

VOLUMEN 17. 1964

OCTUBRE - DICIEMBRE. NUMERO 4

---

# *Microbiología Española*

*publicada por  
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
MADRID

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

## MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

---

### OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

- ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.
- ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.
- ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.
- ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA.
- CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.
- COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.
- CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.
- ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.
- FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.
- GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.
- PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.



## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

---

## INDICE

	Página
Estudio sobre ocho características del <i>Staphylococcus</i> relacionadas con la patogenicidad, por R. Díaz, A. Chordí, A. Rodríguez-Burgos y J. Tormo ... ..	167
Preparación de anticuerpos fluorescentes anti- <i>Rhizobium leguminosarum</i> , por V. Callao y J. Olivares ... ..	181
Un método de coloración de las organelas superficiales de los ciliados hipotricos, por J. Pérez-Silva y Paloma Ramírez-Montesinos ... ..	189
Clasificación de un microorganismo de acción lítica como variedad de <i>Streptomyces violaceus</i> , por E. Muñoz, M. <sup>a</sup> Victoria Elorza y J. R. Villanueva ... ..	195
Valoración de estreptomycinina y derivados con <i>Bacillus licheniformis</i> Alter, por F. Fernández ... ..	209
Resistencia térmica de lactobacilos y levaduras, por M. J. Fernández-Díez y F. González-Cancho ... ..	225
La infraciliación de <i>Frontonia leucas</i> Ehrenberg, por Rosario Gil y J. Pérez-Silva ... ..	239
El próximo Congreso Internacional de Microbiología ... ..	255

# *Microbiología Española*

*publicada por  
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
MADRID

## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

---

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

## INDICE

	Página
Asociación de Parasitólogos Españoles ... ..	67
Aznar, Pilar: véase <i>Cabezas de Herrera</i> , Eulalia ... ..	133
Beltrá, R.: Metabolismo del triptofano por el <i>Pseudomonas savastanoi</i> ... ..	123
<i>Cabezas de Herrera</i> , Eulalia, y Aznar, Pilar: Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. VII. Influencia de la aireación en el metabolismo de los ácidos nucleicos del <i>Staphylococcus aureus</i> irradiado ... ..	133
Callao, V., y Olivares, J.: Preparación de anticuerpos fluorescentes anti- <i>Rhizobium leguminosarum</i> ... ..	181
Cánovas, J. L.; Ruiz-Amil, M., y Losada, M.: Citramalatosintasa en <i>Rhodopseudomonas palustris</i> ... ..	55
Curso sobre Bioquímica de Microorganismos ... ..	67
Chordi, A.: véase Díaz, R. ... ..	167
Díaz, R.; Chordi, A.; Rodríguez-Burgos, A., y Tormo, J.: Estudio sobre ocho características del <i>Staphylococcus</i> relacionadas con la patogenicidad ... ..	167
Dr. Eduardo Gallardo (†) ... ..	65
El próximo Congreso Internacional de Microbiología ... ..	255
Elorza, M. <sup>a</sup> Victoria: véase Muñoz, E. ... ..	195
Fernández, F.: Formas irregulares en <i>Bacillus megaterium</i> ... ..	155
Fernández, F.: Valoración de estreptomycin y derivados con <i>Bacillus licheniformis</i> Alter ... ..	209
Fernández-Díez, M. J., y González-Cancho, F.: Resistencia térmica de lactobacilos y levaduras ... ..	225
García-López, M. D.; García-Mendoza, Concepción, y Villanueva, J. R.: Caracterización del organismo lítico <i>Streptomyces</i> GM productor de strepzima ... ..	15
García-Mendoza, Concepción: véase García-López, M. D. ... ..	15
Gil, Rosario, y Pérez-Silva, J.: La infraciliación de <i>Frontonia acuminata</i> Ehrenberg ... ..	69

	Página
<i>Gil, Rosario, y Pérez-Silva, J.: La infraciliación de Frontonia leucas Ehrenberg ... ..</i>	239
<i>González-Cancho, F.: véase Fernández-Díez, M. J. ... ..</i>	225
<i>Lahoz, R., y Reyes, F.: Variación en la composición química del micelio del Aspergillus terreus durante la autólisis ...</i>	35
<i>Leal, J. A.: Sobre la fisiología de la reproducción sexual de los géneros Phytophthora y Pythium ... ..</i>	63
<i>Losada, M.: véase Cánovas, J. L. ... ..</i>	55
<i>Muñoz, E.; Elorza, M.<sup>a</sup> Victoria, y Villanueva, J. R.: Clasificación de un microorganismo de acción lítica como variedad de Streptomyces violaceus ... ..</i>	195
<i>Olivares, J.: véase Callao, V. ... ..</i>	181
<i>Pérez-Silva, J., y Ramírez-Montesinos, Paloma: Un método de coloración de las organelas superficiales de los ciliados hipotricos ... ..</i>	189
<i>Pérez-Silva, J.: véase Gil, Rosario ... ..</i>	69 y 239
<i>Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa, y Portolés, A.: Actividad antibacteriana de algunas asociaciones antibióticas bi y trivalentes frente a especies de Pseudomonas aeruginosa ... ..</i>	29
<i>Portolés, A.: véase Pérez-Ureña, M.<sup>a</sup> Teresa ... ..</i>	29
<i>Premio «Alonso de Herrera» ... ..</i>	165
<i>Ramírez-Montesinos, Paloma: véase Pérez-Silva, J. ... ..</i>	189
<i>Regueiro, B.: véase Sánchez-Franco, P. ... ..</i>	79 y 105
<i>Reyes, F.: véase Lahoz, R. ... ..</i>	35
<i>Rodríguez-Burgos, A.: véase Díaz, R. ... ..</i>	167
<i>Rubio-Huertos, M.: Estudio al microscopio óptico y electrónico de un virus aislado de Pisum sativum ... ..</i>	1
<i>Ruiz-Amil, M.: véase Cánovas, J. L. ... ..</i>	55
<i>Sánchez-Franco, P., y Regueiro, B.: Estudios sobre la esporulación del Bacillus subtilis ... ..</i>	79
<i>Sánchez-Franco, P., y Regueiro, B.: Estudios sobre la germinación del Bacillus subtilis ... ..</i>	105
<i>Santaolalla, M.: véase Tejerina, Genoveva ... ..</i>	41 y 143
<i>Tejerina, Genoveva, y Santaolalla, M.: Composición química de las paredes celulares de la Erwinia carotovora ... ..</i>	41
<i>Tejerina, Genoveva, y Santaolalla, M.: Actividad pectolítica de Erwinia carotovora ... ..</i>	143
<i>Tormo, J.: véase Díaz, R. ... ..</i>	167
<i>Villanueva, J. R.: véase García-López, M. D. ... ..</i>	15
<i>Villanueva, J. R.: véase Muñoz, E. ... ..</i>	195



UNIVERSIDAD DE NAVARRA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## ESTUDIO SOBRE OCHO CARACTERISTICAS DEL *STAPHYLOCOCCUS* RELACIONADAS CON LA PATOGENICIDAD

por

R. DIAZ(\*), A. CHORDI, A. RODRIGUEZ-BURGOS y J. TORMO

### INTRODUCCION

Es conocido el criterio de patogenicidad del estafilococo, actualmente basado en su capacidad para producir coagulasa. Incluso se afirma que el valor de otras pruebas respecto a la patogenicidad de una cepa depende de la correlación existente con la producción de coagulasa. Las propiedades de producir gelatinasa (6, 24, 29, 30), fosfatasa (3, 16, 42), de ausencia de ureasa (22, 35), de producción de pigmento (8-10, 15, 28), crecimiento en telurito + glicina (11, 32), fermentación anaeróbica del manitol (5, 34, 37), han sido también relacionadas con la patogenicidad, aunque existen sensibles divergencias en la cuantía de correlación con la coagulasa (1, 13, 29, 31, 34, 36-38). También se ha encontrado que la gelatinasa (38) y la fosfatasa (36) son producidas en cantidades muy variables por las diferentes cepas, incluso dentro del grupo de estafilococos.

El objeto del presente trabajo es estudiar las anteriores características relacionadas con la patogenicidad en 212 cepas de estafilococos. Nosotros estábamos interesados en conocer si cada una de estas características estaba ligada más a la cepa que a la especie o grupo. Para

---

(\*) El presente estudio fue realizado durante el disfrute de una beca de la Comisaría de Protección Escolar.

ello, fueron estudiados los tipos de agrupamiento de las actividades bioquímicas. Esperábamos que las características no directamente relacionadas con la especie o grupo pudieran servir, mediante las diferentes combinaciones de características, para esclarecer la ligazón entre las cepas. Por ello, las muestras de enfermos fueron recogidas del mismo ambiente hospitalario.

### MATERIAL Y METODOS

Fueron estudiadas 295 muestras de heces y 145 muestras de secreción nasal. Las muestras fecales eran refrigeradas a 4 °C antes de transcurridas dos horas de su obtención. 1 g de las muestras de heces sólidas, o 1 ml de heces líquidas, era diluido en 10 ml de caldo nutritivo. Una placa de agar salado + manitol (Difco) era inoculada con 0,1 ml de la muestra diluida.

Las muestras de secreción nasal eran obtenidas mediante frotis nasal con una torunda de algodón previamente humedecida en caldo nutritivo. A continuación, la torunda era introducida en caldo nutritivo y el conjunto era incubado a 37 °C, durante dos o tres horas. Al final de este período de incubación se efectuaba una resiembra en agar salado + manitol.

