectuadas en el substrato del «*Aspergillus ochraceus*» a la temperatura de 24°

| Días | Milivoltios | pH |
|---------|-------------|------|
| Inicial | 189 | 4,50 |
| 3 | 146 | 5,23 |
| 4 | 98 | 6,05 |
| 5 | 78 | 6,38 |
| 6 | 66 | 6,59 |
| 7 | 59 | 6,72 |
| 8 | 54 | 6,80 |
| 9 | 54 | 6,80 |
| 10 | 45 | 6,94 |
| 11 | 44 | 6,96 |
| 12 | 44 | 6,96 |

Determinaciones potenciométricas del pH con electrodo de calomelanos efectuadas en el substrato del «*Penicillium chrysogenum*» a la temperatura de 24° C.

| Días | Milivoltios | pH |
|---------|-------------|------|
| Inicial | 189 | 4,50 |
| 3 | 186 | 4,55 |
| 4 | 182 | 4,61 |
| 5 | 110 | 5,84 |
| 6 | 70 | 6,52 |
| 7 | 66 | 6,59 |
| 8 | 70 | 6,52 |
| 9 | 66 | 6,59 |
| 10 | 50 | 6,86 |
| 11 | 43 | 6,99 |
| 12 | 35 | 7,11 |

Discusión de los resultados y conclusiones

De la comparación entre los valores obtenidos para el contenido en reductores de los líquidos de cultivo, se deduce una rápida demolición de las cadenas poligalacturónicas, que en los dos hongos estudiados alcanza el máximo en los mismos períodos de desarrollo, alrededor de los trece días; en ellos se llega a un contenido en reductores muy próximo al correspondiente a la hidrólisis completa. A partir de este momento, que parece corresponder con el de la actividad reproductora, se inicia una disminución que marcha paralelamente en los dos hongos estudiados, consecuencia de la intensificación en la actividad vital del hongo y de la carencia de pectinas sin desdoblar. Este resultado no coincide con el Waksman, sobre todo en lo que respecta al cultivo del *Aspergillus ochraceus*.

La cifra de reductores no permite llegar, por otra parte, a una conclusión definitiva sobre la actividad pectinásica, ya que los valores obtenidos se encuentran perturbados por la metabolización de las moléculas sencillas liberadas en el ciclo vital del hongo.

Por el contrario, las medidas de viscosidad permiten deducir comparativamente la diferencia entre las actividades pectinásicas de los hongos estudiados, ya que las moléculas de ácido galacturónico o las constituidas por un pequeño número de eslabones del mismo no influyen prácticamente en la viscosidad de la disolución. Encontramos así, que si bien

en los períodos iniciales del desarrollo ambas especies de hongos (tres días), se comportan análogamente a partir de dicho momento es muy superior la disminución de la viscosidad en el substrato del *Penicillium chrysogenum*, llegándose a un valor casi idéntico al del agua en el momento en que también se obtiene la máxima cifra de reductores.

La actividad pectásica, deducida de las variaciones de los índices de metoxilo, no parece ser muy distinta en los hongos estudiados, si acaso un poco mayor en el *Penicillium*. Por otra parte, nos encontramos que se llega a un índice de metoxilo muy pequeño más rápidamente que a la hidrólisis prácticamente completa, lo que lleva a considerar superior la acción pectásica a la pectinásica en las especies estudiadas.

Por último, de las determinaciones del pH a lo largo del cultivo, no podemos sacar ninguna conclusión, ya que en contra de lo esperado, se ha producido un aumento de basicidad del medio, sin que el pH haya disminuído en ningún momento, como correspondería a la liberación de carboxilos por la saponificación de los grupos $-\text{COO.CH}_3$. Esta anomalía creemos que es explicable como consecuencia de la elaboración mucho más intensa de productos residuales de carácter básico en el metabolismo del hongo. La utilización de este criterio para apreciar la actividad pectásica no es válida con organismos *in vivo*.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PECTINASAS AISLADAS DE LOS HONGOS ASPERGILLUS OCHRACEUS Y PENICILLIUM CHRYSOGENUM

Para conseguir un criterio más concreto y correcto sobre las actividades pectinásicas de los hongos citados nos ha parecido esencial obtener las enzimas correspondientes segregadas por ellos y determinar su acción sobre la pectina.

De esta manera la acción interferente del metabolismo del organismo queda eliminada, así como la posible formación de otras sustancias, como *penicilina*, *ácido glucónico*, *manita* y los pigmentos *ocracina* y *crisogenina*, por uno u otro hongo.

Por otra parte, en la acción directa del hongo actúan simultáneamente la *pectinasa* y la *pectasa*, por ello parece indicado el aislamiento de dichas enzimas y el estudio de sus actividades por separado.

Técnicas y resultados

1.º *Pectina*. Como consecuencia del trabajo de Jensen y Mac Donnell (1), en el que establecen la necesidad de la acción simultánea de las pectasa y pectinasa, para que esta última actúe sobre la pectina, ya que

observan que no se produce hidrólisis de los enlaces glucosídicos entre los eslabones de ácido galacturónico si se encuentran total o intensamente esterificados en el carboxilo, hemos elegido una pectina de bajo metoxilo, que por ello podrá responder a la actividad pectinásica, permitiéndonos comprobar simultáneamente la exclusión de la acción estearasa por eliminación de la pectasa.

2.º *Obtención de la enzima.* Aisladas las dos especies perfectamente definidas: *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium chrysogenum*, sembramos sobre disoluciones asépticas de pectina a concentración del 2 % y a la que añadimos ácido tartárico al uno por mil y sales inorgánicas, principalmente nitrato amónico como generador de nitrógeno.

A pesar de que Waksman y Allen consideran preferible el cultivo sobre substrato sólido humedecido con líquido nutritivo, al realizado directamente sobre este último, no encontramos ningún inconveniente en el segundo caso siempre que añadamos inicialmente al líquido un uno por mil de ácido tartárico, condiciones en las que observamos un claro aumento en el rendimiento de enzima.

Procuramos gran superficie para facilitar mayor área de las colonias y poca profundidad del líquido substrato, consiguiendo de esta manera una rápida hidrólisis total de la pectina, la clarificación del líquido y evitando cultivo prolongado (entre el quinto y el sexto día), ya que la actividad de la enzima disminuye, así como el rendimiento, después de un ulterior crecimiento del hongo.

Aislamos la enzima siguiendo en principio la técnica de Waksman y Allen, para lo cual, al final del período de incubación, los líquidos substratos se filtraron. Del filtrado se precipitó la enzima con dos volúmenes de alcohol de 95 %. La enzima precipitada se lavó con acetona y se secó al vacío sobre ácido sulfúrico, pero el material obtenido siguiendo dicho procedimiento presenta un color intenso, posiblemente consecuencia de la retención de pigmentos, se redisolvió en agua y precipitó con alcohol cuatro veces hasta conseguir un polvo totalmente decolorado.

Para observar la influencia de la concentración de enzima utilizamos disoluciones de igual concentración en pectina (2 %), frente a las pectinasas de ambos orígenes al 0,075 % y 0,125 %.

Las disoluciones se mantuvieron a 40° C. y periódicamente determinamos los criterios antes dichos.

En el transcurso de este trabajo hemos utilizado tres *pectinas* diferentes (tipo técnico manzana), con características químicas particulares, que resumimos a continuación:

Pectina n.º 1

| | |
|---|---------|
| Cenizas | 11,3 % |
| Indice de metoxilo | 4,04 % |
| Reductores iniciales. | 3,75 % |
| Reductores por hidrólisis prolongada (en glucosa) | 31,40 % |
| Viscosidad específica al 2 % | 0,686 |

Pectina n.º 2

| | |
|---|---------|
| Cenizas | 15,9 % |
| Indice de metoxilo | 2,6 % |
| Reductores iniciales. | 27,56 % |
| Reductores por hidrólisis prolongada (en glucosa) | 80,77 % |
| Viscosidad específica al 2 % | 0,433 |

Pectina n.º 3

| | |
|---|---------|
| Cenizas | 13,07 % |
| Indice de metoxilo | 3,14 % |
| Reductores iniciales. | 8,44 % |
| Reductores por hidrólisis prolongada (en glucosa) | 59,08 % |
| Viscosidad específica al 2 % | 5,977 |

12

Valoraciones de reductores a consecuencia de la hidrólisis de la pectina por la acción enzimática de la pectinasa del «Aspergillus ochraceus»

Concentración de enzima: 0,075 %

| Horas | Disolución pectina-enzima gastada para 10 cc. Benedict = 0,034 grs de glucosa | % de reductores expresados en glucosa |
|-------|---|---------------------------------------|
| 0 | 5,7 | 0,596 |
| 12 | 3,8 | 0,894 |
| 24 | 3,4 | 1 |
| 36 | 3,15 | 1,079 |
| 48 | 3,1 | 1,096 |
| 60 | 3 | 1,133 |
| 72 | 2,9 | 1,172 |
| 84 | 2,9 | 1,172 |
| 96 | 2,9 | 1,172 |

13

Valoraciones de reductores a consecuencia de la hidrólisis de la pectina por la acción enzimática de la pectinasa del «*Penicillium chrysogenum*»

Concentración de enzima: 0,075 %

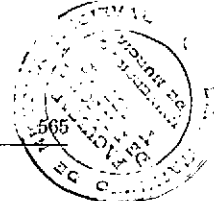
| Horas | Disolución pectina-enzima gastada para 10 cc. Benedict = 0,034 grs de glucosa | % de reductores expresados en glucosa |
|-------|---|---------------------------------------|
| 0 | 5,7 | 0,596 |
| 12 | 4,8 | 0,708 |
| 24 | 4,3 | 0,790 |
| 36 | 3,9 | 0,871 |
| 48 | 3,7 | 0,918 |
| 60 | 3,65 | 0,931 |
| 72 | 3,6 | 0,944 |
| 84 | 3,4 | 1 |
| 96 | 3,2 | 1,062 |
| 108 | 3 | 1,133 |
| 120 | 3 | 1,138 |

14

Valoraciones de reductores a consecuencia de la hidrólisis de la pectina por la acción enzimática de la pectinasa del «*Aspergillus ochraceus*»

Concentración de enzima: 0,125 %

| Horas | Disolución pectina-enzima gastada para 10 cc. Benedict = 0,034 grs de glucosa | % de reductores expresados en glucosa |
|-------|---|---------------------------------------|
| 0 | 5,7 | 0,596 |
| 12 | 3,4 | 1 |
| 24 | 3 | 1,133 |
| 36 | 3 | 1,133 |
| 48 | 3 | 1,133 |
| 60 | 3 | 1,133 |



15

Valoraciones de reductores a consecuencia de la hidrólisis de la pectina por la acción enzimática de la pectinasa del «*Penicillium chrysogenum*»

Concentración de enzima: 0,125 %

| Horas | Disolución pectina-enzima gastada para 10 cc. Benedict = 0,034 grs de glucosa | % de reductores expresados en glucosa |
|-------|---|---------------------------------------|
| 0 | 5,7 | 0,596 |
| 12 | 4,4 | 0,772 |
| 24 | 3,7 | 0,918 |
| 36 | 3,3 | 1,030 |
| 48 | 3 | 1,133 |
| 60 | 3 | 1,133 |
| 72 | 3 | 1,133 |

16

Viscosidad. Pectinasa del «*Aspergillus ochraceus*»

Concentración de enzima: 0,075 %

| Horas | Tiempo de caída pectina - enzima | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|
| 0 | 7,8" | 1,733 | 0,733 |
| 12 | 6,2" | 1,377 | 0,377 |
| 24 | 5,3" | 1,177 | 0,177 |
| 36 | 5,1" | 1,133 | 0,133 |
| 48 | 5" | 1,111 | 0,111 |
| 60 | 4,9" | 1,088 | 0,088 |
| 72 | 4,7" | 1,044 | 0,044 |
| 84 | 4,5" | 1 | 0 |
| 96 | 4,5" | 1 | 0 |
| 108 | 4,5" | 1 | 0 |

Tiempo de caída del agua = 4,5"



17

Viscosidad. Pectinasa del «*Penicillium chrysogenum*»

Concentración de enzima: 0,075 %

| Horas | Tiempo de caída pectina - enzima | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 7,8" | 1,733 | 0,733 |
| 12 | 6,3" | 1,400 | 0,400 |
| 24 | 5,7" | 1,266 | 0,266 |
| 36 | 5,6" | 1,244 | 0,244 |
| 48 | 5,2" | 1,155 | 0,155 |
| 60 | 5,1" | 1,133 | 0,133 |
| 72 | 5" | 1,111 | 0,111 |
| 84 | 4,8" | 1,066 | 0,066 |
| 96 | 4,7" | 1,044 | 0,044 |
| 108 | 4,6" | 1,022 | 0,022 |
| 120 | 4,5" | 1 | 0 |

Tiempo de caída del agua = 4,5"

18

Viscosidad. Pectinasa del «*Aspergillus ochraceus*»

Concentración de enzima: 0,125 %

| Horas | Tiempo de caída pectina - enzima | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 7,8" | 1,733 | 0,733 |
| 12 | 5,8" | 1,288 | 0,288 |
| 24 | 5" | 1,111 | 0,111 |
| 36 | 4,5" | 1 | 0 |
| 48 | 4,5" | 1 | 0 |
| 60 | 4,5" | 1 | 0 |

Tiempo de caída del agua: 4,5"

19

Viscosidad. Pectinasa del «*Penicillium chrysogenum*»

Concentración de enzima 0,125 %

| Horas | Tiempo de caída pectina - enzima | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 7,8" | 1,733 | 0,733 |
| 12 | 6,2" | 1,377 | 0,377 |
| 24 | 5,4" | 1,200 | 0,200 |
| 36 | 5" | 1,111 | 0,111 |
| 60 | 4,5" | 1 | 0 |
| 72 | 4,5" | 1 | 0 |
| 84 | 4,5" | 1 | 0 |