Las colonias de las placas de agar salado + manitol incubadas a 37 °C durante cuarenta y ocho horas eran subcultivadas en caldo BHI (Difco), durante dieciocho horas. Parte de este subcultivo era utilizado para tinción por el método de Gram y para efectuar la prueba de la catalasa usando 1 ml de cultivo. La otra parte del subcultivo era utilizada para efectuar las restantes pruebas. Para el estudio de la producción de coagulasa libre se utilizaba plasma de conejo liofilizado (Difco), de acuerdo con las instrucciones dadas por los fabricantes. Los tubos eran incubados a 37 °C durante tres horas; cualquier grado de coagulación del plasma era anotado como positivo. La fermentación anaeróbica del D-manitol era efectuada de acuerdo con la técnica de Hugh y Leifson (25) modificada por Mossel y Martin (33). El agar utilizado tenía la siguiente composición: Tripticasa (BBL), 10 g; extracto de levaduras (Difco), 1,5 g; púrpura de bromocresol (Difco), 15 mg; agua, 1.000 ml; pH, 7,2. Los tubos de cultivo eran llenados con este agar hasta una altura de 10 cm; calentados durante diez minutos en baño

María, rápidamente enfriados con una mezcla agua + hielo e inmediatamente inoculados.

La producción de pigmento era observada sobre placas del medio Chapman-Stone (Difco), incubadas a 37 °C durante cuarenta y ocho horas. El medio de Chapman-Stone (Difco) era inoculado a partir de un cultivo de dieciocho horas en caldo BHI e incubado a 37 °C durante cuarenta y ocho horas. La aparición de zonas claras alrededor de las colonias era indicio de la licuación de la gelatina.

La capacidad de producir fosfatasa se determinaba de acuerdo con la técnica de Barber y Kuper (4). A 100 ml del medio agar base + sangre (Difco), se añadía 1 ml de una solución al 1 por ciento de la sal sódica del difosfato de fenoltaleína (L. Light, Colnbrook, Inglaterra). Las placas inoculadas eran incubadas dieciocho horas a 37 °C. Las colonias productoras de fosfatasa se volvían rosadas inmediatamente después de su exposición a los vapores de amoníaco.

La actividad hemolítica sobre hematíes de conejo era determinada sobre placas de agar base + sangre (Difco). El agar + sangre era inoculado a partir de un cultivo de dieciocho horas e incubado a 37 °C durante cuarenta y ocho horas, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 20 por ciento.

La tolerancia al oxígeno era determinada de acuerdo con la modificación de Mossel (34) al método de Buttiaux y Cagnon (7). Tubos de 8 mm de diámetro interno conteniendo el medio (Trypticase, 1 g; extracto de levaduras, 0,25 g; glucosa, 0,1 g; clorhidrato de cisteína, 0,05 g; agar, 1,5 g; H<sub>2</sub>O, 100 ml; pH, 7,2) eran calentados al baño María durante diez minutos, enfriados e inoculados en picadura. Los tubos eran incubados durante cuarenta y ocho horas a 37 °C, y se observaba la zona de crecimiento. Una cepa era clasificada de aerobia estricta si solamente formaba colonias en los primeros milímetros superiores de agar. Cuando aparecían colonias distribuidas uniformemente en toda la altura del tubo, la cepa se consideraba anaerobia facultativa.

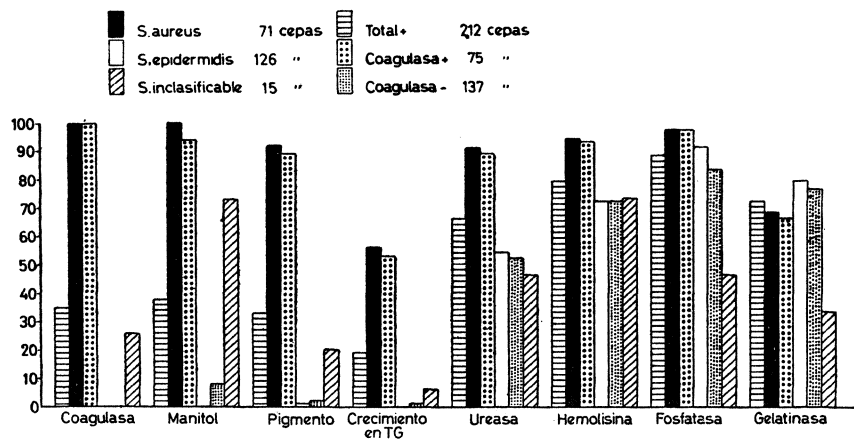
La hidrólisis de la urea era estudiada según la técnica de Christensen, empleando urea + agar base (Difco). La incubación era llevada a cabo a 37 °C durante cuarenta y ocho horas.

El efecto inhibitor del telurito y de la glicina, y la reducción del telurito, fueron observados sobre placas de agar + telurito + glicina + cloruro lítico (Difco) (agar TG) de Zebovitz (43). Las placas eran incubadas a 37 °C durante cuarenta y ocho horas.

## RESULTADOS

En el *cuadro 1* se expone la frecuencia de aparición de *Staphylococcus*. En las 440 muestras estudiadas, la frecuencia de estafilococo en las secreciones nasales (90 por ciento) fue muy superior a la encontrada en heces (20-27 por ciento). Se hallaron un total de 212 cepas, de las cuales 71 fueron *S. aureus* y 15 (33 por ciento) fueron inclasificables. Se encontró mayor proporción de *S. aureus* en las heces diarreicas (64 por ciento) que en las normales (43 por ciento) y también se encontró mayor proporción de *S. aureus* en las secreciones nasales de sujetos hospitalizados (30-40 por ciento) que en los normales sanos no hospitalizados (12 por ciento). En este último grupo de muestras, el predominio de *S. epidermidis* fue considerable. De 50 estafilococos hallados en 52 muestras de secreción nasal de sujetos sanos, 43 (83 por ciento) fueron *S. epidermidis*.

Los resultados de las diferentes pruebas utilizadas en el estudio de los estafilococos se esquematizan en la *figura 1*. En ella se exponen los



*Figura 1. Frecuencia de la positividad de las pruebas en las cepas agrupadas, según la clasificación del manual de Bergey y en relación con la presencia de coagulasa*

porcentajes de frecuencia de pruebas positivas en el número total de cepas, en las especies de la clasificación del manual de Bergey y en los grupos coagulasa-positivo y negativo. La frecuencia de pigmento y el

*Cuadro 1. Frecuencia de aparición de Staphylococcus en las muestras biológicas*

Tipo de muestras	Número de muestras	Muestras con estafilococo		Cepas de <i>S. aureus</i>		Cepas de <i>S. epidermidis</i>		Cepas de <i>S. inclassificable</i>		Número total de cepas halladas
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
SNH, noviembre	49	43	87	15	31	29	61	3	6	47
SNH, junio	44	42	95	18	36	29	57	3	6	50
SN, sanos	52	47	90	6	12	43	83	1	2	50
Heces diarreicas	62	17	27	11	64	5	29	1	5	17
Heces normales	233	48	20	21	43	20	41	7	14	48
Totales	440	117		71		126		15		212

SNH = Secreción nasal de hospitalizados. SN = Secreción nasal.

crecimiento en agar TG se encontró en elevada correlación con las cepas de *Staphylococcus aureus* y las cepas productoras de coagulasa. También se encontraron correlacionadas, aunque en menor cuantía con estas cepas, la ureasa y la hemolisina. En todas ellas se observó que la correlación entre estas pruebas fue mayor en el grupo de cepas de *S. aureus* que en el grupo de cepas coagulasa-positivas. Igualmente, las cepas de *S. epidermidis* dieron menor frecuencia de positividad en estas pruebas que en las cepas coagulasa-negativas. Por otro lado, la diferencia de la presencia de fosfatasa y gelatinasa en las cepas de los grupos coagulasa-positivo y *S. aureus*, era muy similar a las cepas coagulasa-negativas y *S. epidermidis*. Sin embargo, las cepas clasificables mostraron una baja frecuencia de presentación de fosfatasa y gelatinasa, con un porcentaje de positividad a la coagulasa, manitol, pigmento, crecimiento en agar + TG, ureasa y hemolisina intermedio entre el *S. aureus* y el *S. epidermidis*.

El pigmento sobre medio de Chapman fue encontrado en el 92 por ciento de las cepas de *Staphylococcus aureus*, y solamente en el 0,7 por ciento (1 cepa) de las de *S. epidermidis*. Es decir, sólo existieron seis cepas en las cuales el pigmento estuvo en desacuerdo con la clasificación del manual de Bergey.

Todas las cepas de *Staphylococcus epidermidis* fueron inhibidas por el agar TG. Sin embargo, sólo crecieron el 56 por ciento de las cepas de *S. aureus* con producción de colonias negras y por tanto con reducción del telurito. De manera análoga, el 53 por ciento de las cepas coagulasa-positivas, redujeron el agar TG, y solamente una de las coagulasa-negativas crecieron sobre agar TG.

De 71 cepas de *Staphylococcus aureus*, 65 (91 por ciento) fueron ureasa-positivas. Se obtuvo por lo tanto una mayor tendencia de las cepas de *S. aureus* a poseer ureasa.

Todas las cepas mostraron ser anaeróbicas facultativas, excepto una que en principio fue identificada con el género *Staphylococcus* por su morfología, tinción, agrupamiento y presencia de catalasa, pero fue desechada al comprobarse su carácter de aerobia estricta y clasificada de *Micrococcus*.