Tiempo de caída del agua: 4,5"

20

pH de la disolución pectina-enzima. Pectinasa del «*Aspergillus ochraceus*»

Concentración de enzima: 0,075 %

| Horas | Milivoltios de la disolución pectina-enzima | pH |
|-------|--|------|
| 0 | 219 | 3,78 |
| 12 | 218 | 3,75 |
| 24 | 216 | 3,72 |
| 48 | 215 | 3,70 |
| 60 | 214 | 3,68 |
| 72 | 211 | 3,61 |
| 84 | 211 | 3,61 |
| 96 | 211 | 3,61 |

2 1

pH de la disolución pectina-enzima
Pectinasa del «*Penicillium chrysogenum*»

Concentración de enzima: 0,075 %

| Horas | Milivoltios de la disolución pectina-enzima | pH |
|-------|--|------|
| 0 | 219 | 3,78 |
| 12 | 218 | 3,75 |
| 24 | 217 | 3,73 |
| 36 | 216 | 3,72 |
| 48 | 215 | 3,70 |
| 60 | 215 | 3,70 |
| 72 | 214 | 3,68 |
| 84 | 214 | 3,68 |
| 96 | 213 | 3,65 |
| 108 | 211 | 3,61 |
| 120 | 211 | 3,61 |

2 2

pH de la disolución pectina-enzima. Pectinasa del «*Aspergillus ochraceus*»

Concentración de enzima: 0,125 %

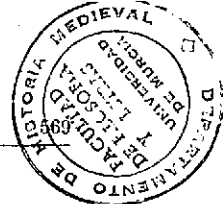
| Horas | Milivoltios de la disolución pectina-enzima | pH |
|-------|--|------|
| 0 | 231 | 4,10 |
| 12 | 229 | 3,96 |
| 24 | 227 | 3,92 |
| 36 | 226 | 3,90 |
| 48 | 223 | 3,85 |
| 60 | 218 | 3,75 |
| 72 | 218 | 3,75 |

2 3

pH de la disolución pectina-enzima
Pectinasa del «*Penicillium chrysogenum*»

Concentración de enzima: 0,125 %

| Horas | Milivoltios de la disolución pectina-enzima | pH |
|-------|--|------|
| 0 | 321 | 4,1 |
| 12 | 230 | 4 |
| 24 | 229 | 3,96 |
| 36 | 227 | 3,92 |
| 48 | 225 | 3,89 |
| 60 | 221 | 3,81 |
| 72 | 221 | 3,81 |



Conclusiones

Se observa una clara diferencia cuantitativa en la actividad de ambos preparados pectinásicos, mayor en el procedente del *Aspergillus ochraceus* que en el del *Penicillium chrysogenum*. Este resultado es opuesto al obtenido por nosotros con cultivos directos de los mismos hongos. Al comparar las actividades del hongo y enzima respectivo, resulta extraordinariamente superior la de la segunda, lo que nos lleva a pensar en una perturbación (inhibición) de la acción de la enzima, consecuencia de la actividad metabólica del organismo. También debemos deducir de dicho resultado que si bien el *Penicillium chrysogenum* elabora una mayor proporción de enzima que el *Aspergillus ochraceus*, la de éste parece ser de mayor actividad.

A pesar de seguir las instrucciones de Waksman y Allen en el aislamiento y purificación de la pectinasa, ésta no parece quedar totalmente purificada de pectasa, aunque la proporción que contendrá debe ser relativamente pequeña, como se deduce de las variaciones también pequeñas, pero definidas del pH de la disolución. Por ello, parece indicado un estudio más detallado de la técnica de purificación, así como el intento de la cristalización y estudio químico de la enzima, hasta ahora según nuestras noticias, no conseguido.



INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS MINERALES SOBRE EL METABOLISMO
PECTINICO DEL ASPERGILLUS OCHRACEUS

Para estudiar la influencia de las sales inorgánicas componentes del medio nutritivo sobre el metabolismo del *Aspergillus ochraceus* desarrollado en presencia de pectinas, hemos partido del substrato tipo «Czapek» de composición mineral:

| | |
|----------------------------|-------------|
| Nitrato sódico | 3 grs/litro |
| Fosfato potásico | 1 » » |
| Sulfato magnésico. | 0,5 » » |
| Cloruro potásico | 0,5 » » |

tomando como fuente hidrocarbonada en lugar de sacarosa, pectina a la concentración de 20 gramos por litro. Además, hemos añadido 0,5 grs de ácido tartárico para conseguir un pH más adecuado a la acción pectinásica que el más alto del Czapek normal.

Sembramos sobre porciones de 30 c.c. de este substrato y en condiciones totalmente asépticas una suspensión de esporas de nuestras cepas de 10 días de incubación, teniendo la precaución de sembrar aproximadamente el mismo número de esporas en cada cápsula. De ellas elegimos al final del período de germinación las 10 de aspecto más uniforme. Las cápsulas se mantuvieron durante el ciclo analítico a la temperatura de 25° C.

Características de las cápsulas Petri

| | |
|----------------------------------|----------------------|
| Diámetro de la cápsula | 7 cm |
| Altura. | 1,8 cm |
| Superficie | 38,5 cm ² |
| Volumen | 69 c. c. |

Determinamos previamente viscosidad y reductores en el substrato, repitiendo estas determinaciones cada 24 horas sobre el líquido contenido en cada una de dos de las cápsulas, para lo cual decantamos por aspiración el líquido y lavamos el micelio con agua destilada que nos completa el volumen inicial de 30 c. c., compensando el agua retenida en el micelio.

Una vez obtenido los valores correspondientes al *substrato tipo*, procedimos de manera idéntica en varias series, prescindiendo ordenadamente de cada una de las sales de dicho substrato.

Simultánea e independientemente a las determinaciones del contenido en reductores y de la viscosidad, hemos apreciado el desarrollo del hongo por el *método micrométrico*, midiendo la velocidad en el desarrollo del tubo germinativo del hongo estudiado.

Hemos efectuado estas medidas en cultivos sobre porta excavado con los mismos substratos que los realizados en cápsula Petri. Para ello hemos tomado porta-objetos con una sola excavación, bien limpios y esterilizados, pasándolos sobre la llama del mechero repetidas veces; los dejamos enfriar con la excavación hacia abajo, apoyando uno de los extremos sobre una varilla. Entre tanto tomamós con pinzas, por uno de sus ángulos, cubre-objetos bien limpios y conservados en alcohol, flameándolos con las debidas precauciones para evitar su rotura o deformación. Depositamos una gota del líquido substrato en el centro de la cara inferior del cubre, sirviéndonos para ello, bien de una pipeta Pasteur, esterilizada, afilada en un extremo y doblada en ángulo agudo muy abierto, próximo al ángulo recto, en el punto de la porción gruesa con la afilada, bien de una varilla doblada y esterilizada.

Hemos procurado que la gota para cada cultivo fuese de magnitud mediana, ni tan pequeña que pueda fácilmente evaporarse, ni tan grande que llegue a tocar los bordes de la excavación. Tomamos con hilo de platino aséptico una pequeña porción de esporas. Sembramos las esporas aisladas, evitando que entren en contacto, lo que dificultaría la tarea de nuestras observaciones. Depositamos el material en la gota pendiente, empleando siempre las precauciones de asepsia habituales. Untando previamente los bordes del cubre-objetos con vaselina esterilizada, lo depositamos sobre el porta excavado de tal forma que la gota pendiente quede en el centro de la cavidad. Para adherirlo mediante la vaselina presionamos suavemente sobre la cara superior del cubre-objetos. Siempre hemos hecho varias preparaciones con el mismo material por los fracasos que pudiesen ocurrir, sea por desecación o por extensión de la gota. Las preparaciones las colocamos en cámara húmeda.

Hemos seguido periódicamente el desarrollo progresivo, midiendo microscópicamente con objetivo seco y ocular micrométrico.

Damos el valor medio (media aritmética), en micras, de las longitudes de los tubos germinativos (unos cien), medidos en cada observación.

24

SUBSTRATO TIPO

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|----------|
| 24 | 261,28 |
| 48 | 1,339,52 |
| 72 | 2,156,48 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 41 | 4,7 c.c. | 0,209 |
| 65 | 4,9 c.c. | 0,201 |
| 89 | 7,7 c.c. | 0,128 |
| 113 | 7,1 c.c. | 0,138 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 41 | 7" | 1,4 | 0,4 |
| 65 | 5,5" | 1,14 | 0,14 |
| 89 | 4,9" | 1,02 | 0,02 |
| 113 | 4,8" | 1 | 0,00 |

25

SUBSTRATO SIN NITRATO SODICO

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|--------|
| 24 | 79,85 |
| 48 | 196,88 |
| 72 | 378,52 |
| 96 | 513,96 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 24 | 6,4 c.c. | 0,157 |
| 41 | 6,8 c.c. | 0,146 |
| 65 | 6 c.c. | 0,171 |
| 89 | 5,2 c.c. | 0,206 |
| 113 | 5,3 c.c. | 0,200 |
| 137 | 5,8 c.c. | 0,179 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 41 | 18" | 3,7 | 2,7 |
| 65 | 17,6 | 3,6 | 2,7 |
| 89 | 13,8 | 2,7 | 1,7 |
| 113 | 8,4 | 1,7 | 0,7 |
| 137 | 9,6 | 2 | 1 |

26

SUBSTRATO SIN FOSFATO POTASICO

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|---------|
| 24 | 276 |
| 48 | 682,64 |
| 96 | 1748,00 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.e. | 0,138 |
| 24 | 7,2 c.e. | 0,126 |
| 65 | 6,2 c.e. | 0,190 |
| 89 | 5,1 c.e. | 0,315 |
| 113 | 4,6 c.e. | 0,412 |
| 137 | 4,6 c.e. | 0,412 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 65 | 13" | 2,7 | 1,7 |
| 89 | 5,8" | 1,2 | 0,2 |
| 113 | 5,4" | 1,2 | 0,1 |

27

SUBSTRATO SIN SULFATO MAGNESICO

MÉTODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|---------|
| 24 | 224,48 |
| 48 | 750,72 |
| 72 | 1426,00 |
| 96 | 1667,04 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 24 | 6,9 c.c. | 0,150 |
| 41 | 6,1 c.c. | 0,211 |
| 65 | 7,4 c.c. | 0,122 |
| 89 | 7,4 c.c. | 0,122 |
| 113 | 7,6 c.c. | 0,113 |
| 137 | 8,6 c.c. | 0,074 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 65 | 7,2" | 1,5 | 0,5 |
| 89 | 6" | 1,2 | 0,2 |
| 113 | 5,8" | 1,2 | 0,2 |

28

SUBSTRATO SIN CLORURO POTASICO

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|---------|
| 24 | 103,04 |
| 48 | 504,16 |
| 72 | 519,44 |
| 120 | 1332,16 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 24 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 48 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 72 | 6,9 c.c. | 0,151 |
| 96 | 7,8 c.c. | 0,122 |
| 120 | 8,4 c.c. | 0,031 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 72 | 12" | 2,5 | 1,5 |
| 96 | 6" | 1,2 | 0,2 |
| 120 | 5,3" | 1,1 | 0,1 |

Discusión de los resultados y conclusiones

De la comparación del comportamiento frente a los tres criterios se deduce:

1.º Intensa disminución del metabolismo de la *pectina* en ausencia de *nitrate sódico*, retardándose no sólo el desarrollo del hongo, sino también la acción *pectinásica* que no llega a ser completa, quedando, por lo tanto, substrato sin metabolizar.

2.º La ausencia del *fosfato* sólo influye en la actividad *pectinásica* desde el punto de vista cualitativo (velocidad del proceso), pero, por el contrario, y como es de prever al recordar la intervención del ión PO_4^{3-} en el metabolismo de los monosacáridos, el ácido galacturónico que queda libre es metabolizado muy lentamente y con gran dificultad.

3.º La ausencia del *cloruro potásico* determina una hidrólisis más lenta de la molécula pectínica ligada con utilización simultánea de las moléculas sencillas puestas en libertad; y a partir del momento de plena esporulación, el hongo compensa la ausencia de dicho ión con un metabolismo prácticamente íntegro del substrato carbonado.

4.º También en ausencia de sulfato magnésico se observa una utilización más rápida de las sencillas moléculas de ácido galacturónico liberadas. Respecto del desarrollo del hongo, la influencia inhibitoria es menor que en el caso de la ausencia de los otros componentes del substrato tipo.

INFLUENCIA DEL MOLIBDENO COMO OLIGOELEMENTO Y DE SUBSTANCIAS DE
CARÁCTER FITOHORMONAL SOBRE EL METABOLISMO PECTÍNICO DEL
ASPERGILLUS OCHRACEUS

La influencia del *molibdeno* la hemos observado adicionándolo en forma de *molibdato sódico* a concentraciones de 0,05, 0,01, 0,00125 gramos por litro al medio tipo «Czapek» anteriormente indicado.

Los criterios utilizados han sido los mismos que los señalados al estudiar los *macrocomponentes* del sustrato.

Respecto de los *reguladores de crecimiento* hemos estudiado, por las razones a que nos referimos en la parte teórica, el efecto del *ácido 2-4-dicloro-fenoxiacético* (2-4-D), *acenafteno* y *naftaleno*. Para ello, teniendo en cuenta que la presencia de estas sustancias en el medio de cultivo pueden venir alteradas por su metabolización, principalmente de carácter oxidativo por el organismo, nos ha parecido preferible hacer actuar sobre el hongo vapores de los compuestos orgánicos mencionados. Para ello hemos realizado las experiencias colocando en la parte superior interna de la cápsula Petri unos miligramos de la sustancia correspondiente adheridas por medio de unas gotas de vaselina aséptica.

El sustrato ha sido el tipo «Czapek» y como criterios se han utilizado los mismos que en el caso del molibdeno.

Además hemos observado en el caso del *acenafteno* aberraciones en los aparatos conidiales del hongo.

El 2-4-D utilizado fué obtenido por nosotros al no disponer de producto comercial. Su preparación, realizada en colaboración con J. Sandoval, comprendió las siguientes fases.

1.º Preparación del 2-4 diclorofenol y separación de los isómeros que le acompañan.

2.º Condensación del anterior con el bromoacetato de etilo.

3.º Saponificación del éster formado.

4.º Obtención del ácido diclorofenoxiacético.

1.º *Preparación del 2-4 diclorofenol.* Se partió de 100 gramos de fenol cristalizado que se disolvieron en 300 c. c. de acético glacial. A esta disolución acética calentada en baño maría se le pasó corriente de cloro hasta que su aumento en peso fué de 65 gramos. En total la cantidad de cloro pasada fué inferior a la teóricamente necesaria para formar el derivado diclorado, haciéndose así para evitar la formación del tricloro-

rado más difícil de separar que el monoclorado que podía formarse en este caso.

Se obtuvieron 100 gramos de producto clorado consistente en 2-4 diclorofenol, cuyo rendimiento fué de un 60 %.

Este producto se separa por destilación fraccionada del acético, recojiéndose los 100 gramos en la fracción que destiló entre los 205-215° C. para separar el 2-4 diclorofenol de una pequeña parte de orto y para clorofenoles.

2.º *Condensación del 2-4 diclorofenol con el bromoacetato de etilo.* Para obtener el éster mixto objeto de nuestro trabajo se nos ofrecían varios caminos:

a) Condensar el derivado clorado con ácido monocloroacético, producto más corriente; pero éste tenía el inconveniente de que el ácido monocloroacético descomponía el fenolato formado previamente y la condensación no se efectuaba.

b) Emplear el monocloroacetato sódico como condensante, pero entonces se tropezaba con la dificultad de la insolubilidad de éste en disolvente orgánico, medio en que debía efectuarse la condensación.

c) El camino seguido por nosotros fué emplear un éster del ácido monocloro o monobromoacético que evitaría los dos inconvenientes arriba citados.

Práctica. Se añadieron 20 gramos de 2-4 clorofenol a una disolución de alcoholato sódico (3 gramos de sodio en 35 c. c. de etanol absoluto), agitando hasta que todo había reaccionado formándose el fenolato correspondiente. Agregamos seguidamente 20 gramos de bromoacetato de etilo. Hubo entonces reacción algo violenta, que comprobamos por el aumento de temperatura de la mezcla. Calentamos seguidamente a reflujo en baño maría durante tres cuarto de hora. Comprobamos el final de la reacción por haber desaparecido la reacción alcalina que poseía el líquido antes de calentar.

Al dejar enfriar se solidificó toda la masa. Evaporamos el exceso de alcohol al baño maría. El sólido blanco residual se extrajo con éter, obteniéndose por evaporación de éste un líquido incoloro de t. b. 200-220° C.

3.º *Saponificación del éster.* El líquido incoloro obtenido tenía una reacción algo ácida, quizá por haberse hidrolizado en parte debido al calentamiento en ambiente húmedo. Por ello optamos por saponificarle todo para transformarlo en la sal sódica y de aquí obtener el ácido libre.

Para ello tratamos el líquido por una disolución de 7 gramos de hidróxido sódico en 40 c. c. de agua a ebullición con reflujo durante una hora.

El producto resultante lo añadimos a 100 c. c. de agua, disolviéndose completamente.

4.º *Obtención propia del ácido 2-4 diclorofenoxiacético.* La disolución anterior contenía la sal sódica del ácido disuelta. Para obtener el ácido libre añadimos ácido sulfúrico 2N hasta reacción francamente ácida. Se separó entonces en la parte inferior un líquido oleoso de color levemente amarillento. Por decantación separamos este líquido que por enfriamiento posterior se solidificó en parte. Filtramos a la trompa los cristales del producto.

El único dato que poseíamos de dicho ácido era su temp. de fusión encontrada en las tablas del catálogo de la casa americana *Eastman Kodak Company*, que era t. f. = 131 - 136° C.

El obtenido por nosotros fué de t. f. = 133° C.

Como obtuvimos 15 gramos de producto el rendimiento fué del 51 % del teórico.

El *acenafteno* de origen Poulenc y el *naftaleno* comercial resublimado por nosotros fueron los empleados en las experiencias.

29

SUBSTRATO TIPO Y MOLIBDATO SODICO 0,01/1000

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|---------|
| 24 | 60,52 |
| 48 | 835,36 |
| 72 | 1644,96 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido sustrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|--|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 41 | 8 c.c. | 0,110 |
| 65 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 89 | 8,1 c.c. | 0,106 |
| 113 | 10,0 c.c. | 0,005 |
| 137 | 11,5 c.c. | 0,000 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída sustrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 65 | 12,6" | 2,6 | 1,6 |
| 89 | 7,4" | 1,5 | 0,5 |
| 113 | 5,6" | 1,1 | 0,1 |
| 137 | 4,8" | 1 | 0 |

30.

SUBSTRATO TIPO Y MOLIBDATO AMONICO 0,05/1000

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|---------|
| 24 | 92,88 |
| 48 | 1026,72 |
| 72 | 1749,84 |
| 96 | 2254,00 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 24 | 5,9 c.c. | 0,175 |
| 41 | 6,3 c.c. | 0,161 |
| 65 | 5,3 c.c. | 0,200 |
| 89 | 6,8 c.c. | 0,146 |
| 113 | 7,8 c.c. | 0,122 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 41 | 13,6" | 2,8 | 1,8 |
| 65 | 6,7" | 1,4 | 0,4 |
| 89 | 5,8" | 1,2 | 0,2 |
| 113 | 5,1" | 1,06 | 0,06 |
| 137 | 4,8" | 1 | 0,00 |

31

SUBSTRATO TIPO Y MOLIBDATO SODICO 0,00125/1000

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|---------|
| 24 | 327,52 |
| 48 | 901,52 |
| 72 | 1751,00 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 24 | 7,8 c.c. | 0,112 |
| 41 | 7,8 c.c. | 0,112 |
| 65 | 6,8 c.c. | 0,159 |
| 89 | 8,7 c.c. | 0,092 |
| 113 | 10,4 c.c. | 0,002 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 41 | 20" | 4,1 | 3,1 |
| 65 | 8" | 1,6 | 0,6 |
| 89 | 6,2" | 1,29 | 0,29 |
| 113 | 5,3" | 1,1 | 0,1 |
| 137 | 5,3" | 1,1 | 0,1 |

32

SUBSTRATO TIPO Y 2-4-D

METODO MICROMETRICO

| Horas | Micras |
|-------|--------|
| 48 | 26,00 |
| 72 | 34,00 |
| 96 | 34,00 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado, Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 48 | 6,8 c.c. | 0,154 |
| 72 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 96 | 8,4 c.c. | 0,031 |
| 120 | 11,0 c.c. | 0,001 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 48 | 17" | 3,54 | 2,54 |
| 72 | 6" | 1,2 | 0,2 |
| 96 | 4,8" | 1,00 | 0,00 |
| 120 | 4,8" | 1,00 | 0,000 |

33

SUBSTRATO TIPO Y NAFTALENO

METODO MICROMETRÍCO

| Horas | Micras |
|-------|--------|
| 48 | 37,7 |
| 72 | 97,5 |
| 96 | 160,1 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 48 | 5,8 c.c. | 0,222 |
| 72 | 4,5 c.c. | 0,416 |
| 96 | 5,8 c.c. | 0,222 |
| 120 | 8,5 c.c. | 0,025 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 24 | 24" | 5 | 4 |
| 48 | 7,6" | 1,58 | 0,58 |
| 72 | 6" | 1,1 | 0,1 |
| 96 | 4,8" | 1 | 0,00 |
| 120 | 4,8" | 1 | 0,00 |

34

SUBSTRATO TIPO Y ACENAFTENO

MÉTODO MICROMÉTRICO

| Horas | Micras |
|-------|--------|
| 48 | 217,6 |
| 72 | 988,0 |
| 96 | 1595,6 |

REDUCTORES

| Horas | Líquido substrato gastado. Benedict 5 cc=0,00985 grs glucosa | Cantidad reductores grs % de glucosa |
|-------|---|---|
| 0 | 7,1 c.c. | 0,138 |
| 48 | 6,1 c.c. | 0,197 |
| 72 | 5 c.c. | 0,319 |
| 96 | 5,5 c.c. | 0,252 |
| 120 | 6 c.c. | 0,205 |
| 148 | 12,5 c.c. | 0,000 |

VISCOSIDAD

| Horas | Tiempo caída substrato | Viscosidad relativa | Viscosidad específica |
|-------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | 24" | 5 | 4 |
| 48 | 7,6" | 1,58 | 0,58 |
| 72 | 4,8" | 1 | 0,00 |
| 96 | 4,8" | 1 | 0,00 |
| 120 | 4,8" | 1 | 0,00 |

Discusión de los resultados

De los resultados obtenidos se deduce que en presencia de molibdato sódico a la concentración media utilizada es máximo el efecto acelerante en la etapa germinativa, así como el metabolismo de los eslabones de ácido urónico que son consumidos tan pronto han sido liberados de la macromolécula pectínica y posteriormente para las tres concentraciones empleadas, un retardo en el crecimiento y acción pectinásica.

También por los resultados observamos una intensa acción inhibitoria por parte del 2-4-D y *naftaleno*, sobre la formación del micelio, la cual, es dificultada, intensificándose claramente sobre la esporulación; esta acción obliga a un metabolismo más intenso, que determina, a su vez, una rápida degradación del substrato pectínico, con aparición de elevada proporción de fragmentos reductores que se acumulan en el medio y sólo más lenta, pero totalmente, son metabolizados a posteriori. Esta acción, que creemos abre buenas perspectivas en el camino de eliminación de pectinas en jugos vegetales, es sobre todo destacable en el caso del *acenafteno*.

El *acenafteno* influye aumentando claramente la hidrólisis de la pectina, y determinando un retardo en su metabolismo sin que el desarrollo del micelio se afecte tan intensamente como por los otros dos compuestos estudiados.

INFLUENCIA DE AGENTES MUTANTE SOBRE EL METABOLISMO HIDROCARBONADO
Y MÓRFOLÓGÍA DEL *ASPERGILLUS OCHRACEUS*

Con objeto de mejorar nuestro conocimiento sobre el *Aspergillus ochraceus* hemos investigado la influencia que ejercen sobre este hongo tres sustancias de estructura tan distinta como el *etil-uretano*, *hidrato de cloral*, *p-aminobencenosulfonamida*. Pero buscando ponerlos en condiciones fisiológicas convenientes, hemos utilizado el medio de cultivo tipo «Czapek» y como fuente hidrocarbonada el hidrato de carbono que nos ha parecido más adecuado para un control de la actividad enzimática del hongo, *la sacarosa*, ya que es fácil de controlar, tanto el proceso de inversión como el consumo de las hexosas resultantes.

Primeramente, siguiendo la marcha indicada en las experiencias anteriormente citadas se prepararon una serie de cultivos sobre substratos tipo «Czapek» y sobre el mismo se adicionaron cantidades determinadas y crecientes de cada uno de los tres agentes que estudiamos.

A lo largo del desarrollo determinamos:

a) Reductores actuales.

b) Reductores totales, por inversión ácida de la sacarosa residual. La diferencia entre estos dos valores nos dá la proporción de disacárido aún no metabolizado.

c) Producción de ocracina por absorción en fotocolorímetro *Etco*, utilizando los filtros azul, naranja y rojo, aunque en los resultados que exponemos nos limitamos, por razones de brevedad, a los obtenidos con el filtro azul.

d) pH del medio a lo largo del ciclo experimental.

e) Peso de las colonias desecadas a 100-105° C. hasta peso constante.

Independientemente se ha realizado un estudio micrográfico del *Aspergillus ochraceus* en cada una de las experiencias efectuadas que describimos en la parte correspondiente de este trabajo.

Se aumentó la concentración en cada agente mutante hasta que observamos inhibición completa en la germinación (dosis letal). Entonces preparamos nuevos cultivos sobre substratos tipo, y a las 24 horas, una vez iniciada la germinación adicionamos agente mutante a dicha dosis y superiores, continuando con las determinaciones anteriormente indicadas.

Para diferenciar la actividad invertásica del metabolismo del monosacárido, hemos realizado otra serie de experiencias sobre glucosa.