En el cuadro 2 se expone la distribución de propiedades de las cepas estudiadas. Como se observa, el comportamiento de las cepas fue variable, pero limitado. El número de combinaciones de propiedades con

Cuadro 2. Distribución de propiedades entre las cepas estudiadas

Propiedades	Número de cepas en tipo		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. inclasificable</i>
PGFHOUT	24		
PGFHOU	18	1	
PGFHOT	2		
PFHOUT	9		
PGFOUT	2		
PGFOU	2		
PFHOU	6		2
PFHOT	1		
PFOUT	1		
GFHOU	1	49	
PFHO	2		
GFHO		19	1
GFOU		14	
GHOU		2	
FHOU		7	1
FHOT			1
HOUT	1		
PHO			1
POU	1		
GFO		12	
GHO		2	1
GOU		1	2
FHO	1	3	1
FOH		1	1
HOU		4	
GO			1
FH		1	
FO		5	
HO		3	3
OU		2	

P = Producción de pigmento. G = Gelatinasa. F = Fosfatasa. H = Hemolisis. O = Crecimiento en anaerobiosis. U = Desdoblamiento de urea. T = Crecimiento en agar + telurito + glicina.

arreglo a una casual distribución hubiera sido infinitamente superior. Lo que más destaca es que la combinación de propiedades del *S. aureus* fue diferente de la combinación de propiedades del *S. epidermidis*.

PGFHOUT, PGFHOU, PFHOUT, PFHOU fueron la combinación de propiedades más frecuentes del *Staphylococcus aureus*. Tan sólo un *S. epidermidis* presentó una de estas combinaciones. Estas cuatro combinaciones tenían como características comunes PFHOU. Sólo variaban en su comportamiento frente a la gelatina y al crecimiento en telurito. El 80 por ciento (57 cepas) de los *S. aureus* presentaban alguna de estas combinaciones.

Por el contrario, la combinación de propiedades más frecuentes en las cepas de *Staphylococcus epidermidis* fueron GFHOU, GFHO, GFOU, GFO. Tan sólo un *S. aureus* presentó una de estas combinaciones. Estas cuatro combinaciones presentaron ciertas características comunes al poseer GFO, y el no producir pigmento, y no crecer en agar + TG. Estas dos últimas propiedades fueron presentadas por todas las cepas de *S. epidermidis* excepto una. Todas estas cepas variaban en su comportamiento frente a la hemólisis y producción de ureasa. El 75 por ciento de las 126 cepas de *S. epidermidis* presentaron estas características.

## DISCUSION

Muchas clasificaciones se han sugerido para los cocos gram-positivos y catalasa-positivos. Algunos autores sitúan todos estos microorganismos en un simple género o grupo, y otros en dos o más géneros. Shaw y colaboradores (38) sitúan todos estos organismos en el género *Staphylococcus*. Hill (22) encuentra que los miembros del género *Staphylococcus* de Shaw y colaboradores era mejor dividirlos en dos géneros: *Staphylococcus* y *Micrococcus*, según formen o no ácido de la glucosa aeróbicamente.

Evans y colaboradores (19) proponen la misma clasificación, pero de acuerdo con el crecimiento y producción de ácido anaeróbicamente. Este criterio es la base de la clasificación de la última edición del Manual de Bergey (5). Finalmente, Mossel (33) propone la misma clasificación genérica, pero basada solamente en la tolerancia al oxígeno. Los aeróbicos obligados son clasificados como *Micrococcus*, y los anaeróbicos obligados son clasificados como *Micrococcus*, y los anaeróbicos



facultativos como *Staphylococcus*. Nosotros hemos seguido esta última clasificación por su utilidad.

También existen diversas clasificaciones para los grupos del género *Staphylococcus*. Es admitido de manera general que las cepas coagulasa-negativas poseen muchos puntos semejantes. Van Eseltine (41) propone clasificar «el grupo de *Micrococcus-Staphylococcus* en dos géneros», de acuerdo con el comportamiento de la coagulasa. Cowan y Shaw (14) los incluyen dentro del mismo género, pero subdivididos con arreglo a esta característica.

Nosotros hemos seguido la clasificación del estafilococo de la última edición del Manual de Bergey (5). Sin embargo, se ha efectuado un agrupamiento con arreglo a la producción de coagulasa, para comparar, en los resultados obtenidos, cuál forma el grupo más natural. Entre las 212 cepas hemos encontrado 15 (7 por ciento) inclasificables, de acuerdo con la última edición del manual citado. Si hubiéramos seguido la clasificación de Baird-Parker (3), en seis subgrupos de *Staphylococcus*, también hubiéramos encontrado ocho inclasificables. Por otro lado, diversos autores que han utilizado esta clasificación han encontrado porcentajes similares de cepas inclasificables. Con el manitol aeróbico se encuentra del 20 (21, 40) al 9 por ciento (27); con el manitol anaeróbico se han encontrado de 0 (17, 20) al 4 por ciento (17, 37) de estafilococos inclasificables.

Aunque teóricamente las pruebas *in vitro* debieran ser capaces de detectar los factores químicos que constituyen la virulencia y la patogenicidad, sin embargo, en la práctica esto no es posible todavía. Mucha confusión existe en este campo. Eleck (16) revisa este concepto, y solamente parece encontrarse en relación con la patogenicidad la producción de coagulasa, fosfatasa, hemolisina, y la capacidad de fermentar el manitol. En nuestro estudio hemos incluido además el estudio de la gelatinasa, el crecimiento en TG y el pigmento, cuya relación con la coagulasa y con la patogenicidad es discutida.

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* mostraron colonias blancas. Esto ya ha sido observado por diferentes autores. Han sido encontradas variaciones en la aparición de pigmento, relacionadas con la presencia de anhídrido carbónico y con el medio de cultivo empleado. Chapman (8) y Kooistra y Seller (28) encuentran que sobre agar + leche aparece la pigmentación más intensa. Sin embargo, el mismo Chapman (9-10) comprueba, años más tarde, que el agar salado + manitol con rojo de fenol

favorece la cromogénesis. Anteriormente (15) estudiamos comparativamente estos dos medios en presencia de CO<sub>2</sub>, obteniendo mejores resultados con el medio de Chapman.

En el presente trabajo encontramos que el 8 por ciento de los *Staphylococcus aureus* y el 11 por ciento de los coagulasa-positivos mostraban colonias blancas. Estos resultados concuerdan con los hallados por Hoeprich (24), Jay (26) y Mossel (34), que oscilan del 4 al 13 por ciento en los estafilococos coagulasa-positivos.

La presencia de gelatinasa no fue significativa para diferenciar un grupo de otro. Elek (16), al revisar este tema, encuentra que no es de valor esta propiedad para la clasificación del estafilococo, y que no está en relación con la producción de coagulasa, hemolisina, ni con la virulencia de la cepa. Además, es producida en cantidades muy variables por las diferentes cepas (38), y las condiciones de cultivo influyen notablemente. Esto explica las diferencias encontradas por los diversos autores. Unos encuentran baja frecuencia de cepas gelatinasa-positivas (13, 29) en *Staphylococcus* coagulasa-positivos, y otros encuentran escasa diferencia entre las cepas coagulasa-positivas y coagulasa-negativas (24, 30), e incluso se ha encontrado gelatinasa en el 100 por ciento de los estafilococos coagulasa-negativos y positivos.

Buena correlación ha sido encontrada entre la coagulasa y la fosfatasa por muchos autores (3, 16, 42). En nuestra casuística, el 97 por ciento de las cepas coagulasa-positivas mostraron ser fosfatasa-positivas. Sin embargo, no se observó correlación entre estas propiedades en las cepas coagulasa-negativas ni en las de *Staphylococcus epidermidis*. Por otro lado, Akatov y Lebedev (1) no encuentran correlación entre fosfatasa y coagulasa, y Reparaz (37) halla unos resultados similares a los descritos por nosotros. Es más, Pan y Blumenthal (36) encuentran que los estafilococos coagulasa-negativos producen fosfatasa, que cuantitativamente alcanza la cifra media de 40 unidades. La única diferencia con los coagulasa-positivos es cualitativa; estos últimos producen una cifra media de 19 unidades, aunque algunas cepas coagulasa-negativas producen más fosfatasa que las cepas coagulasa-positivas. Los resultados de la ureasa en relación con las cepas coagulasa-positivas y negativas concuerdan perfectamente con las encontradas por Mossel (35). Sin embargo, están en desacuerdo con las encontradas por Fusillo (22) y Muller (35).

Todas nuestras cepas de *S. epidermidis* y todas, excepto una, de las

de estafilococos coagulasa-negativos, fueron inhibidas por el agar + TG. Esto concuerda con los resultados de Baird Parker (2), Chapman (11) y Moore y Nelson (32). Sólo el 56 por ciento de los estafilococos coagulasa-positivos crecían en agar + TG y reducían el telurito, en desacuerdo con lo hallado por los anteriores autores. Sin embargo, Menolasino y colaboradores (31) estudian 150 cepas de *Staphylococcus*, y sólo el 65 por ciento crecieron sobre TG. Ellos conseguían hacer crecer estas cepas inhibidas, cuando la siembra la efectuaba a partir de un subcultivo sobre agar + sangre.

En nuestra casuística hemos encontrado efectivamente que el *Staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa-positivos, tienen una actividad enzimática más acusada que el *S. epidermidis* y los estafilococos coagulasa-negativos. Sin embargo, las diferencias en relación con la ureasa, hemolisina, fosfatasa y gelatinasa son poco acusadas. Burns y Holtman (6) han mostrado que casi todas las cepas obtenidas de lesiones supurativas de la piel dan reacciones más positivas que las cepas obtenidas de otras fuentes. Krynski y colaboradores (29) observan que las actividades bioquímicas parecen estar de acuerdo con la virulencia. También encuentran considerables diferencias entre los resultados hallados con cepas procedentes de enfermos y las procedentes de nariz y garganta de sanos. Los estafilococos de heridas supuradas y de otros procesos supurativos, dan los resultados de actividad bioquímica más elevada. Burns y Holtman formulan la hipótesis de que los estafilococos virulentos son bioquímicamente más activos que los avirulentos.