35

SUBSTRATO NORMAL (Czapek)

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 gramos de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|-------------------------------|
| Inicial | — | — |
| 1 | 2 c.c. | 0,6500 grs |
| 2 | 1 » | 1,3000 » |
| 3 | 2 » | 0,6500 » |
| 4 | 3 » | 0,4333 » |
| 5 | 5,1 » | 0,2549 » |
| 6 | 10 » | 0,1300 » |
| 7 | 14 » | 0,0928 » |
| 8 | 19 » | 0,0684 » |
| 9 | 20 » | 0,0650 » |
| 10 | 21,7 » | 0,0599 » |
| 11 | 23 » | 0,0565 » |
| 12 | 24,4 » | 0,0532 » |
| 13 | 25,8 » | 0,0503 » |
| 14 | 27,2 » | 0,0477 » |
| 15 | 28,6 » | 0,0454 » |
| 16 | 30 » | 0,0433 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,5 » | 2,6000 » | 1,8525 » |
| 2 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,8232 » |
| 3 | 1,5 » | 0,8666 » | 0,20577 » |
| 4 | 2,9 » | 0,4482 » | 0,0141 » |
| 5 | 0,1 » | 0,2549 » | 0,0000 » |

36

 SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,1 %

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|----------------------------|
| Inicial | — | — |
| 1 | 2 c.c. | 0,6500 grs |
| 2 | 1 » | 1,3000 » |
| 3 | 1,4 » | 0,9285 » |
| 4 | 2,8 » | 0,4642 » |
| 5 | 4,6 » | 0,2826 » |
| 6 | 9,7 » | 0,1340 » |
| 7 | 13,8 » | 0,0942 » |
| 8 | 18,4 » | 0,0706 » |
| 9 | 19,3 » | 0,0673 » |
| 10 | 20,8 » | 0,0625 » |
| 11 | 21,9 » | 0,0593 » |
| 12 | 23,5 » | 0,0553 » |
| 13 | 25,0 » | 0,0520 » |
| 14 | 26,1 » | 0,0498 » |
| 15 | 27,0 » | 0,0481 » |
| 16 | 28,6 » | 0,0454 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,5 » | 2,6000 » | 1,8525 » |
| 2 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,8232 » |
| 3 | 1,8 » | 0,7222 » | 0,1959 » |
| 4 | 2,8 » | 0,4642 » | 0,0000 » |

37

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,5 %

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c. c. = 0,013 gramos de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|----------------------------|
| Inicial | — | — |
| 1 | 1,9 c.c. | 0,6842 grs |
| 2 | 1,1 » | 1,1818 » |
| 3 | 1,5 » | 0,8666 » |
| 4 | 2,1 » | 0,6190 » |
| 5 | 3,2 » | 0,4062 » |
| 6 | 7,5 » | 0,1733 » |
| 7 | 11,6 » | 0,1120 » |
| 8 | 14,8 » | 0,0878 » |
| 9 | 16,0 » | 0,0812 » |
| 10 | 17,2 » | 0,0755 » |
| 11 | 18,6 » | 0,0698 » |
| 12 | 19,8 » | 0,0656 » |
| 13 | 21,0 » | 0,0619 » |
| 14 | 22,6 » | 0,0575 » |
| 15 | 23,5 » | 0,0553 » |
| 16 | 24,6 » | 0,0528 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,5 » | 2,6000 » | 1,8200 » |
| 2 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,9355 » |
| 3 | 1,0 » | 1,3000 » | 0,4117 » |
| 4 | 2,1 » | 0,6190 » | 0,0000 » |

38

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1%

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|----------------------------|
| Inicial | | |
| 1 | 1,9 c.c. | 0,6842 grs |
| 2 | 1,2 » | 1,0833 » |
| 3 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 4 | 1,0 » | 1,3000 » |
| 5 | 1,3 » | 1,0000 » |
| 6 | 5,3 » | 0,2452 » |
| 7 | 9 » | 0,1444 » |
| 8 | 10,3 » | 0,1250 » |
| 9 | 11,5 » | 0,1130 » |
| 10 | 12,8 » | 0,1015 » |
| 11 | 14 » | 0,0928 » |
| 12 | 15,2 » | 0,0855 » |
| 13 | 16,4 » | 0,0792 » |
| 14 | 17,6 » | 0,0738 » |
| 15 | 18,8 » | 0,0691 » |
| 16 | 19,0 » | 0,0684 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,25 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,5 » | 2,60 » | 1,8200 » |
| 2 | 0,6 » | 2,1666 » | 1,0291 » |
| 3 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,5145 » |
| 4 | 1,0 » | 1,3000 | 0,0000 » |

39

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1,5 %

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|----------------------------|
| Inicial | — | — |
| 1 | 1,9 c.c. | 0,6842 grs |
| 2 | 2 » | 0,6500 » |
| 3 | 0,6 » | 2,5000 » |
| 4 | 0,7 » | 1,8571 » |
| 5 | 0,9 » | 1,4444 » |
| 6 | 1 » | 1,3000 » |
| 7 | 1,2 » | 1,0833 » |
| 8 | 2,5 » | 0,5200 » |
| 9 | 3,9 » | 0,3333 » |
| 10 | 5,3 » | 0,2452 » |
| 11 | 6,7 » | 0,1940 » |
| 12 | 8,0 » | 0,1625 » |
| 13 | 9,5 » | 0,1368 » |
| 14 | 11,0 » | 0,1181 » |
| 15 | 12,5 » | 0,1040 » |
| 16 | 14,0 » | 0,0928 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,25 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,5 » | 2,60 » | 1,8200 » |
| 2 | 0,5 » | 2,60 » | 1,8525 » |
| 3 | 0,6 » | 2,50 » | 0,0000 » |

40

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 2%

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|----------------------------|
| Inicial | — | — |
| 1 | 2 c.c. | 0,6500 grs |
| 2 | 0,9 » | 1,4444 » |
| 3 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 4 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 5 | 0,6 » | 1,1666 » |
| 6 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 7 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 8 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 9 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 10 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 11 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 12 | 0,6 » | 1,1666 » |
| 13 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 14 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 15 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 16 | 0,6 » | 2,1666 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,25 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,5 » | 2,60 » | 1,8525 » |
| 2 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,6859 » |
| 3 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,5145 » |
| 4 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,0000 » |

41

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1%. CON GLUCOSA

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: c. c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs |
| 1 | 0,4 » | 3,2500 » |
| 2 | 0,4 » | 3,2500 » |
| 3 | 0,5 » | 2,6000 » |
| 4 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 5 | 0,9 » | 1,4444 » |
| 6 | 1,1 » | 1,1818 » |
| 7 | 3 » | 0,4333 » |
| 8 | 1,5 » | 0,1733 » |
| 9 | 17,5 » | 0,0743 » |
| 10 | 19 » | 0,0684 » |
| 11 | 20,0 » | 0,0650 » |
| 12 | 23,0 » | 0,0565 » |
| 13 | 24,0 » | 0,0542 » |
| 14 | 25,0 » | 0,0520 » |
| 15 | 26,0 » | 0,0500 » |
| 16 | 26,0 » | 0,0500 » |

4 2

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO NORMAL (Czapek)

| <i>Días</i> | <i>m. V.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|--------------|-----------|
| Inicial | 291 | 5,48 |
| 1 | 336 | 6,35 |
| 2 | 404 | 7,65 |
| 3 | 404 | 7,65 |
| 4 | 406 | 7,70 |
| 5 | 406 | 7,70 |
| 6 | 408 | 7,74 |
| 7 | 414 | 7,85 |
| 8 | 422 | 8,00 |
| 9 | 428 | 8,10 |
| 10 | 428 | 8,10 |
| 11 | 429 | 8,12 |
| 12 | 431 | 8,18 |
| 13 | 432 | 8,20 |
| 14 | 434 | 8,23 |
| 15 | 435 | 8,25 |
| 16 | 438 | 8,30 |

4 3

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,1 %

| <i>Días</i> | <i>m. V.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|--------------|-----------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 328 | 6,20 |
| 2 | 360 | 6,80 |
| 3 | 391 | 7,40 |
| 4 | 398 | 7,55 |
| 5 | 404 | 7,65 |
| 6 | 406 | 7,70 |
| 7 | 412 | 7,79 |
| 8 | 428 | 8,12 |
| 9 | 431 | 8,18 |
| 10 | 434 | 8,23 |
| 11 | 435 | 8,25 |
| 12 | 438 | 8,32 |
| 13 | 442 | 8,39 |
| 14 | 443 | 8,40 |
| 15 | 443 | 8,40 |
| 16 | 446 | 8,46 |

44

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,5 %

| <i>Días</i> | <i>m. V.</i> | <i>pH.</i> |
|-------------|--------------|------------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 304 | 5,74 |
| 2 | 324 | 6,12 |
| 3 | 362 | 6,85 |
| 4 | 394 | 7,46 |
| 5 | 406 | 7,68 |
| 6 | 411 | 7,80 |
| 7 | 418 | 7,94 |
| 8 | 430 | 8,16 |
| 9 | 432 | 8,20 |
| 10 | 437 | 8,28 |
| 11 | 438 | 8,30 |
| 12 | 440 | 8,34 |
| 13 | 446 | 8,45 |
| 14 | 452 | 8,58 |
| 15 | 453 | 8,60 |
| 16 | 453 | 8,60 |

45

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1 %

| <i>Días</i> | <i>m. V.</i> | <i>pH.</i> |
|-------------|--------------|------------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 313 | 5,90 |
| 2 | 340 | 6,42 |
| 3 | 365 | 6,90 |
| 4 | 396 | 7,50 |
| 5 | 407 | 7,71 |
| 6 | 418 | 7,94 |
| 7 | 419 | 7,95 |
| 8 | 432 | 8,19 |
| 9 | 434 | 8,24 |
| 10 | 438 | 8,30 |
| 11 | 442 | 8,39 |
| 12 | 443 | 8,40 |
| 13 | 451 | 8,56 |
| 14 | 451 | 8,56 |
| 15 | 451 | 8,56 |
| 16 | 453 | 8,60 |

46

POTENCIOMETRIA SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1,5 %

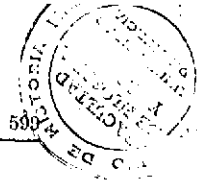
| <i>Días</i> | <i>m. V.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|--------------|-----------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 336 | 6,35 |
| 2 | 340 | 6,43 |
| 3 | 344 | 6,50 |
| 4 | 346 | 6,53 |
| 5 | 348 | 6,58 |
| 6 | 354 | 6,69 |
| 7 | 359 | 6,79 |
| 8 | 360 | 6,80 |
| 9 | 362 | 6,85 |
| 10 | 364 | 6,89 |
| 11 | 370 | 7,00 |
| 12 | 375 | 7,10 |
| 13 | 384 | 7,28 |
| 14 | 386 | 7,32 |
| 15 | 404 | 7,64 |
| 16 | 407 | 7,71 |

47

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 2 %

| <i>Días</i> | <i>m. V.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|--------------|-----------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 318 | 6 |
| 2 | 338 | 6,40 |
| 3 | 352 | 6,65 |
| 4 | 352 | 6,65 |
| 5 | 352 | 6,65 |
| 6 | 360 | 6,80 |
| 7 | 360 | 6,80 |
| 8 | 360 | 6,80 |
| 9 | 360 | 6,80 |
| 10 | 364 | 6,88 |
| 12 | 364 | 6,88 |
| 13 | 364 | 6,88 |
| 14 | 364 | 6,88 |
| 15 | 364 | 6,88 |
| 16 | 364 | 6,88 |





48

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON ETILURETANO 1%
CON GLUCOSA

| Días | m. V. | pH |
|---------|-------|------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 313 | 5,90 |
| 2 | 340 | 6,42 |
| 3 | 365 | 6,90 |
| 4 | 396 | 7,50 |
| 5 | 407 | 7,71 |
| 6 | 418 | 7,94 |
| 7 | 419 | 7,95 |
| 8 | 432 | 8,19 |
| 9 | 434 | 8,24 |
| 10 | 438 | 8,30 |
| 11 | 442 | 8,39 |
| 12 | 443 | 8,40 |
| 13 | 451 | 8,56 |
| 14 | 451 | 8,56 |
| 15 | 451 | 8,56 |
| 16 | 453 | 8,60 |

49

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO NORMAL (Czapek)

| Días | T | 10. α |
|------|------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 95 | 0,22276 |
| 3 | 93 | 0,31517 |
| 4 | 90 | 0,45757 |
| 5 | 78,5 | 1,05130 |
| 6 | 75 | 1,24939 |
| 7 | 71 | 1,48742 |
| 8 | 67,5 | 1,70696 |
| 9 | 65 | 1,87087 |
| 10 | 62 | 2,07608 |
| 11 | 59 | 2,29148 |
| 12 | 56 | 2,51812 |
| 13 | 54 | 2,67606 |
| 14 | 53 | 2,75724 |
| 15 | 52 | 2,83997 |
| 16 | 51 | 2,92430 |



50

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,1 %

| Días | T | 10. α |
|------|------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 97 | 0,13228 |
| 3 | 95 | 0,22276 |
| 4 | 92 | 0,36212 |
| 5 | 89 | 0,50610 |
| 6 | 86 | 0,65502 |
| 7 | 80 | 0,96910 |
| 8 | 76 | 1,19186 |
| 9 | 70,5 | 1,51811 |
| 10 | 68 | 1,67491 |
| 11 | 68 | 1,67491 |
| 12 | 62 | 2,00659 |
| 13 | 57 | 2,44125 |
| 14 | 52,5 | 2,79841 |
| 15 | 50 | 3,01030 |
| 16 | 48 | 3,18759 |

51

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,5 %

| Días | T | 10. α |
|------|------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 97,5 | 0,10995 |
| 2 | 95 | 0,22276 |
| 3 | 93 | 0,31517 |
| 4 | 72 | 1,42668 |
| 5 | 62 | 2,07608 |
| 6 | 52 | 2,83997 |
| 7 | 42 | 3,76751 |
| 8 | 41,5 | 3,81916 |
| 9 | 41,5 | 3,81916 |
| 10 | 41 | 3,87216 |
| 11 | 39 | 4,08935 |
| 12 | 38,5 | 4,14539 |
| 13 | 37 | 4,31798 |
| 14 | 36 | 4,43617 |
| 15 | 35 | 4,55932 |
| 16 | 34 | 4,68521 |

52

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1%

| Días | T | 10. α |
|------|------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 97,5 | 0,10995 |
| 2 | 95 | 0,22276 |
| 3 | 93 | 0,31517 |
| 4 | 72 | 1,42668 |
| 5 | 62 | 2,07608 |
| 6 | 52 | 2,83997 |
| 7 | 42 | 3,76751 |
| 8 | 41,5 | 3,81916 |
| 9 | 41,5 | 3,81916 |
| 10 | 41 | 3,87216 |
| 11 | 39 | 4,08935 |
| 12 | 38,5 | 4,14539 |
| 13 | 37 | 4,31798 |
| 14 | 36 | 4,43697 |
| 15 | 35 | 4,55932 |
| 16 | 34 | 4,68521 |

53

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1,5%

| Días | T | 10. α |
|---------|-----|--------------|
| Inicial | 100 | 0 |
| 1 | 98 | 0,08774 |
| 2 | 97 | 0,13228 |
| 3 | 96 | 0,17729 |
| 4 | 92 | 0,36212 |
| 5 | 89 | 0,50610 |
| 6 | 86 | 0,65502 |
| 7 | 80 | 0,96910 |
| 8 | 73 | 1,36677 |
| 9 | 68 | 1,67491 |
| 10 | 65 | 1,87087 |
| 11 | 62 | 2,07608 |
| 12 | 59 | 2,29148 |
| 13 | 56 | 2,51812 |
| 14 | 52 | 2,83997 |
| 15 | 50 | 3,01030 |
| 16 | 49 | 3,09804 |

54

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 2 %

| <i>Días</i> | <i>T</i> | <i>10. α</i> |
|-------------|----------|--------------|
| Inicial | 100 | 0 |
| 1 | 97,5 | 0,10995 |
| 2 | 95 | 0,22276 |
| 3 | 93 | 0,31517 |
| 4 | 91,5 | 0,38579 |
| 5 | 90 | 0,45757 |
| 6 | 88,5 | 0,53057 |
| 7 | 87 | 0,60481 |
| 8 | 86 | 0,65502 |
| 9 | 85 | 0,70581 |
| 10 | 84 | 0,75721 |
| 11 | 83 | 0,80922 |
| 12 | 81,5 | 0,88842 |
| 13 | 80,5 | 0,94204 |
| 14 | 79 | 1,02373 |
| 15 | 78 | 1,07905 |
| 16 | 76 | 1,19186 |

55

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1%. CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>T</i> | <i>10. α</i> |
|-------------|----------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 97,5 | 0,10995 |
| 2 | 95 | 0,22276 |
| 3 | 93 | 0,31517 |
| 4 | 72 | 1,42668 |
| 5 | 62 | 2,07608 |
| 6 | 52 | 2,83997 |
| 7 | 42 | 3,76751 |
| 8 | 41,5 | 3,81916 |
| 9 | 41,5 | 3,81916 |
| 10 | 41 | 3,87216 |
| 11 | 39 | 4,08935 |
| 12 | 38,5 | 4,14539 |
| 13 | 37 | 4,31798 |
| 14 | 36 | 4,43617 |
| 15 | 35 | 4,55932 |
| 16 | 34 | 4,68521 |



56

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO NORMAL (Czapek)

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 0 | — |
| 2 | 0,0517 |
| 3 | 0,2097 |
| 4 | 0,3995 |
| 5 | 0,3694 |
| 6 | 0,3542 |
| 7 | 0,3486 |
| 8 | 0,3236 |
| 9 | 0,3213 |
| 10 | 0,3189 |
| 11 | 0,3171 |
| 12 | 0,3155 |
| 13 | 0,3139 |
| 14 | 0,3121 |
| 15 | 0,3110 |
| 16 | 0,3093 |

57

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,1 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| Inicial | — |
| 1 | 0,0148 |
| 2 | 0,0566 |
| 3 | 0,1794 |
| 4 | 0,2324 |
| 5 | 0,3037 |
| 6 | 0,3184 |
| 7 | 0,3197 |
| 8 | 0,3375 |
| 9 | 0,3539 |
| 10 | 0,3598 |
| 11 | 0,3590 |
| 12 | 0,3589 |
| 13 | 0,3579 |
| 14 | 0,3536 |
| 15 | 0,3496 |
| 16 | 0,3435 |

58

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 0,5 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | — |
| 2 | 0,0396 |
| 3 | 0,0978 |
| 4 | 0,1953 |
| 5 | 0,2159 |
| 6 | 0,2986 |
| 7 | 0,3065 |
| 8 | 0,3078 |
| 9 | 0,3094 |
| 10 | 0,3126 |
| 11 | 0,3146 |
| 12 | 0,3115 |
| 13 | 0,3098 |
| 14 | 0,3087 |
| 15 | 0,3068 |
| 16 | 0,3048 |

59

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | — |
| 2 | 0,0363 |
| 3 | 0,0831 |
| 4 | 0,1334 |
| 5 | 0,1602 |
| 6 | 0,2376 |
| 7 | 0,2891 |
| 8 | 0,2982 |
| 9 | 0,2998 |
| 10 | 0,3013 |
| 11 | 0,3059 |
| 12 | 0,3179 |
| 13 | 0,3112 |
| 14 | 0,3092 |
| 15 | 0,3059 |
| 16 | 0,3015 |

60

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1,5 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | 0,0094 |
| 2 | 0,0160 |
| 3 | 0,0213 |
| 4 | 0,0286 |
| 5 | 0,0318 |
| 6 | 0,0892 |
| 7 | 0,1020 |
| 8 | 0,1268 |
| 9 | 0,1475 |
| 10 | 0,1668 |
| 11 | 0,1822 |
| 12 | 0,1896 |
| 13 | 0,2019 |
| 14 | 0,2476 |
| 15 | 0,2847 |
| 16 | 0,2988 |

61

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 2 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | — |
| 2 | — |
| 3 | 0,0397 |
| 4 | 0,0441 |
| 5 | 0,0472 |
| 6 | 0,0486 |
| 7 | 0,0497 |
| 8 | 0,0512 |
| 9 | 0,0517 |
| 10 | 0,0574 |
| 11 | 0,0586 |
| 12 | 0,0589 |
| 13 | 0,0592 |
| 14 | 0,0594 |
| 15 | 0,0597 |
| 16 | 0,0605 |

62

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON ETIL-URETANO 1%. CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | — |
| 2 | — |
| 3 | 0,0581 |
| 4 | 0,0742 |
| 5 | 0,1086 |
| 6 | 0,1948 |
| 7 | 0,2146 |
| 8 | 0,2404 |
| 9 | 0,2915 |
| 10 | 0,3089 |
| 11 | 0,3142 |
| 12 | 0,3165 |
| 13 | 0,3116 |
| 14 | 0,3098 |
| 15 | 0,3026 |
| 16 | 0,3011 |

63

SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2 %

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato | % de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|----------------------------|
| Inicial | — c.c. | grs |
| 1 | 1,7 » | 0,7647 » |
| 2 | 1,6 » | 0,8125 » |
| 3 | 1,0 » | 1,3000 » |
| 4 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 5 | 0,7 » | 1,8573 » |
| 6 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 7 | 1,3 » | 1,0000 » |
| 8 | 3,0 » | 0,4333 » |
| 9 | 3,6 » | 0,3611 » |
| 10 | 8,5 » | 0,1529 » |
| 11 | 8,7 » | 0,1494 » |
| 12 | 9,0 » | 0,1444 » |
| 13 | 9,6 » | 0,1354 » |
| 14 | 10,5 » | 0,1238 » |
| 15 | 11,5 » | 0,1130 » |
| 16 | 12,5 » | 0,1040 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,4 » | 3,2500 » | 2,3610 » |
| 2 | 0,4 » | 3,2500 » | 2,3156 » |
| 3 | 0,5 » | 2,6000 » | 1,2550 » |
| 4 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,5145 » |
| 5 | 0,7 » | 1,8573 » | 0,0000 » |

64

SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,3 %

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato | % | de reductores en glucosa |
|---------|-------------------|--------|-----------------------------|
| Inicial | — c.c. | — | grs |
| 1 | 1,7 » | 0,7647 | » |
| 2 | 1,3 » | 1,0000 | » |
| 3 | 0,6 » | 2,1666 | » |
| 4 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 5 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 6 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 7 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 8 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 9 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 10 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 11 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 12 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 13 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 14 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 15 | 0,5 » | 2,6000 | » |
| 16 | 0,5 » | 2,6000 | » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % | de reductores en glucosa | % | de sacarosa presente |
|---------|------------------------------|------|-----------------------------|--------|-------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,25 | grs | 3,0875 | grs |
| 1 | 0,4 » | 3,25 | » | 2,3610 | » |
| 2 | 0,5 » | 2,60 | » | 1,5200 | » |
| 3 | 0,5 » | 2,60 | » | 0,4180 | » |
| 4 | 0,5 » | 2,60 | » | 0,0000 | » |





65

SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2 %.
CON GLUCOSA

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
| Inicial | 4,4 c.c. | 3,2500 grs |
| 1 | 0,4 » | 3,2500 » |
| 2 | 0,4 » | 3,2500 » |
| 3 | 0,5 » | 2,6000 » |
| 4 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 5 | 1,4 » | 0,9286 » |
| 6 | 4,0 » | 0,3250 » |
| 7 | 5,6 » | 0,2321 » |
| 8 | 8,5 » | 0,1529 » |
| 9 | 10,3 » | 0,1262 » |
| 10 | 11,5 » | 0,1130 » |
| 11 | 11,5 » | 0,1130 » |
| 12 | 12,6 » | 0,1032 » |
| 13 | 13,5 » | 0,0963 » |
| 14 | 13,5 » | 0,0963 » |
| 15 | 13,5 » | 0,0963 » |
| 16 | 13,5 » | 0,0963 » |



66

POTENCIOMETRIA
SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2 %

| <i>Días</i> | <i>mV.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|------------|-----------|
| Inicial | 289 | 5,45 |
| 1 | 292 | 5,50 |
| 2 | 308 | 5,81 |
| 3 | 331 | 6,25 |
| 4 | 357 | 6,74 |
| 5 | 378 | 7,15 |
| 6 | 398 | 7,55 |
| 7 | 407 | 7,72 |
| 8 | 414 | 7,85 |
| 9 | 422 | 8,00 |
| 10 | 430 | 8,15 |
| 11 | 438 | 8,30 |
| 12 | 439 | 8,32 |
| 13 | 440 | 8,35 |
| 14 | 442 | 8,38 |
| 15 | 442 | 8,38 |
| 16 | 443 | 8,40 |

67

POTENCIOMETRIA
SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,3 %

| <i>Días</i> | <i>mV.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|------------|-----------|
| Inicial | 290 | 5,48 |
| 1 | 290 | 5,48 |
| 2 | 299 | 5,65 |
| 3 | 344 | 6,50 |
| 4 | 362 | 6,85 |
| 5 | 362 | 6,85 |
| 6 | 362 | 6,85 |
| 7 | 362 | 6,85 |
| 8 | 362 | 6,85 |
| 9 | 362 | 6,85 |
| 10 | 362 | 6,85 |
| 11 | 362 | 6,85 |
| 12 | 362 | 6,85 |
| 13 | 362 | 6,85 |
| 14 | 362 | 6,85 |
| 15 | 362 | 6,85 |
| 16 | 362 | 6,85 |

68.

POTENCIOMETRIA
SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2%. CON GLUCOSA

| Días | mV. | pH |
|---------|-----|------|
| Inicial | 289 | 5,45 |
| 1 | 292 | 5,50 |
| 2 | 313 | 5,90 |
| 3 | 326 | 6,15 |
| 4 | 375 | 7,10 |
| 5 | 401 | 7,60 |
| 6 | 410 | 7,76 |
| 7 | 417 | 7,90 |
| 8 | 432 | 8,20 |
| 9 | 427 | 8,10 |
| 10 | 436 | 8,26 |
| 11 | 438 | 8,30 |
| 12 | 440 | 8,35 |
| 13 | 440 | 8,35 |
| 14 | 440 | 8,35 |
| 15 | 440 | 8,35 |
| 16 | 442 | 8,38 |

69

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2 %

| Días | T | 10. a |
|------|------|---------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 99 | 0,04365 |
| 2 | 98 | 0,08774 |
| 3 | 98 | 0,08774 |
| 4 | 97,5 | 0,10995 |
| 5 | 96 | 0,17729 |
| 6 | 95 | 0,22276 |
| 7 | 94 | 0,26872 |
| 8 | 93 | 0,31517 |
| 9 | 93 | 0,31517 |
| 10 | 92,5 | 0,33858 |
| 11 | 92 | 0,36212 |
| 12 | 92 | 0,36212 |
| 13 | 91,5 | 0,38579 |
| 14 | 91 | 0,40959 |
| 15 | 91 | 0,40959 |
| 16 | 90 | 0,45757 |

70

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,3 %

| <i>Días</i> | <i>T</i> | <i>10. a</i> |
|-------------|----------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 100 | 0 |
| 3 | 100 | 0 |
| 4 | 100 | 0 |
| 5 | 99 | 0,04365 |
| 6 | 98 | 0,08774 |
| 7 | 97 | 0,13228 |
| 8 | 97 | 0,13228 |
| 9 | 97 | 0,13228 |
| 10 | 96 | 0,17729 |
| 11 | 96 | 0,17729 |
| 12 | 96 | 0,17729 |
| 13 | 96 | 0,17729 |
| 14 | 96 | 0,17729 |
| 15 | 96 | 0,17729 |
| 16 | 96 | 0,17729 |

71

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2%. CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>T</i> | <i>10. a</i> |
|-------------|----------|--------------|
| Inicial | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 100 | 0 |
| 3 | 98 | 0,08774 |
| 4 | 96 | 0,17729 |
| 5 | 95 | 0,22276 |
| 6 | 90 | 0,45757 |
| 7 | 90 | 0,45757 |
| 8 | 88 | 0,55517 |
| 9 | 87 | 0,60481 |
| 10 | 87 | 0,60481 |
| 11 | 86 | 0,65502 |
| 12 | 85 | 0,70581 |
| 13 | 85 | 0,70581 |
| 14 | 84 | 0,75721 |
| 15 | 84 | 0,75721 |
| 16 | 79 | 1,02373 |

72

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas
hasta peso constante

SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| Inicial | — |
| 1 | — |
| 2 | — |
| 3 | 0,0212 |
| 4 | 0,0621 |
| 5 | 0,0682 |
| 6 | 0,1586 |
| 7 | 0,2840 |
| 8 | 0,2102 |
| 9 | 0,2744 |
| 10 | 0,2683 |
| 11 | 0,2626 |
| 12 | 0,2586 |
| 13 | 0,2532 |
| 14 | 0,2498 |
| 15 | 0,2415 |
| 16 | 0,2320 |