La poca diferencia de actividad entre *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* frente a algunas de las pruebas utilizadas en este trabajo, parece en un principio estar en desacuerdo con los hallazgos descritos anteriormente. Sin embargo, la agrupación de los estafilococos estudiados de acuerdo con sus concretas capacidades bioquímicas (cuadro 2) demuestran claramente esta hipótesis de Burns y Holtman. Casi la totalidad de las cepas de *S. aureus* eran positivas a cinco o más de las pruebas utilizadas y, exceptuando un grupo, la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* eran positivas solamente a cuatro o menos de las pruebas empleadas.

La distribución de tipos bioquímicos hallados parece ser también de interés. A excepción del pigmento, y crecimiento en agar + TG, las propiedades para la clasificación del tipo bioquímico no mostraron grandes diferencias entre *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*. Por

ello, cabía esperar que la distribución del tipo bioquímico sería semejante a especies. Sin embargo, esto no fue así. Excepto en tres cepas, los tipos bioquímicos presentados por el *S. aureus* no aparecían en el *S. epidermidis*, y a la inversa. Esto hace pensar en la posibilidad de que las propiedades bioquímicas estén ligadas, unas, a la especie, pero las otras, a la cepa dentro de la especie. En otro trabajo (12) se estudia esta posibilidad.

Las diferencias tan acusadas de los tipos bioquímicos entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* demuestra que esta clasificación recoge grupos naturales diferentes. Como se expresó anteriormente, en la clasificación de grupos o especies por ensayos fisiológicos y bioquímicos, dentro del género estafilococo existe controversia. Algunos los clasifican en relación con su comportamiento con la coagulasa (14, 41); otros, por su comportamiento frente a la coagulasa y al manitol (5), y otros, respecto a múltiples propiedades (3). Sin embargo, es de capital importancia en la bacteriología clínica la rápida separación entre los estafilococos patógenos y los comensales o saprofitos. Por ahora, el criterio aceptado de patogenicidad de un estafilococo es la capacidad de producir estafilococulasa. Posiblemente, la simplicidad de esta técnica es el motivo de su frecuente uso. En nuestro trabajo (*figura 1*) los resultados de las pruebas ligadas a la patogenicidad estaban más estrictamente relacionadas con el *S. aureus* que con los estafilococos coagulasa-positivos. Todas las pruebas tuvieron mayor porcentaje de frecuencia en las cepas de *S. aureus* que en las cepas coagulasa-positivas. Por ello y por los tipos bioquímicos peculiares, nosotros creemos que la clasificación del manual de Bergey constituye un grupo más homogéneo y natural que la clasificación basada exclusivamente en la prueba de la coagulasa.

#### RESUMEN

Doscientas doce cepas de *Staphylococcus* aisladas de 440 muestras biológicas humanas fueron estudiadas por la producción de coagulasa, fermentación del manitol, producción de pigmento, crecimiento en telurito + glicina, licuefacción de la gelatina, producción de fosfatasa, hidrólisis de la urea y producción de hemólisis. Las cuatro primeras pruebas estaban correlacionadas entre sí y con las cepas de *S. aureus*.

Las cuatro últimas pruebas eran específicas del *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, los tipos de agrupación bioquímica de las cepas de *S. aureus* fueron diferentes de los tipos bioquímicos presentados por *S. epidermidis*.

### SUMMARY

In 212 *Staphylococcus* strains isolated from 440 human samples the following characteristics were studied: coagulase production, manitol fermentation, pigment production, growth in tellurite-glycine, gelatin liquefaction, phosphatase production, urea hidrolisis and the production of hemolysis. The first four tests were interrelated with each other and with the strains of *Staphylococcus aureus*.

The last four were not specific for *Staphylococcus aureus*. However, the types of biochemical grouping of the *S. aureus* strains were different from the biochemical types presented by the *S. epidermidis*.

### BIBLIOGRAFIA

1. AKATOV, A. K., y LEBEDEV, Z. I. 1961. Antibiotiki, 6, 363.
2. BAIRD-PARKER, A. C. 1962. J. Appl. Bacteriol., 25, 12.
3. BAIRD-PARKER, A. C. 1963. J. Gen. Microbiol., 30, 409.
4. BARBER, M., y KUPER, S. W. A. 1951. J. Pathol. Bacteriol., 63, 65.
5. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 1957. 7.<sup>a</sup> edición. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
6. BURNS, J., y HOLTMAN, D. F. 1960. Ann. N. Y. Acad. Sci., 88, 1.115.
7. BUTTIAUX, R., y GAGNON, P. 1959. Ann. Inst. Pasteur Lille, 10, 121.
8. CHAPMAN, G. H. 1943. J. Bacteriol., 45, 405.
9. CHAPMAN, G. H. 1945. J. Bacteriol., 50, 201.
10. CHAPMAN, G. H. 1946. J. Bacteriol., 51, 409.
11. CHAPMAN, G. H. 1949. J. Bacteriol., 58, 823.
12. CHORDI, A.; DÍAZ, R.; TORMO, J., y RODRÍGUEZ-BURGOS, A. 1964. Rev. Med. Univ. Navarra, 8, 172.
13. CLARK, W. S.; MOORE, T. D., y NELSON, F. E. 1961. Appl. Microbiol., 9, 595.
14. COWAN, S. T., y SHAW, C. 1949. J. Gen. Microbiol., 3, 69.
15. DÍAZ, R.; CHORDI, A.; RODRÍGUEZ-BURGOS, A., y TORMO, J. 1964. En preparación.
16. ELEK, S. D. 1959. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. Livingstone Ltd., Londres.
17. EVANS, J. B. 1947. J. Bacteriol., 54, 266.

18. EVANS, J. B. 1948. *J. Bacteriol.*, 55, 793.
19. EVANS, J. B.; BRADFORD, W. C., y NIVEN, C. F. 1955. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxonomy*, 5, 61.
20. FAHLBERG, W. J., y MARSTON, J. 1959. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 102, 349.
21. FINEGOLD, S., y SWEENEY, E. 1961. *J. Bacteriol.*, 81, 637.
22. FUSILLO, M. A., y JAFFURS, W. J. 1955. *J. Bacteriol.*, 70, 481.
23. HILL, L. R. 1959. *J. Gen. Microbiol.*, 20, 277.
24. HOEFRICH, P. D.; CROFT, G. F., y WEST, L. M. 1960. *J. Lab. Clin. Med.*, 55, 120.
25. HUGH, R., y LEIFSON, E. 1953. *J. Bacteriol.*, 66, 24.
26. JAG, J. M. 1962. *Appl. Microbiol.*, 10, 247.
27. KIMLER, A. 1962. *J. Bacteriol.*, 83, 207.
28. KOOISTRA, J. A., y SELLEERS, W. 1957. *Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists)*, 57, 98.
29. KRYSKI, S.; KEDZIA, W.; BECLA, E., y KRASOWSKI, A. 1962. *Ann. Inst. Pasteur*, 102, 231.
30. LEVY, E. 1952. Tesis doctoral. Universidad de Londres.
31. MENOLASINO, N. J.; GRIEVES, B., y PAYNE, P. 1960. *J. Lab. Clin. Med.*, 56.
32. MOORE, T. D., y NELSON, F. E. 1962. *J. Milk Food Technol.*, 25, 124.
33. MOSSEL, D. A. A. 1962. *J. Bacteriol.*, 84, 1.140.
34. MOSSEL, D. A. A., y MARTIN, G. 1961. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 12, 225.
35. MULLER, H., y HORN, M. 1962. *Zentr. Bakteriolog., Parasitenk., Abt. I. Orig.*, 187, 308.
36. PAN, I. L., y BLUMENTHAL, J. H. 1961. *J. Bacteriol.*, 82, 124.
37. REPARAZ, J. 1964. Tesis doctoral. Universidad de Navarra.
38. RICHOV, R., y KOVRILSKY, R. 1954. *Rev. Pathol. Gen. Comparee*, 54, 1.405.
39. SHAW, C.; STITT, J. M., y COWAN, S. T. 1951. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 1.010.
40. TAURASO, N. M., y WHITE, D. A. 1963. *Am. J. Diseases Children*, 105, 164.
41. VAN ESELTINE, W. P. 1955. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxonomy*, 5, 53.
42. VOGELSSANG, T. M.; WORMNES, A., y OSTERVOLD, B. 1962. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 54, 218.
43. ZEBOVITZ, E.; EVANS, J. B., y NIVEN, C. F. 1955. *J. Bacteriol.*, 70, 686.

C. S. I. C.  
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN. GRANADA

## PREPARACION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES ANTI-RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM (\*)

por

V. CALLAO y J. OLIVARES

### INTRODUCCION

La tinción inmunofluorescente, empleada para investigar la presencia de antígenos corpusculares o moleculares, fuera o dentro de un tejido, por simple observación microscópica, se basa en unir a un anticuerpo un compuesto fluorescente, de tal forma que aquél no pierda su capacidad de reaccionar con su antígeno a la vez que le comunica fluorescencia y lo hace, por tanto, visible a la luz ultravioleta.

En 1942, Coons y colaboradores (5) crearon esta técnica con el objeto de localizar antígenos en el interior de tejidos animales. Intentaron reconocer neumococos en tejidos de ratones que habían sido previamente inoculados, para lo que prepararon el colorante fluorescente que debía ser conjugado con el correspondiente anticuerpo, en este caso suero anti-neumocócico, tipo III.

Desde estas experiencias, además de las imprescindibles modificaciones que perfeccionan el método, se ha realizado una serie de intentos para llevar la técnica en cuestión a casi todos los campos posibles de aplicación, la mayoría de las veces con evidente éxito, ya que incluye considerables ventajas sobre otros procedimientos de localización directa o indirecta de microorganismos, estructuras celulares, enzimas, etc.