73

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas
hasta peso constante

SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,3 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| Inicial | — |
| 1 | — |
| 2 | 0,0054 |
| 3 | 0,0144 |
| 4 | 0,0175 |
| 5 | 0,0440 |
| 6 | 0,0434 |
| 7 | 0,0440 |
| 8 | 0,0474 |
| 9 | 0,0490 |
| 10 | 0,0495 |
| 11 | 0,0498 |
| 12 | 0,0543 |
| 13 | 0,0590 |
| 14 | 0,0597 |
| 15 | 0,0604 |
| 16 | 0,0627 |

74

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas
hasta peso constante

SUBSTRATO CON HIDRATO DE CLORAL 0,2%. CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| Inicial | — |
| 1 | — |
| 2 | 0,0428 |
| 3 | 0,1148 |
| 4 | 0,1942 |
| 5 | 0,2646 |
| 6 | 0,3346 |
| 7 | 0,3442 |
| 8 | 0,3524 |
| 9 | 0,3312 |
| 10 | 0,2879 |
| 11 | 0,2537 |
| 13 | 0,2216 |
| 14 | 0,2104 |
| 15 | 0,2034 |
| 16 | 0,1972 |



75

SUBSTRATO CON GLUCOSA

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs |
| 1 | 0,4 » | 3,2500 » |
| 2 | 0,5 » | 2,6000 » |
| 3 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 4 | 2,6 » | 0,5000 » |
| 5 | 4,2 » | 0,3095 » |
| 6 | 10,2 » | 0,1274 » |
| 7 | 13,5 » | 0,0963 » |
| 8 | 14,0 » | 0,0928 » |
| 9 | 19,0 » | 0,0684 » |
| 10 | 20,5 » | 0,0634 » |
| 11 | 24,0 » | 0,0542 » |
| 12 | 26,0 » | 0,0500 » |
| 13 | 28,0 » | 0,0464 » |
| 14 | 29,5 » | 0,0441 » |
| 15 | 30,0 » | 0,0433 » |
| 16 | 30,0 » | 0,0433 » |



76

SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05%. CON GLUCOSA

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs |
| 1 | 0,4 » | 3,2500 » |
| 2 | 0,5 » | 2,6000 » |
| 3 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 4 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 5 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 6 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 7 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 8 | 0,7 » | 1,8571 » |
| 9 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 10 | 1,1 » | 1,1818 » |
| 11 | 1,4 » | 0,9285 » |
| 12 | 1,6 » | 0,8125 » |
| 13 | 1,8 » | 0,7222 » |
| 14 | 1,9 » | 0,6842 » |
| 15 | 2,4 » | 0,5416 » |
| 16 | 2,6 » | 0,5000 » |

77

SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05 %

REDUCTORES PRESENTES

Benedict: 5 c.c. = 0,013 grs de glucosa

| Días | Líquido substrato gastado | % de reductores en glucosa |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
| Inicial | — c.c. | — grs |
| 1 | 3,0 » | 0,4333 » |
| 2 | 1,3 » | 1,0000 » |
| 3 | 1,0 » | 1,3000 » |
| 4 | 1,0 » | 1,3000 » |
| 5 | 0,9 » | 1,4444 » |
| 6 | 0,8 » | 1,6250 » |
| 7 | 0,7 » | 1,8571 » |
| 8 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 9 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 10 | 0,6 » | 1,1666 » |
| 11 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 12 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 13 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 14 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 15 | 0,6 » | 2,1666 » |
| 16 | 0,6 » | 2,1666 » |

REDUCTORES TOTALES

| Días | Líquido substrato gastado | % reductores en glucosa | % de sacarosa presente |
|---------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Inicial | 0,4 c.c. | 3,2500 grs | 3,0875 grs |
| 1 | 0,4 » | 3,2500 » | 2,6759 » |
| 2 | 0,4 » | 3,2500 » | 2,1375 » |
| 3 | 0,4 » | 3,2500 » | 1,8525 » |
| 4 | 0,5 » | 2,6000 » | 1,2350 » |
| 5 | 0,5 » | 2,6000 » | 1,0982 » |
| 6 | 0,5 » | 2,6000 » | 0,9262 » |
| 7 | 0,5 » | 2,6000 » | 0,7057 » |
| 8 | 0,6 » | 2,1666 » | 0,0000 » |

78

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>mV.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|------------|-----------|
| Inicial | 291 | 5,48 |
| 1 | 336 | 6,35 |
| 2 | 404 | 7,65 |
| 3 | 404 | 7,65 |
| 4 | 406 | 7,70 |
| 5 | 406 | 7,70 |
| 6 | 408 | 7,74 |
| 7 | 414 | 7,85 |
| 8 | 422 | 8,00 |
| 9 | 428 | 8,10 |
| 10 | 428 | 8,10 |
| 11 | 429 | 8,12 |
| 12 | 431 | 8,18 |
| 13 | 432 | 8,20 |
| 14 | 434 | 8,23 |
| 15 | 435 | 8,25 |
| 16 | 438 | 8,30 |

79

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05%
CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>mV.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|------------|-----------|
| 1 | 284 | 5,35 |
| 2 | 284 | 5,35 |
| 3 | 299 | 5,65 |
| 4 | 329 | 6,22 |
| 5 | 329 | 6,22 |
| 6 | 329 | 6,22 |
| 7 | 347 | 6,55 |
| 8 | 357 | 6,75 |
| 9 | 404 | 7,65 |
| 10 | 404 | 7,65 |
| 11 | 404 | 7,65 |
| 12 | 406 | 7,70 |
| 13 | 406 | 7,70 |
| 14 | 406 | 7,70 |
| 15 | 406 | 7,70 |
| 16 | 406 | 7,70 |

80

POTENCIOMETRIA. SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05%

| <i>Días</i> | <i>mV.</i> | <i>pH</i> |
|-------------|------------|-----------|
| 1 | 284 | 5,35 |
| 2 | 284 | 5,35 |
| 3 | 284 | 5,35 |
| 4 | 301 | 5,68 |
| 5 | 315 | 5,95 |
| 6 | 315 | 5,95 |
| 7 | 345 | 6,52 |
| 8 | 345 | 6,52 |
| 9 | 358 | 6,78 |
| 10 | 375 | 7,10 |
| 11 | 391 | 7,40 |
| 12 | 398 | 7,55 |
| 13 | 398 | 7,55 |
| 14 | 398 | 7,55 |
| 15 | 398 | 7,55 |
| 16 | 406 | 7,70 |

81

*FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
CON SUBSTRATO CON GLUCOSA*

| <i>Días</i> | <i>T</i> | <i>10^a</i> |
|-------------|----------|-----------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 95 | 0,22276 |
| 3 | 93 | 0,31517 |
| 4 | 90 | 0,45757 |
| 5 | 78,5 | 1,05130 |
| 6 | 75 | 1,24939 |
| 7 | 71 | 1,48742 |
| 8 | 67,5 | 1,70696 |
| 9 | 65 | 1,87087 |
| 10 | 62 | 2,07608 |
| 11 | 59 | 2,29148 |
| 12 | 56 | 2,51812 |
| 13 | 54 | 2,67606 |
| 14 | 53 | 2,75724 |
| 15 | 52 | 2,83997 |
| 16 | 51 | 2,92430 |

82

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05 %. CON GLUCOSA

| Días | T | 10 α |
|------|------|-------------|
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 99 | 0,04365 |
| 3 | 97 | 0,13228 |
| 4 | 92 | 0,36212 |
| 5 | 91,5 | 0,38579 |
| 6 | 91,5 | 0,38579 |
| 7 | 86,5 | 0,62984 |
| 8 | 80,5 | 0,94204 |
| 9 | 87 | 0,60481 |
| 10 | 86 | 0,65502 |
| 11 | 85 | 0,70581 |
| 12 | 84 | 0,75721 |
| 13 | 84 | 0,75721 |
| 14 | 84 | 0,75721 |
| 15 | 84 | 0,75721 |
| 16 | 84 | 0,75721 |

83

FOTOCOLORIMETRIA. FILTRO AZUL
SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05 %

| Días | T | 10 α |
|---------|------|-------------|
| Inicial | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 98 | 0,08774 |
| 3 | 96 | 0,17729 |
| 4 | 95 | 0,22276 |
| 5 | 94,5 | 0,24568 |
| 6 | 94 | 0,26872 |
| 7 | 94 | 0,26872 |
| 8 | 93 | 0,31517 |
| 9 | 93 | 0,31517 |
| 10 | 93 | 0,31517 |
| 11 | 92 | 0,36212 |
| 12 | 92 | 0,36212 |
| 13 | 92 | 0,36212 |
| 14 | 92 | 0,36212 |
| 15 | 92 | 0,36212 |
| 16 | 92 | 0,36212 |

84

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 0 |
| 3 | 0,0752 |
| 4 | 0,1840 |
| 5 | 0,2862 |
| 6 | 0,2915 |
| 7 | 0,3206 |
| 8 | 0,3451 |
| 9 | 0,3462 |
| 10 | 0,3416 |
| 11 | 0,3408 |
| 12 | 0,3352 |
| 13 | 0,3165 |
| 14 | 0,3142 |
| 15 | 0,3106 |
| 16 | 0,3058 |

85

Peso de las colonias del «Aspergillus ochraceus» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05%. CON GLUCOSA

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 0 |
| 3 | 0,0150 |
| 4 | 0,0265 |
| 5 | 0,0326 |
| 6 | 0,0369 |
| 7 | 0,0482 |
| 8 | 0,0738 |
| 9 | 0,0897 |
| 10 | 0,0952 |
| 11 | 0,1385 |
| 12 | 0,1974 |
| 13 | 0,2762 |
| 14 | 0,2994 |
| 15 | 0,3132 |
| 16 | 0,3270 |

Peso de las colonias del «*Aspergillus ochraceus*» desecadas hasta peso constante

SUBSTRATO CON SULFANILAMIDA 0,05 %

| <i>Días</i> | <i>Gramos</i> |
|-------------|---------------|
| Inicial | — |
| 1 | — |
| 2 | — |
| 3 | — |
| 4 | 0,0128 |
| 5 | 0,0216 |
| 6 | 0,0418 |
| 7 | 0,0402 |
| 8 | 0,0408 |
| 9 | 0,0838 |
| 10 | 0,0884 |
| 11 | 0,0906 |
| 12 | 0,0996 |
| 13 | 0,1017 |
| 14 | 0,1062 |
| 15 | 0,1894 |
| 16 | 0,2735 |

Discusión de los resultados

Etil-uretano. De los datos resumidos en las tablas anteriores se deduce fácilmente un comportamiento muy específico en el *etil-uretano*, ya que influye extraordinariamente sobre la metabolización de los monosacáridos, glucosa y fructuosa, resultantes en la inversión de la sacarosa. Esta acción se manifiesta claramente a concentración del 1 %; llega a anularse prácticamente al 1,5 % y totalmente al 2 %, a pesar de que en estos dos últimos casos, el *uretano* no ha actuado sobre las esporas en germinación.

Por el contrario, esta sustancia no influye sobre la secreción de invertasa, ni aun a las concentraciones más altas utilizadas; si acaso apreciamos una pequeña activación, ya que en presencia de *uretano* en todos los casos se observan la desaparición de sacarosa al cabo de 4 días frente a los 5 que se precisan en el ensayo control.

Comprobamos la inhibición del metabolismo de la glucosa en un cultivo con *etil-uretano* al 1 %, observándose clara diferencia en las velocidades de desaparición frente al control.

Respecto del pH del medio no se observa una influencia apreciable.

La producción de pigmento es afectada claramente por el *etil-uretano*; aumenta en comparación con el control hasta la concentración del agente mutante al 1 %. Es análoga al control al 1,5 % y menor al 2 %. Estos dos últimos resultados son consecuencia de la inhibición del desarrollo miceliano del hongo.

En presencia de glucosa con el 1 % de *uretano* se comporta análogamente frente a la producción de *ocracina* como en el medio con sacarosa.

Hidrato de cloral.—El hidrato de cloral, aun a las concentraciones menores estudiadas, determina inhibición intensa o total en el metabolismo de la glucosa y en la inversión de la sacarosa. Esta inhibición, cuando es completa, se manifiesta, como es lógico, en una muy pequeña variación frente al valor inicial.

La producción de pigmento queda prácticamente detenida.

Sulfanilamida.—Ya a la concentración mínima estudiada, inhibe el metabolismo de la glucosa y manifiestamente la acción invertasa, así como la producción de pigmento. No hemos observado cambios morfológicos de interés.

BIBLIOGRAFIA

- (1) JANSEN, E. F. y MAC DONELL, L. R.: *Arch. Biochem.* 81-97 (1945).



IV

ESTUDIO MORFOLOGICO Y MICROGRAFICO
DEL «ASPERGILLUS OCHRACEUS»MORFOLOGÍA DEL «ASPERGILLUS OCHRACEUS» EN MEDIO CZAPEK-AGAR
COMPARADA CON LA VARIACIÓN OBTENIDA CUANDO EL MEDIO
CONTIENE ETIL-URETANO

Las colonias del «Aspergillus ochraceus» cultivadas en medio Czapek-agar se extienden suavemente, de ordinario planas y zonadas en algunos casos como pueden verse en las fotografías adjuntas.

El fieltro miceliano sumergido es de consistencia coriácea, presentando durante el desarrollo un reverso incoloro, amarillo, naranja y finalmente de color púrpura claro.

Los conidióforos parten del micelio sumergido, son muy abundantes, con cabezas conidiales de color ocráceo que dan a la colonia un aspecto característico. Estas cabezuelas se presentan en forma globosa o escindidas en masa conidiales, cuyo color ocre puede tener diversos grados de intensidad.

Cuando lo cultivamos en medio Czapek-agar-etiluretano se presentan las colonias con aspecto flocoso, blancas al principio y con desarrollo lento; pero a medida que crecen, aparecen fragmentaciones radiales, a la vez que el centro se eleva hasta venir a ser umbonado de forma muy característica, terminando el desarrollo con un aspecto totalmente rugoso. Los conidióforos son menos abundantes y por ello muy esparcidos. El color es también distinto al ofrecido en su desarrollo normal: primero se presenta rojo violeta y finalmente rojo pardo. El reverso violeta claro a violeta obscuro.

ESTUDIO MICROGRÁFICO COMPARATIVO DEL «ASPERGILLUS OCHRACEUS»
CULTIVADO EN CZAPEK O SUBSTRATO TIPO Y CZAPEK-ETILURETANO

Coloración vital.—Empleamos para este objeto el Rojo Neutro y el Violeta Dahlia a diluciones 1/1000 para coloraciones entre porta y cubre-objetos y al 1/10.000 y 1/100.000 para inmersión, disueltos los colorantes en agua destilada.

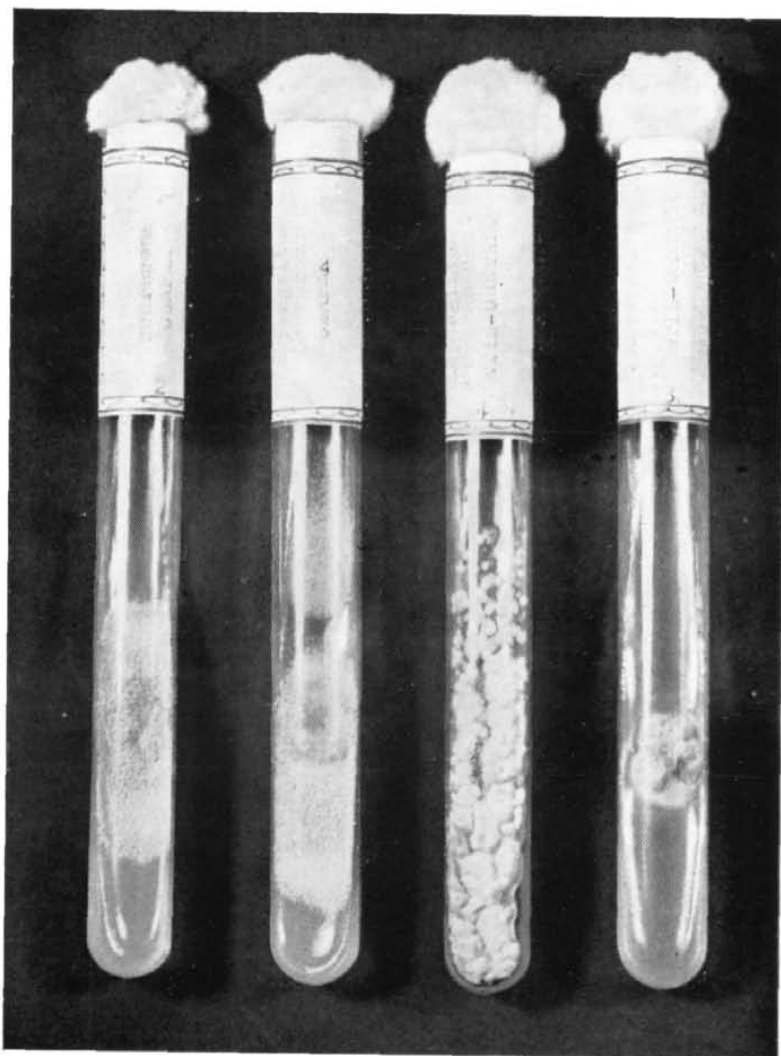
Técnica.—Colocamos una gota de Violeta Dahlia y dejamos caer enseguida una gota más pequeña de la solución de Rojo Neutro y en ellas suspendemos un poco de material miceliano que disociamos con agujas, cubrimos y sometemos a observación con distintos aumentos.

En el campo microscópico observamos la red miceliana. Inmediatamente a lo largo de cada hifa aparece una red vacuolar y en el interior de las vacuolas una serie de corpúsculos frecuentemente redondeados, animados de vivos movimientos brownianos y coloreados en rojo intenso: son los corpúsculos metacromáticos, que luego se inmovilizan y adhieren a la pared vacuolar. Medimos estos corpúsculos, los del condrioma, las vacuolas y la anchura de las hifas. Estas observaciones las seguimos durante las fases sucesivas de crecimiento paralelamente de las colonias cultivadas.

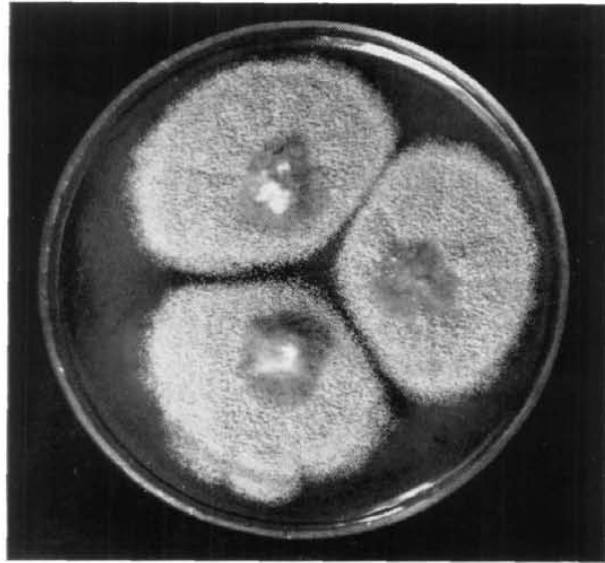
Cuando a los dos o tres días van apareciendo los conidióforos, esterigmas y conidios, seguimos estas observaciones, midiéndolos, para comparar después todas estas medidas con las obtenidas tras el empleo de técnicas de fijación.

Observaciones por fijación.—De todos los fijadores empleados por nosotros el que mejor nos ha servido en nuestro caso particular ha sido el formol al 20 %. De los colorantes, el Rojo Neutro, Violeta Dahlia, Azul de Metileno, Azur I y II y Eosina, Hemalum de Meyer, etc.

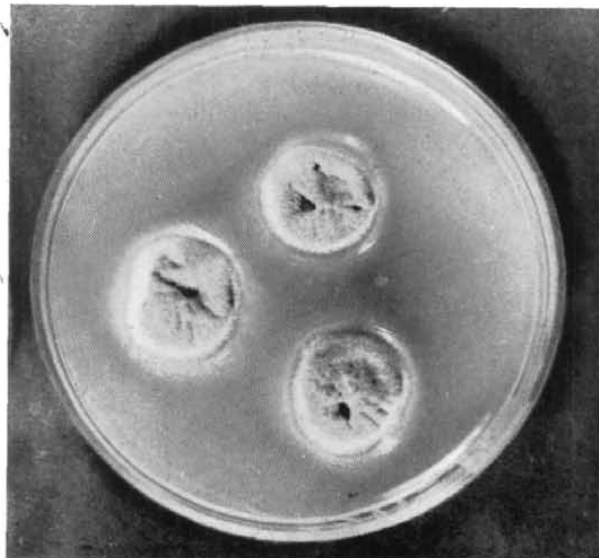
Por fijación y coloración adecuada, varias series de preparaciones de micelio en días sucesivos nos sirvieron para las medidas que fueron comprobadas con las realizadas por coloración vital, las cuales resumimos en el cuadro adjunto.



CULTIVOS DE «ASPERGILLUS OCHRACEUS»
1 y 2 en medio tipo «Czapek», 3 y 4 sustrato conteniendo etiluretano



«ASPERGILLUS OCHRACEUS» en medio «Czapek»-Agar



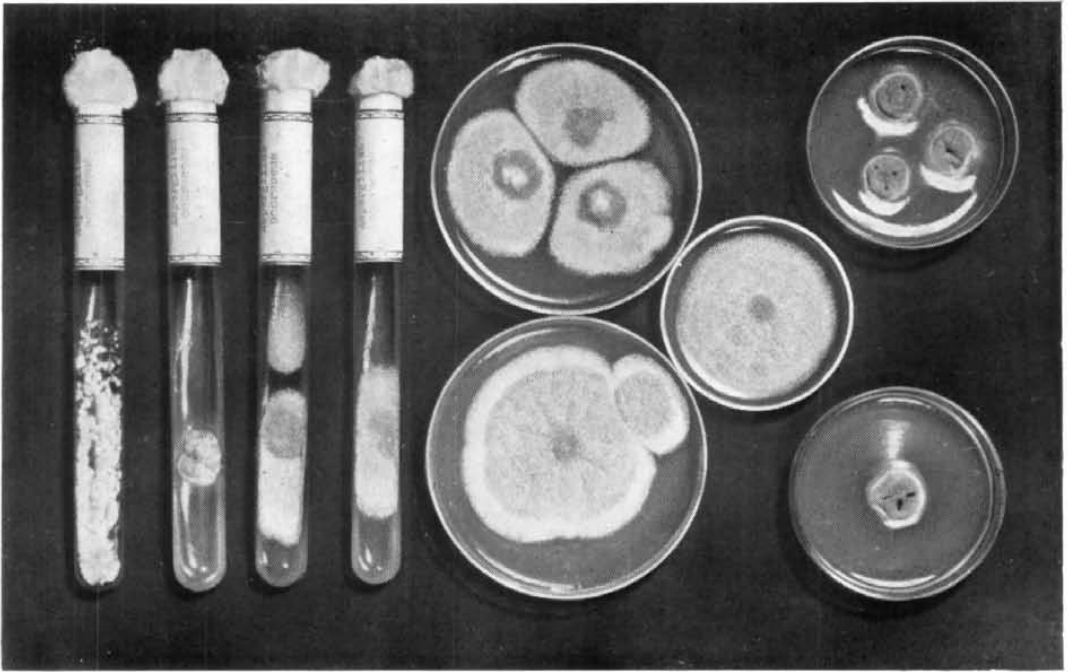
«ASPERGILLUS OCHRACEUS» en medio «Czapek»-chilurelano



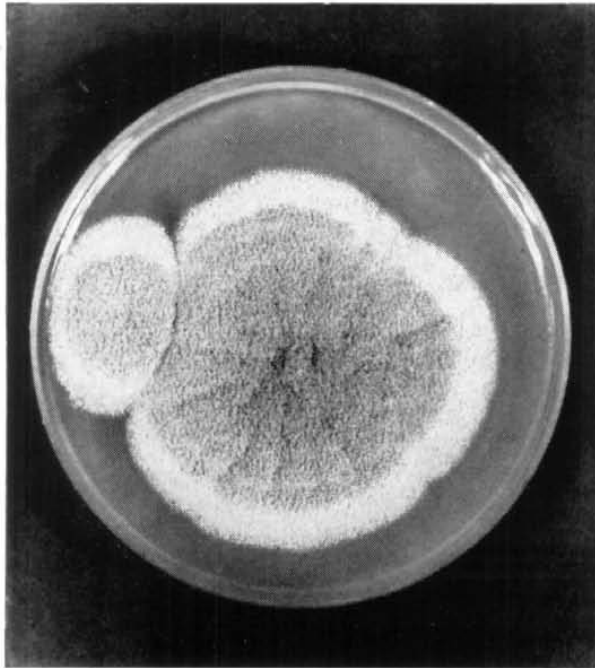
«ASPERGILLUS OCHRACEUS» en medio «Czapek»-agar



«ASPERGILLUS OCHRACEUS» en medio «Czapek»-agar-chitirulano



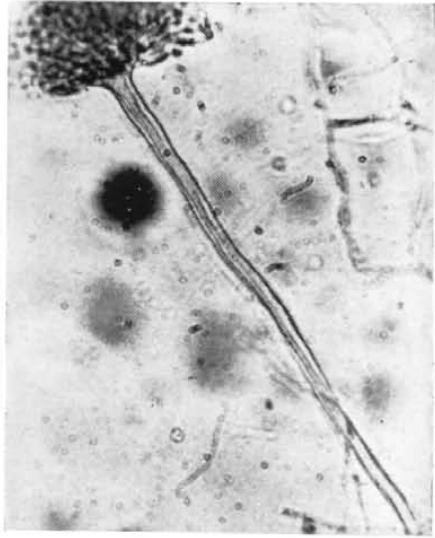
«ASPERGILLUS OCHRACEUS»
Cultivos en medio «Czapek»-agar y «Czapek»-etiluretano.