A la vista de la bibliografía consultada, donde se aprecia la falta casi

---

(\*) Este trabajo es parte del realizado mediante una beca de la Fundación «Juan March», a la que expresamos nuestro agradecimiento.

absoluta de trabajos referentes al empleo de esta técnica a los diversos aspectos de la Biología Vegetal, hemos escogido el estudio de la localización de los *Rhizobium* en el interior de los tejidos radicales de las leguminosas, para conocer las ventajas que el método de los anticuerpos fluorescentes puede presentar en su aplicación a la investigación en el campo de las plantas.

## MATERIAL Y METODOS

### *Obtención de antisueros*

Se prepararon para nuestras experiencias dos tipos de sueros: de conejo anti-*Rhizobium leguminosarum* (var Rh. leg<sub>v-1</sub>) y de cabrito anti-gammaglobulina de conejo. El primero destinado a las tinciones directas y el segundo, a las indirectas.

Para la obtención de sueros anti-*Rhizobium* se inocularon conejos en la vena marginal de la oreja con una suspensión de 20.000 millones de células/ml, a las dosis convenientes y siguiendo la pauta normalmente utilizada. La masa microbiana, muy joven, se obtuvo por cultivo sobre medio 79 de Allen (1), en frascos de Roux.

Transcurrido el tiempo de inmunización realizamos sangrías de prueba de la misma vena citada o directa del corazón, y la sangría a muerte, cuando la riqueza en anticuerpos era suficientemente alta, por disección de la carótida y recogida de la sangre en tubos estériles, donde se separa el suero. Posteriormente se valora según el método patrón de aglutinación al límite, y adicionado de mertiolato al 1/10.000 se conserva en nevera.

Con gammaglobulina de conejo purificada inmunizamos un cabrito de tres meses de edad, como hicimos anteriormente en conejo. Como vía de inoculación escogimos la yugular, mucho más asequible que en este animal, e hicimos las sangrías de prueba y a muerte de la misma vena y de la carótida, respectivamente, pero en el último caso empleando ligera anestesia con éter para facilitar el manejo del inquieto animal.

La apreciación cualitativa de precipitinas se obtuvo con la simple técnica de los tubos capilares, donde el gasto de antisuero es mínimo. La reacción cuantitativa la llevamos a cabo en tubos de hemólisis, poniendo en contacto cantidades constantes de anticuerpo frente a de-



crecientes de antígeno, a 37 °C. La zona de equivalencia estará tanto más próxima al primer tubo cuanto mayor sea el contenido en precipitación del suero problema. También valoramos por precipitación en gel siguiendo a Darcy (6), prueba un tanto más precisa, aunque con alguna complicación.

#### *Purificación de la gammaglobulina*

Para la purificación de la gammaglobulina, donde se encuentran la mayor parte de los anticuerpos que nos interesan, se precipitaron los sueros con sulfato amónico a semisaturación, o con una solución de sulfato amónico y cloruro sódico (7), que da asimismo buenos resultados. El residuo de globulina después de varias reprecipitaciones se disuelve en la mínima cantidad de agua destilada y se dializa frente a solución salina tamponada a pH 7,5 en frío, hasta la eliminación total del sulfato amónico, que es detectado por nessler o solución saturada de cloruro bórico. Por electroforesis comprobamos la pureza. Aunque se han descrito procedimientos que utilizan el suero completo marcado, existe una menor probabilidad de darse tinciones inespecíficas si se usa sólo la gammaglobulina marcada.

Terminado el proceso de purificación se determina la concentración de proteína en la solución final, valorando el nitrógeno por micro-Kjeldahl o por el método de Lowry y colaboradores (12). Conviene que dicha concentración no sea muy inferior al 1 por ciento.

#### *Marca de la globulina con colorantes fluorescentes*

Numerosos compuestos fluorescentes han sido descritos como susceptibles de ser unidos a las proteínas y comunicarles sus características fluorescencias. Nosotros hemos empleado el isotiocianato de fluoresceína —que llamaremos para abreviar ITF—y el isotiocianato de rodamina —ITR—, el primero, de fluorescencia verde amarillenta, y el segundo, rojo naranja.

En Beutner (2), Borek (3), Coons (4), Nairn (13-14), etc., se describen los procedimientos seguidos para la marca de los anticuerpos.

Nosotros hemos operado de la siguiente manera: a un volumen —sobre 10 cm<sup>3</sup>—de solución de gammaglobulina en baño de hielo le añadimos, agitando, la décima parte de tampón carbonato-bicarbonato 0,5 M; pH, 9,4.

La operación de conjugación la realizamos en tubo ancho, 35 mm  $\times$  10 cm, cuya boca va obturada por un agitador de varilla modelo «Gri-Cel». Por una ranura del tapón pasamos un tubo, por donde dejamos caer el ITF cristalizado, o la solución en acetona fría del ITR, lo más lentamente posible, sobre la solución de proteína tamponada, a la vez que se agita la mezcla.

No debemos olvidar que tres factores son importantes para que la reacción entre el colorante y la proteína se lleve a buen efecto: a) pH del medio entre 9 y 9,5, para que se origine la combinación química entre el grupo isotiocianico ( $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ) del fluorocromo y el amino de los aminoácidos de la proteína; b) una continua agitación circular, la suficiente para una buena mezcla, pero no excesiva, para evitar la formación de espuma, y c) la adecuada refrigeración, por colocación del tubo donde se opera en un baño de hielo, que se mantiene el tiempo requerido si todo el sistema se dispone en cámara frigorífica regulada de 0°-4 °C.

Tanto este tiempo como la proporción de ITF e ITR/g de proteína que son necesarios emplear para conseguir éxito, han sido motivo de numerosos trabajos, entre otros el de Griffin y colaboradores (10). Nosotros hemos tomado un tiempo medio de doce-dieciocho horas y una razón colorante/proteína que se ha variado a lo largo de nuestras experiencias, con vistas a obtener el máximo rendimiento con el mínimo de inespecificidad. La más óptima creemos es 1:75 o incluso 1:100 (0,0135 ó 0,010 mg de colorante/mg de proteína, respectivamente). Si empleamos concentraciones más altas de fluorocromo se conjugan demasiados grupos aminos de la gammaglobulina, originándose una alta inespecificidad, imposible de eliminar. Con las relaciones antes citadas deben usarse preparados de proteína de alto título en anticuerpos.

Terminada la operación de conjugación se requiere la eliminación del resto de colorante libre para conseguir la máxima especificidad en la tinción. El procedimiento de elección ha sido la filtración del conjugado a través de una columna de sephadex G-25, de sección y altura adecuados al volumen de la solución de proteína a purificar—George y Walton (9)—, recogiendo las fracciones de mayor densidad óptica para 280  $m\mu$ —correspondiente a la proteína—y menor para 490 ó 560  $m\mu$ —correspondientes al ITF e ITR, respectivamente—. Los otros procedimientos para eliminar las tinciones inespecíficas: adsorción con carbón, diálisis frente a solución salina prolongada por seis-ocho días,

tratamientos con resinas de intercambio iónico, adsorción con polvo de tejidos, etc., que hemos usado no consiguen el efecto del sephadex—dextrano modificado producido por «Pharmacia», de Uppsala—. Antes de proceder de cualquiera de estos modos, por simple diálisis del conjugado por veinticuatro horas frente a solución salina tamponada, se lleva al pH adecuado.

Estos tratamientos determinan una dilución mayor o menor de la solución original. Para concentrarla modificamos el dispositivo de Kohn (11), ideando otro con igual fundamento: diálisis de la solución frente a polivinilpirrolidona en polvo (15). También usamos con el mismo objeto el sephadex, según Flodin y colaboradores (8).

La solución de proteína marcada libre de restos inespecíficos se conserva en nevera a 4 °C, adicionada de mertiolato o liofilizada hasta su uso.

### *Tinción*

Dos modos de teñir pueden seguirse: tinción directa e indirecta. La primera pone en contacto el anticuerpo marcado y el antígeno correspondiente, la segunda utiliza anti-gammaglobulina de conejo marcada que se une al complejo antígeno-anticuerpo. Esta última presenta las ventajas de utilizar una sola proteína marcada para teñir varios antígenos, con tal que sus anticuerpos se hayan obtenido en conejos, y asimismo, corresponden más moléculas marcadas por cada una de antígeno, originándose una mayor luminosidad.

#### *Tinción directa*

Sobre portaobjetos ordinarios, delgados y muy limpios se deposita una suspensión del antígeno a teñir o un corte fino—obtenido previa congelación o inclusión en parafina—donde nos interese localizarlo. Fijadas las preparaciones por calor suave, alcohol metílico, etc., se cubren con una o varias gotas de la solución del anticuerpo marcado y se llevan a cámara húmeda durante treinta minutos, a la temperatura ambiente. Lavamos después con solución salina tamponada a pH 7,8, tres veces, cada una por diez minutos, y secamos cuidadosamente con papel de filtro. Hasta hacer la observación pueden transcurrir, a lo sumo, quince días en nevera.

### *Tinción indirecta*

Como veremos, es doble de la anterior. Fijada la preparación se cubre con unas gotas de solución de anticuerpo sin marcar y deja actuar media hora en las condiciones vistas. Después de lavada y seca, se deposita sobre ella la solución de antigammaglobulina de conejo marcada, continuando como si se tratara de una simple tinción directa.

### *Observación*

Sobre la preparación se coloca un cubreobjetos interponiendo glicerina tamponada con el 10 por ciento de solución salina, pH 7,8, y se observa al microscopio con luz ultravioleta. Hemos utilizado un leitz, dialux, provisto de equipo de fluorescencia Leitz con mechero de mercurio Philips CS 150. Como filtro sensibilizador, el marcado UG 1 2,5 mm y barrera, el OG 1 2,5 mm. Se utilizó condensador de fondo oscuro para todas las observaciones.

## RESULTADOS

Ha sido posible comprobar cómo este método de tinción por anticuerpos fluorescentes puede ser de máxima utilidad en el estudio de algunos aspectos de la Biología Vegetal, sobre todo el relativo a las enfermedades infecciosas. Las bacterias teñidas con sus correspondientes anticuerpos marcados, son perfectamente visibles en el interior de los tejidos vegetales, previa tinción de los cortes obtenidos.

Los *Rhizobium* han podido ser observados en las distintas etapas del desarrollo de los nódulos que originan, exceptuándose los primeros estadios de infección, durante el paso de las bacterias a lo largo de los pelos radicales, pues estos presentan una intensa autofluorescencia natural de color verde, que imposibilita toda apreciación, aún empleando fluorocromos de distinto color, por ejemplo, de fluorescencia roja.

## DISCUSION

La mayor dificultad que hemos encontrado ha radicado en la obtención de un anticuerpo marcado que tiñera de un modo totalmente específico y con la suficiente intensidad al antígeno correspondiente.

Gracias al empleo de soluciones de proteína de alto título en anticuerpos, a una relación colorante/proteína lo más baja posible y al tratamiento de los conjugados con sephadex, ha sido posible conseguirlo.

Teniendo en cuenta que las células vegetales presentan una característica fluorescencia natural de color verde, para obtener resultados óptimos debemos utilizar los anticuerpos conjugados con isotiocianato de rodamina, pues su fluorescencia roja contrasta con la natural verde. El método puede fallar en los casos en que se intente localizar antígenos en el interior de tejidos o células con alta autofluorescencia.

Con respecto a las alteraciones que los anticuerpos pudieran sufrir con la operación de la marca, disentimos de los que opinan que tal operación lleva consigo una pérdida importante en su actividad reaccionante. Nosotros sólo hemos observado que en las reacciones de precipitación hay una disminución de la avidéz, o sea, un aumento del tiempo requerido para aparecer los flóculos del complejo antígeno-anticuerpo, que va de doce minutos, para el caso de precipitinas no marcadas, a treinta, cuando se han conjugado.

Para la obtención de buenas fotografías, dada la escasa luminosidad de las preparaciones, es necesario utilizar mecheros de mercurio de 200 'W como mínimo, y siempre empleando películas para color—luz de día—de la mayor sensibilidad posible. Con nuestra lámpara, de 150 W, hemos encontrado serias dificultades para conseguir buenos originales, pese a haber operado con material fotográfico de alta calidad.

#### RESUMEN

Han sido marcados con isotiocianato de fluoresceína e isotiocianato de rodamina los anticuerpos anti-*Rhizobium leguminosarum*. Estas bacterias han podido ser perfectamente observadas en las distintas etapas del desarrollo de los nódulos que originan en las raíces de las leguminosas.

Se ha comprobado que el método de tinción por anticuerpos fluorescentes puede ser de máxima utilidad en el estudio de algunos aspectos de la Biología Vegetal, sobre todo en el relativo a las enfermedades infecciosas.

## SUMMARY

Anti-*Rhizobium leguminosarum* antibodies have been labeled with fluorescein isothiocyanate and rhodamine isothiocyanate. These bacteria have been perfectly observed in leguminous nodules in different stages of their development.

It has been proved that the fluorescent antibody method is very useful in the study of some aspects of Plant Biology, specially in infectious diseases.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, O. N. 1957. Experiments in Soil Bacteriology. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Min., 177 págs.
2. BEUTNER, H. 1961. Immunofluorescent staining. The fluorescent antibody method. Bacteriol. Rev., 25, 49-76.
3. BOREK, F. D. 1961. The fluorescent antibody method in medical and biological research. Bull. World. Health Organ., 24, 249-56.
4. COONS, A. H. 1954. Labeled antigens and antibodies. Ann. Rev. Microbiol., 8, 333-52.
5. COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. M., y BERLINER, E. 1942. The demonstration of pneumococcal antigens in tissues by the use of fluorescent antibody. J. Immunol., 45, 157-70.
6. DARCY, D. A. 1960. A quantitative application of the agar-diffusion plate: the estimation of specific proteins in serum. Immunology, 3, 325-35.
7. FLEURY, P. 1959. Fiches techniques de chimie biologique. Suplemento núm. 6.
8. FLODIN, P.; GELOTTE, B., y PORATH, J. 1960. A method for concentrating solutes of high molecular weight. Nature, 188, 493-94.
9. GEORGE, W., y WALTON, K. W. 1961. Purification and concentration of dye-proteins conjugates by gel filtration. Nature, 192, 1.188-89.
10. GRIFFIN, C. W.; CARSKI, T. R., y WARNER, G. S. 1961. Labeling procedures employing crystalline fluorescein isothiocyanate. J. Bacteriol., 82, 534-37.
11. KOHN, J. 1959. A simple method for the concentration of fluids containing protein. Nature, 183, 1.055.
12. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, H. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. 1951. J. Biol. Chem., 193, 265.
13. NAIRN, R. C. 1961. La detección de proteínas fluorescentes y el método de anticuerpos fluorescentes. Endeavour, XX, 78-84.
14. NAIRN, R. C. 1962. Fluorescent protein tracing. E. and S. Livingstone Ltd., Edimburgo y Londres.
15. OLIVARES, J. 1964. Algunos aspectos de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* y aplicación al estudio de la misma de los anticuerpos fluorescentes. Ars Pharm. (en prensa).

C. S. I. C.  
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

## UN METODO DE COLORACION DE LAS ORGANELAS SUPERFICIALES DE LOS CILIADOS HIPOTRICOS

por

J. PEREZ-SILVA y PALOMA RAMIREZ-MONTESINOS

### INTRODUCCION

La taxonomía de los Ciliados hipotricos se basa principalmente en el número y disposición de los cirros así como en la morfología de la membrana ondulante y de la zona adoral de membranelas.

Para poner de manifiesto estas organelas superficiales se han ideado algunos métodos de coloración, como son los de Dragesco (2), Gelei (3), Kirby (4), Noland (5) y Turner (8). También se ha pretendido deducir las características de las organelas superficiales basándose en métodos argénticos (1), los cuales ponen de manifiesto la infraciliación de las mismas.

Al aplicar los métodos mencionados en el estudio citológico de una especie del género *Oxytricha*—aislada por nosotros de una muestra de musgo recogida en la fuente que existe en el patio del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid)—no logramos resultados satisfactorios; estos métodos, o bien causaban una deformación acusada, o bien no daban el contraste suficiente para poder observar con claridad los cirros, especialmente los ventrales y transversales.

Después de una serie de tanteos previos llegamos a un procedimien-

---

(\*) Comunicación presentada en el XXVI Congreso Luso-Español para el Progreso de las Ciencias. Oporto, junio de 1962.

to mediante el cual se pueden poner de manifiesto con bastante claridad las organelas externas, no sólo de la especie objeto de nuestro estudio, sino también de otras especies del género *Oxytricha* y de otros géneros como *Stylonichia*, *Keronopsis* y *Urostyla*. Nuestro procedimiento consiste esencialmente en la fijación con tetraóxido de osmio, coloración con cristal violeta y mordentado con glicerina yodada.

El fijador es una solución acuosa de tetraóxido de osmio al 2 por ciento, tamponada a un pH de 7,6, según Palade (6).

La solución de cristal violeta se prepara partiendo de una solución alcohólica concentrada, cuya composición es la siguiente:

Cristal violeta ... ..	2 g
Etanol de 96° ... ..	20 ml

Esta solución se puede conservar por largo tiempo, siempre que esté herméticamente cerrada para evitar la evaporación del disolvente.

Para usar el colorante se añade una gota de dicha solución a 5 ml de agua destilada. Conviene que esta solución esté recién preparada, aunque se puede usar durante una semana.

La glicerina yodada se prepara mezclando 1 parte de solución de lugol y 2 partes de glicerina. La solución de lugol consta de

Yoduro potásico... ..	0,6 g
Yodo ... ..	0,3 g
Agua destilada ... ..	90 ml

## METODO

En un portaobjetos excavado se colocan unas gotas del cultivo de protozoos y, mediante una fina pipeta, se va retirando líquido hasta dejar el material concentrado en una mínima cantidad de agua.

Se añade una gota del fijador y se deja actuar durante unos minutos; luego se dejan caer de una a tres gotas (según el número de individuos) de la solución de cristal violeta y, bajo la lupa, se observa la coloración progresiva de las organelas superficiales hasta que éstas hayan tomado una intensa coloración violeta (esto suele ocurrir a los dos-cuatro minutos). En este momento se detiene la coloración mediante la adición de una gota de glicerina yodada.



Los protozoos así teñidos se recogen con una fina pipeta y se colocan en una gota de glicerina entre dos cubreobjetos. El conjunto se monta sobre un portaobjetos, al que se fija mediante parafina.

En las preparaciones bien teñidas, las organelas superficiales (cilios, cirros, membranas y membranelas) toman una intensa coloración violeta que destaca sobre un fondo ligeramente teñido de violeta (*figuras 1-4*).

### DISCUSION

Como ya hemos dicho, las técnicas que hemos encontrado en la literatura no son aplicables a la especie que nosotros venimos estudiando; las técnicas de Noland (5) y de Turner (8) fallan en la fijación, puesto que los protozoos experimentan una gran deformación y en muchos casos llegan a romperse; las técnicas de Dragesco (2), Gelei (3) y Kirby (4), si bien no deforman apenas, no establecen un contraste suficiente.