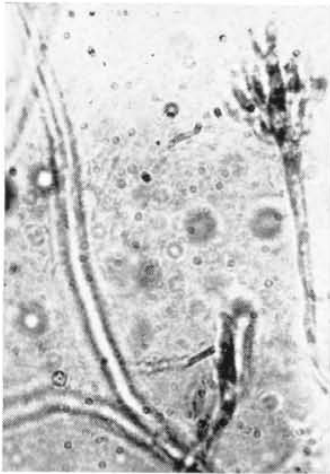
«ASPERGILLUS OCHRACEUS». Colonias en medio «Czapek»-agar



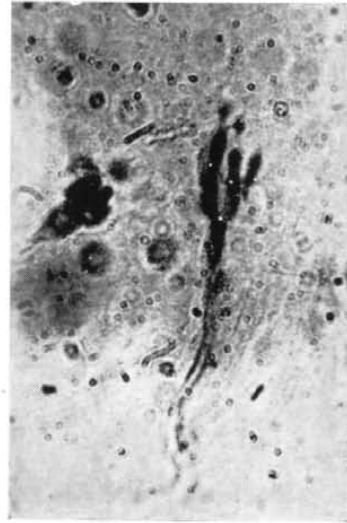
1



2

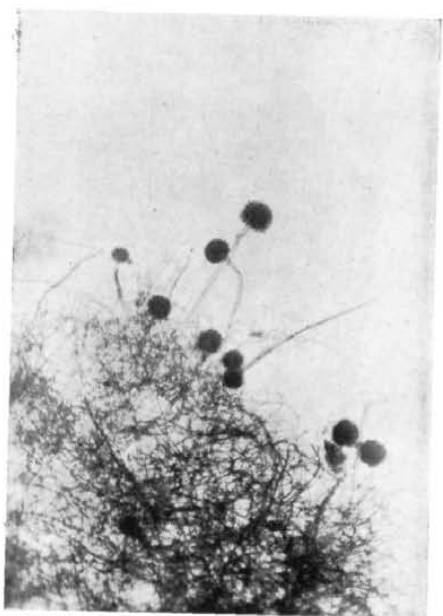


3

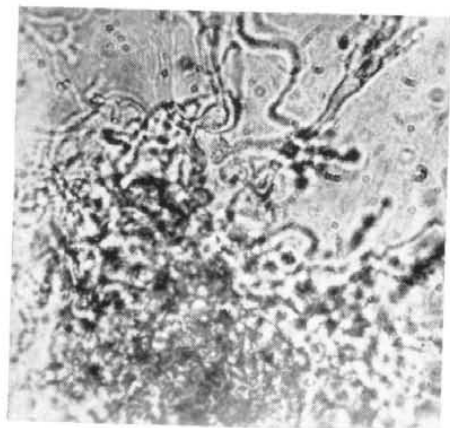


4

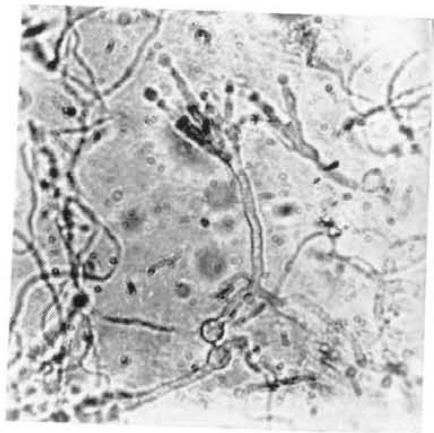
Microfotografías: 1 y 2. Conidióforos del «*ASPERGILLUS OCHRACEUS*» cultivado en líquido «Czapek»; 3 y 4. Conidióforos del «*ASPERGILLUS OCHRACEUS*» en «Czapek-chiluretano»



1



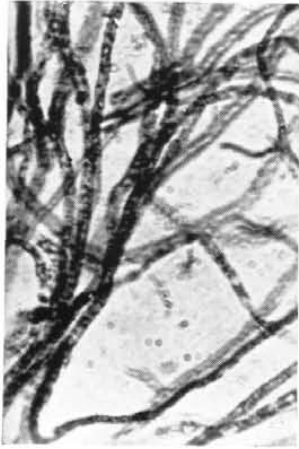
2



3

*Microfotografías de «ASPERGILLUS OCHRACEUS».—1, en medio líquido «Czapek»,
2 y 3, en medio «Czapek»-elilurelano*

UNIVERSIDAD DE MURCIA



1



2



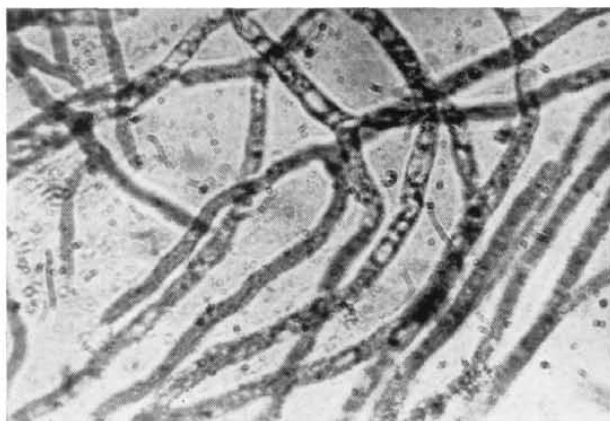
3



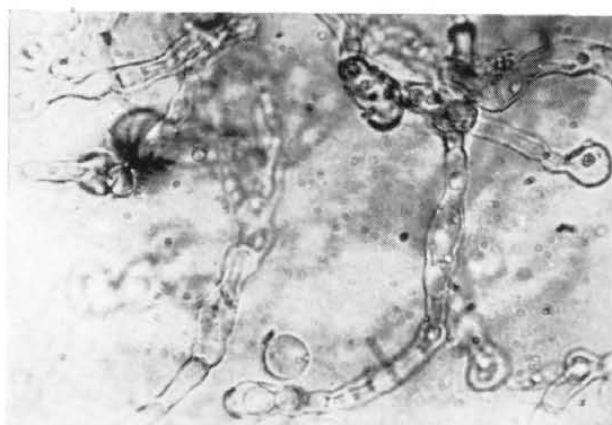
4

Microfotografías: 1, 2, 3 y 4 hifas del «ASPERGILLUS OCHRACEUS» cultivado en líquido «Czapek»





1



2

Microfotografías: 1, Hifas del «*ASPERGILLUS OCHRACEUS*» cultivado en líquido «Czapek».—
2, Células gigantes (clamidósporas y artrósporas) del «*ASPERGILLUS OCHRACEUS*» en
«Czapek» - hidrato de cloral

M E D I D A S

«Aspergillus ochraceus». Cultivado en:

*Medio Czapek**Medio Czapek-etiluretano*

CONIDIÓFOROS :

| | | |
|--------------|--------------------|------------------|
| Valores máx. | 244,8 × 4,2 micras | 102 × 2,7 micras |
| » med. | 176 × 4,2 | 74,8 × 2,4 » |
| » mín. | 156,4 × 4 | 21,7 × 2 » |

CÉLULA BASAL

| | | | | |
|--------------|------------|---|------------|---|
| Valores máx. | 19,6 × 2,8 | » | 47,6 × 3,8 | » |
| » med. | 16,8 × 4,9 | » | 24,4 × 2,7 | » |
| » mín. | 12,6 × 4,9 | » | 8,1 × 2 | » |

VESÍCULAS :

| | | | | |
|--------------|------------|---|-----------|---|
| Valores máx. | 11,2 × 9,8 | » | 8,1 × 4,7 | » |
| » med. | 9,8 × 8,4 | » | 6,8 × 4 | » |
| » mín. | 7 × 7 | » | 4,2 × 3,4 | » |

ESTERIGMAS PRIMARIOS :

| | | | | |
|--------------|-----------|---|-----------|---|
| Valores máx. | 7 × 3,5 | » | 6,8 × 2,7 | » |
| » med. | 7 × 2,1 | » | 5,4 × 2 | » |
| » mín. | 5,6 × 2,8 | » | 4 × 1,3 | » |

*Medio Czapek**Medio Czapek-etiluretano*

ESTERIGMAS SECUNDARIOS

| | | | | |
|--------------|--------------------|-------------------|-----------|-------------------|
| Valores máx. | 12,6 × 1,96 micras | 13,6 × 3,4 micras | 20 micras | <i>aberrantes</i> |
| » med. | 9,8 × 2,8 | 10,8 × 2,7 | 19,9 | » |
| » mín. | 7 × 2,8 | 5,4 × 2 | 15,6 | » |

CONIDIOS :

| | | |
|--------------|------------------|------------------|
| Valores máx. | 4,2 × 4,2 micras | 3,8 × 3,8 micras |
| » med. | 3,5 × 3,5 | 2,9 × 2,9 » |
| » mín. | 3,3 × 3,3 | 2,7 × 2,7 » |

HIFAS :

| | | | |
|--------------|------------|------------|------------|
| Valores máx. | 4,2 micras | 3,8 micras | 6,8 micras |
| » med. | 3,5 | 2,7 | 5,4 |
| » mín. | 1,3 | 1,3 | 4,7 |

Ensanchamientos

VACUOLAS :

| | | |
|--------------|------------------|------------------|
| Valores máx. | 5,9 × 3,5 micras | 5,4 × 3,4 micras |
| » med. | 3,5 × 1,4 » | 2,9 × 2,7 » |
| » mín. | 1,4 × 1,4 » | 1,3 × 1,3 » |

COSPÚSCULOS PROTOPLÁSMICOS :

| | | |
|--------------|--------------|------------------|
| Valores máx. | 2 × 2 micras | 1,5 × 1,5 micras |
| » med. | 0,9 × 0,9 » | 1,3 × 1,3 » |
| » med. | 0,7 × 0,7 » | 1 × 1 » |
| | 0,5 × 0,5 » | 0,6 × 0,6 » |
| » mín. | 0,3 × 0,3 » | 0,4 × 0,4 » |

FORMACION DE CELULAS GIGANTES (CLAMIDOSPORAS Y ARTROSPORAS), INDUCIDAS POR EL HIDRATO DE CLORAL EN EL «ASPERGILLUS OCHRACEUS»

CLAMIDÓSPORAS :

| | |
|--------------|--------------------|
| Valores máx. | 23,1 × 16,3 micras |
| » méd. | 17,6 × 14,2 » |
| » mín. | 13,6 × 13,6 » |

ARTRÓSPORAS :

| | |
|--------------|---------------|
| Valores máx. | 36,7 × 6,1 » |
| » med. | 34,0 × 9,5 » |
| | 34,1 × 13,6 » |
| » mín. | 13,6 × 7,4 » |

CORPÚSCULOS PROTOPLÁSMICOS :

| | |
|--------------|-------------|
| Valores máx. | 5 × 4,3 » |
| » med. | 4 × 3,4 » |
| » mín. | 0,9 × 0,9 » |

MEMBRANA :

1,3 »

CONCLUSIONES

Por el estudio morfológico y micrográfico comparativo del *Aspergillus ochraceus* cultivado en medio normal y substratos conteniendo etil-uretano observamos evidentes cambios morfológicos y estructurales, correspondiéndose con los bioquímicos ya mencionados, que nos permiten catalogar como una *variación del Aspergillus ochraceus*, ésta inducida por dicho agente químico.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- (1) BOLLES, A. y HENNEGUY, F.: *Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique*. París, 1902.
- (2) LOUSTAU, J.: *Clave determinativa de las especies del género Aspergillus*. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1951.
- (3) NEGRONI, P.: *Morfología y Biología de los hongos. Técnica micológica*. Buenos Aires, 1938.
- (4) PUJIULA, J.: *Citología*. Barcelona, 1928.
- (5) THOM, CH. y RAPER, K.: *A Manual of the Aspergillus*. London, 1945.

CONCLUSIONES

1.^a Hemos realizado un estudio desde diversos puntos de vista sobre el comportamiento del «*Aspergillus ochraceus*» cultivado en substratos hidrocarbonados.

Se han tomado como hidratos de carbono *pectina*, *sacarosa* y *glucosa*.

2.^a Hemos comprobado la actividad *pectinásica* y *pectásica* de dicha especie comparándola con las del «*Penicillium chrysogenum*» en el cual ya se había reconocido anteriormente por Phaff, encontrando una pequeña variación pectinásica, a favor del «*Penicillium chrysogenum*».

3.^a Se han comprobado las actividades de *pectinasas* segregadas por ambas especies, encontrando ser mucho más activa la procedente del «*Aspergillus ochraceus*». Este resultado, en comparación con el deducido anteriormente, lleva a la conclusión de que si bien el «*Penicillium chrysogenum*» elabora mayor proporción de enzimas, la del «*Aspergillus ochraceus*» es más activa.

4.^a Se ha estudiado la influencia de los elementos minerales componentes del substrato tipo «Czapek» sobre el metabolismo pectínico del «*Aspergillus ochraceus*», siendo notorio el hecho de que la ausencia del ión fosfato determina una hidrólisis completa de la pectina a ácido galacturónico que posteriormente se metaboliza con gran dificultad.

5.^a Así mismo hemos investigado la influencia del *molibdeno* aportado como molibdato sódico, encontrando una intensificación del metabolismo, máximo para la concentración media utilizada de 0,01 gramos por litro.



6.^a Se estudia la influencia del ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2-4-D), naftaleno y acenafteno sobre el metabolismo del «*Aspergillus ochraceus*», actuando dichas sustancias en muy pequeñas concentraciones sobre el hongo, mediante una nueva técnica en fase aérea en la que se evita la acción perturbadora de los productos en que pueden transformarse aquellas sustancias cuando se encuentran en el medio de cultivo.

Se deduce una intensificación del metabolismo acompañada de una inhibición en el desarrollo del micelio y en la esporulación por el 2-4-D y naftaleno, y menos en el caso del acenafteno.

7.^a Se ha determinado la influencia que estos agentes químicos tienen sobre el metabolismo hidrocarbonado y morfología del «*Aspergillus ochraceus*» a concentraciones variables de etil-uretano, hidrato de cloral y sulfanilida, deduciendo un comportamiento muy específico en el primero, ya que provoca cambios extraordinarios en la morfología del hongo e inhibe el metabolismo de los monosacáridos glucosa y fructosa, sin influir en la secreción de invertasa, si acaso se observa cierta activación. También influye sobre la producción de pigmento con una dosis más óptima del 1 %.

El hidrato de cloral provoca cambios de morfología, pero inhibe tanto el metabolismo de la glucosa y la inversión de la sacarosa como la producción de pigmento.

Con la sulfanilida sólo observamos intensa inhibición en el metabolismo y desarrollo del hongo, no confirmándose sobre él la posibilidad de una acción variante.

8.^a Se han estudiado los cambios morfológicos y micrográficos del «*Aspergillus ochraceus*» frente a los agentes indicados anteriormente y en comparación con el desarrollo sobre substrato normal «Czapek».

9.^a Se hace un estudio de la estructura biofísico-química de los hongos.

Este trabajo se ha realizado en los Laboratorios de Biología y Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia bajo la dirección de los Profesores Loustau y Soler.

Hago presente mi agradecimiento al Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo), al Instituto Alonso Barba del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Agrupación de Fabricantes de Conservas Vegetales de Murcia por la ayuda que me han prestado a lo largo del desarrollo de este trabajo.