Concretándonos sólo a los métodos de coloración de las organelas superficiales, vemos en nuestro método la ventaja de que los individuos no se deforman o lo hacen muy poco, circunstancia que consideramos interesante cuando se trata de fijar la posición relativa de los cirros y demás organelas sobre la superficie del cuerpo del protozoo.

Otra de las ventajas, si bien secundaria, de nuestro método es que el montaje de las preparaciones entre dos cubreobjetos permite observar todos los individuos por el lado ventral, ya que se puede examinar la preparación por ambas caras.

La desventaja que presentan casi todos estos métodos, incluyendo el nuestro, es que las preparaciones que se obtienen no son durables, sino que su duración es de uno o dos días. Por otro lado, las técnicas que se basan en la impregnación argéntica (1), si bien dan preparaciones permanentes, no ponen de manifiesto la propia ciliación, sino su infraciliación y, por consiguiente, presuponen el hecho de que existe una correspondencia entre ciliación e infraciliación, hecho que, según recientes observaciones (6), no parece ser cierto en todos los casos.

Las desventajas mencionadas hablan de la necesidad de un método que sea aplicable a todos los hipotricos, con el que se podrían homologar resultados y obviar los inconvenientes que surgen cuando se trata de identificar una especie.

## RESUMEN

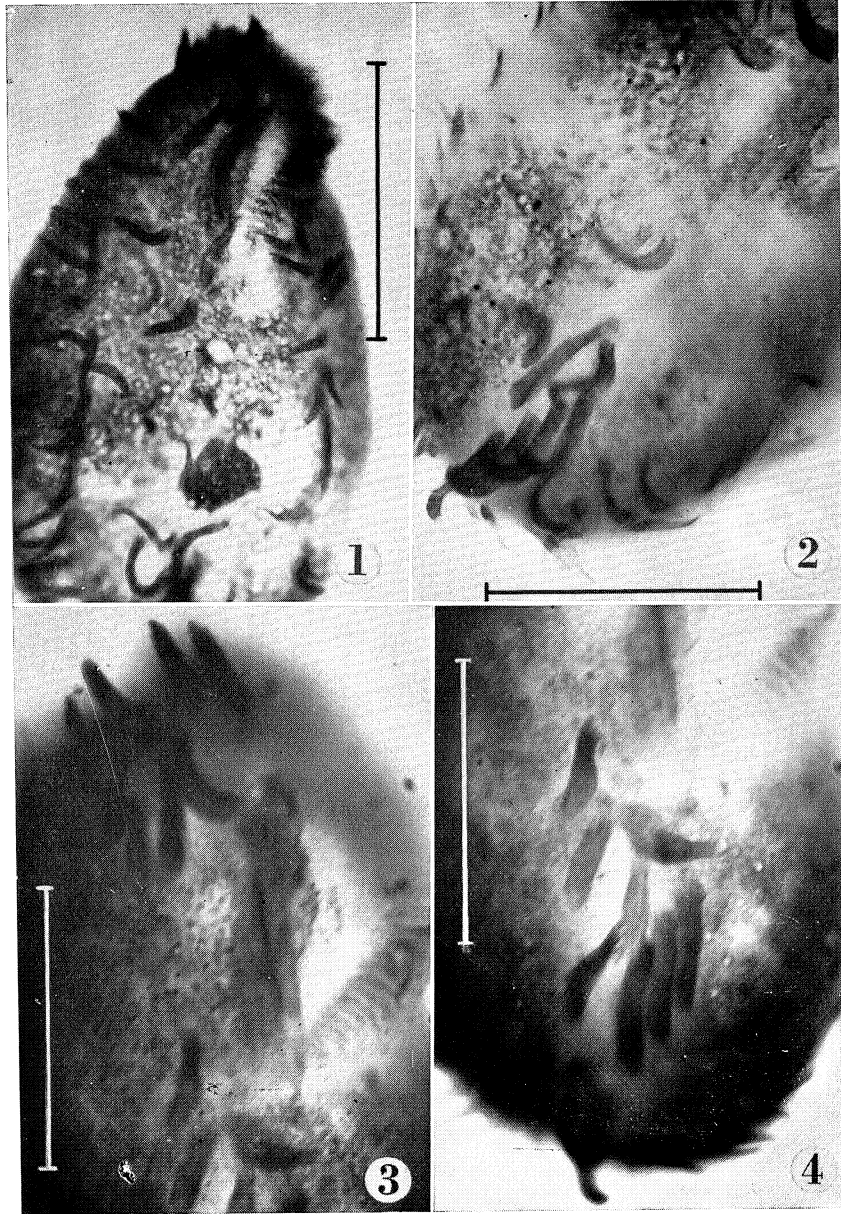
Se describe un método para poner de manifiesto las organelas superficiales de los holotricos, que consiste en fijación con tetraóxido de osmio, coloración con una solución diluida de cristal violeta y tratamiento ulterior con glicerina yodada.

## SUMMARY

A method for demonstrating the external organelles of hypotrichous ciliates is given. This method consists essentially of fixation by buffered 2 per cent osmium tetroxide solution, staining with dilute solution of crystal violet, followed by treatment with iodine-glycerine.

## BIBLIOGRAFIA

1. CORLISS, J. O. 1953. Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton-Lwoff technic. *Stain Technol.*, 28, 97-100.
2. DRAGESCO, J. 1962. L'orientation actuelle de la systématique des ciliés et la technique d'imprégnation au protéinate d'argent. *Bull. Microscop. Appl.*, 11, 49-58.
3. GELEI, J. VON. 1927. Eine neue Osmium-Toluidinmethode für Protistenforschung. *Mikrokosmos*, 20, 97-103.
4. KIRBY, H. 1950. *Materials and methods in the study of Protozoa*. Univ. California Press, Berkeley y Los Angeles.
5. NOLAND, L. E. 1928. A combined fixative and stain for demonstrating flagella and cilia in temporary mounts. *Science*, 67, 535.
6. PALADE, G. E. 1952. A study of fixation for electron microscopy. *J. Exptl. Med.*, 95, 285-98.
7. PÉREZ-SILVA, J., y GIL, R. 1962. Algunas observaciones sobre el aparato bucal de *Frontonia* (Ciliado, Holotrico). *Microbiol Españ.*, 15, 187-98.
8. TURNER (Jr.), H. J. 1954. An improved method of staining the external organelles of Hypotrichs. *J. Protozool.*, 1, 18-19.



Figuras 1-4. Distintas especies de hipotricos, en las que se han teñido las organelas superficiales. |—| = 50  $\mu$ . 1) *Oxytricha* sp. Se puede observar la membrana ondulante y los cirros frontales, marginales y ventrales. 2) *Stylonichia* sp. Cirros transversales y ventrales. 3-4) *Stylonichia* sp. Ambas fotomicrografías corresponden a un mismo individuo. En la figura 3 se enfocan los cirros frontales y la membrana ondulante, y en la 4, los cirros ventrales y transversales

C. S. I. C.  
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA  
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL  
SECCION DE BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DEL SUELO

## CLASIFICACION DE UN MICROORGANISMO DE ACCION LITICA COMO VARIEDAD DE *STREPTOMYCES VIOLACEUS*

por

E. MUÑOZ (\*), M.<sup>a</sup> VICTORIA ELORZA y J. R. VILLANUEVA

### INTRODUCCION

Un microorganismo seleccionado por su capacidad de utilización de paredes celulares de levaduras, de acuerdo con la técnica de Salton (3, 8) fue elegido para la realización de un trabajo encaminado a tratar de separar y caracterizar, en lo posible, los sistemas enzimáticos responsables de las acciones líticas sobre las paredes celulares de los organismos sensibles.

Pensamos que, dado el interés que ofrecían sus propiedades, se podía proceder a un estudio minucioso y detallado que nos permitiera determinar su posición sistemática.

### MATERIAL Y METODOS

#### *Medios de cultivo*

##### *Medio GAE*

Compuesto de dos soluciones. La solución A consta de: glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; agua destilada, 500 ml. Se esteriliza sometiéndola a corriente de vapor durante treinta minu-

---

(\*) Becario de la Fundación «Juan March».

tos a lo largo de tres días. La solución B lleva  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 0,01 g; agua, 500 ml. Esta solución se esteriliza a 130 °C durante treinta minutos.

Esterilizadas las dos soluciones, se mezclan. Se solidifica por adición de agar al 1,5 por ciento.

*Medio de agar + caldo + tirosina*

Peptona, 10 g; extracto de carne, 5 g;  $\text{ClNa}$ , 8,5 g; L-tirosina, 5 g; agua, 1.000 ml. Se solidifica por la adición de 20 g de agar.

*Medio de agar + caldo + almidón*

Este medio presenta la siguiente composición, adaptada por nosotros: peptona, 10 g; extracto de carne, 5 g;  $\text{ClNa}$ , 8,5 g; almidón de patata, 10 g; agar, 15 g; agua, 1.000 ml. El pH final, 7,0.

*Medio de gelatina*

Peptona, 5 g; extracto de carne, 3 g; gelatina, 120 g; agua, 1.000 ml.

*Medio productor de ácido sulfhídrico*

Este medio, descrito por Tressner y Danga (10), lleva: peptona + hierro + agar (Difco), 360 g; extracto de levadura, 1 g; agua destilada, 1.000 ml.

*Medio de agar + glicerina + malato*

$\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,2 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 0,5 g;  $\text{ClNa}$ , 0,01 g;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,05 g; ácido málico, 0,2 g; glicerina, 10 ml; agar, 20 g; agua, 1.000 ml; pH final, 7,0.

*Medio de glucosa + nitrato*

$\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 1 g;  $\text{NO}_3\text{Na}$ , 1 g; glucosa, 10 g; agua, 1.000 ml.

*Medio de sacarosa + nitrato*

$\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 1 g;  $\text{NO}_3\text{Na}$ , 1 g; sacarosa, 10 g; agua, 1.000 ml.

*Medio de glicerina + nitrato*

$\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 1 g;  $\text{NO}_3\text{Na}$ , 1 g; glicerina, 10 ml; agua, 1.000 ml.

*Medio de agar + sangre*

A 100 ml de agar fundido se le añaden 10 ml de sangre estéril. Se reparte en placas.

*Medio de agar + caseína*

Este medio, descrito por Gordon y Smith (4), se prepara del modo siguiente: se suspende leche desnatada en agua. Se añade un volumen igual de una disolución de agar al 2 por ciento en agua. Se esterilizan en autoclave, separadamente, a 121 °C, durante veinte minutos, y se dejan enfriar a 45 °C. Se mezclan y se vierten en placa estéril.

*Paredes celulares del organismo*

Se efectuó el desarrollo en medio GAE. Las células procedentes de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento, se recogían por centrifugación, se lavaban tres veces con agua destilada y, finalmente, se resuspendían en agua destilada, con una densidad aproximada de 10 mg/ml, de peso seco.

Las paredes celulares aisladas se prepararon por el método de Salton (9), utilizando el desintegrador de Mickle y añadiendo la suspensión de células y polvo de vidrio Ballotini del núm. 12, en proporciones iguales. La rotura se seguía por observación microscópica. Este método de preparación de paredes celulares, descrito por Salton y Horne (9), ha sido mejorado por García-Mendoza y Villanueva (2).

*Análisis cromatográfico*

Previa hidrólisis de las paredes celulares obtenidas por el procedimiento descrito, se procedió a la detección del aminoácido  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimélico ( $\alpha$ - $\epsilon$ -DAP). Se practicó cromatografía monodimensional descendente, utilizando papel Whatman núm. 1 y como disolvente la mezcla metanol + agua + ClH 10 N + piridina, en las proporciones 80 : 17,5 : 25 : 10 (v/v).

El disolvente se dejó correr durante dieciséis horas. Como revelador se utilizó ninhidrina (B. D. H.) disuelta en acetona (0,2 por ciento, p/v). Las manchas de ácido  $\alpha$ - $\epsilon$ -DAP aparecían con un color verde característico, después de calentar a 100 °C durante cinco minutos, que,

posteriormente, cambia a color amarillo estable. Con este método se consiguió una buena separación de la forma LL del ácido  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimélico.

## RESULTADOS

### A) Caracteres genéricos del microorganismo seleccionado

El organismo seleccionado por su actividad lítica sobre paredes celulares de levaduras, presentaba macroscópicamente al cultivarse en distintos medios de cultivo, sólidos, colonias características del género *Streptomyces*. Eran de apariencia compacta, con aspecto cónico y superficie seca. Se presentaban cubiertas de micelio aéreo.

Cuando el organismo se cultivaba en medio GAE líquido, mostraba el típico crecimiento en masas esféricas compactas, dejando el medio claro.

En la observación microscópica (*figura 1*) se presentaba como un organismo que se podía incluir dentro del orden Actinomycetales por constar de células filamentosas ramificadas, y entre el género *Streptomyces* por estar formado por un micelio vegetativo que no se fragmenta y micelio aéreo con esporas o conidios en cadenas.

Entre las especies próximas a las del género *Streptomyces* se encuentran las pertenecientes al género *Nocardia*, géneros entre los que fácilmente se puede producir confusión cuando los estudios se basan en propiedades morfológicas o fisiológicas.

Para una mayor seguridad y confirmación del microorganismo objeto de nuestro estudio se acudió a los nuevos criterios de clasificación de Cummins y Harris (1), basados en las propiedades bioquímicas de las paredes celulares de los *Streptomyces*, como son la sensibilidad a la lisozima y la presencia de una de las formas isoméricas del ácido diaminopimélico.

Se observó la sensibilidad al ataque de las paredes celulares por lisozima incubando una suspensión de paredes celulares (0,5 ml) con 0,2 ml de ClNa al 10 por ciento, 0,2 ml de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 1 por ciento, 0,5 ml de una solución de lisozima (SIGMA) con concentración de 1 mg/ml y completando el volumen hasta 3 ml con tampón de fosfato sódico 0,1 M, a un pH de 6,0. La incubación se efectuaba a 37 °C, y se observaba el proceso de digestión lítica por observación microscópica

o por los cambios en la densidad óptica en los distintos tiempos de incubación. La lectura de la densidad óptica se verificó a 600 m $\mu$ , utilizando un spectronic de la casa Bausch Lomb. El microorganismo seleccionado se mostró sensible a la acción de la lisozima. Otra propiedad, extraordinariamente característica e importante, es la presencia de ácido  $\alpha$ - $\epsilon$ -DAP, que presenta las características de ser el isómero LL en las paredes celulares de especies del género *Streptomyces*, como describen Hoare y Work (5). La presencia de este aminoácido y en su forma LL, detectada por el procedimiento cromatográfico descrito en el apartado de material y métodos, fue una prueba más que nos permitía clasificar y confirmar el microorganismo seleccionado con el nombre genérico de *Streptomyces* y designado como *Streptomyces* MR.

#### B) Caracterización específica del *Streptomyces* MR

Para la caracterización e identificación de las especies del género *Streptomyces* se atiende a una serie de factores. Entre éstos deben considerarse los siguientes.

##### *Propiedades morfológicas*

Presenta un interés especial el micelio aéreo. Este micelio suele ser más grueso que el micelio vegetativo y mientras la morfología del micelio vegetativo es, generalmente, indiferenciada, esa morfología del micelio aéreo de los *Streptomyces* presenta, bajo condiciones de cultivo determinadas, suficiente diferenciación para constituir un factor importante en la sistemática de las especies del género *Streptomyces*. En relación con el micelio aéreo, hay que considerar tanto su aspecto macroscópico como sus propiedades microscópicas. Atendiendo a éstas se han establecido una serie de sistemas de clasificación de especies (7, 11).

Es particularmente importante el trabajo de Pridham (7); en él considera la morfología de los esporóforos como un carácter estable, en condiciones nutricionales definidas.

Para estudiar la morfología de los esporóforos, se sembró el *Streptomyces* MR en un cuadrado de medio GAE + agar, colocado sobre un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos. El conjunto se dispone en el interior de una placa de Petri, estéril, con un algodón humedecido para mantener la humedad y se incuba en estufa a 25 °C. Durante los días de cultivo se va observando al microscopio de contraste de fases. Micros-



cópicamente, un corto número de esporóforos se presenta con forma recta, mientras que una mayor proporción de los mismos aparece en forma de asa o cayado. No se observa ninguna espiral (*figura 1*).

Por estas características podemos incluir al *Streptomyces* MR dentro de la sección *retinaculum apertum*. Sembrado en tubos de medio de GAE + agar, el micelio aéreo adquiere en la madurez color gris, por lo que, dentro de la sección *retinaculum apertum*, se le incluye en la serie «gris».

*Morfología de las esporas.* Las esporas del *Streptomyces* MR son muy diversas en su forma (ovales, cilíndricas) y presentan cubierta lisa.

#### *Propiedades bioquímicas*

##### *1) Formación de melanina y ácido sulfhídrico*

El *Streptomyces* MR no produjo coloración marrón en los diferentes medios nutritivos proteicos ensayados. Sin embargo, en el medio de agar + caldo + tirosina apareció pigmento de color marrón y una extensa zona de lisis (*figura 3*), fenómenos que se manifiestan al cuarto día de incubación a 25°-27 °C, en condiciones estáticas.

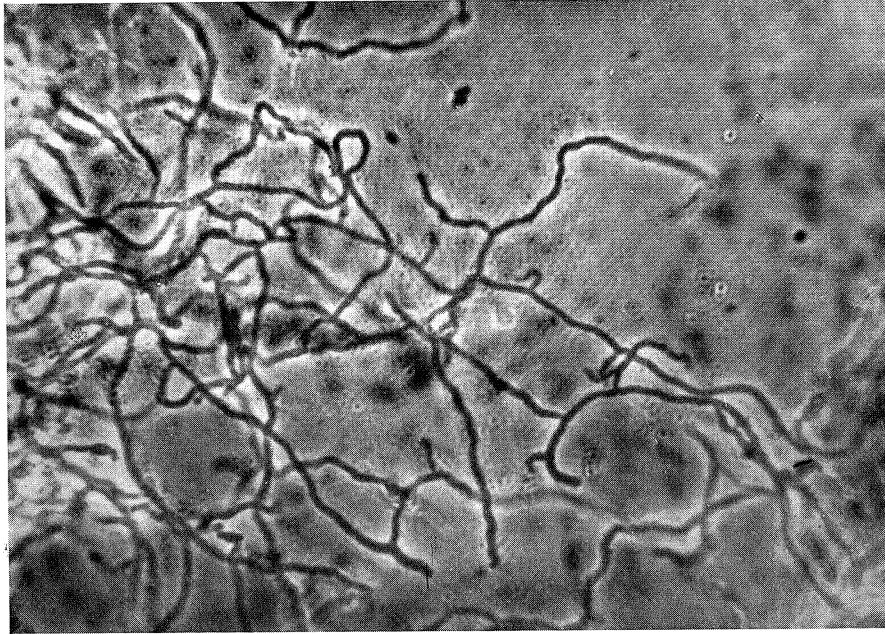
Sembrado en peptona + hierro + agar, mostró desarrollo, sin presencia de micelio aéreo, incluso a los veintiocho días de incubación. No se produjo coloración negra.

Se puede concluir que se trata de un microorganismo sulfhídrico-negativo, tirosinasa-positivo y, bajo determinadas condiciones, melanino-positivo.

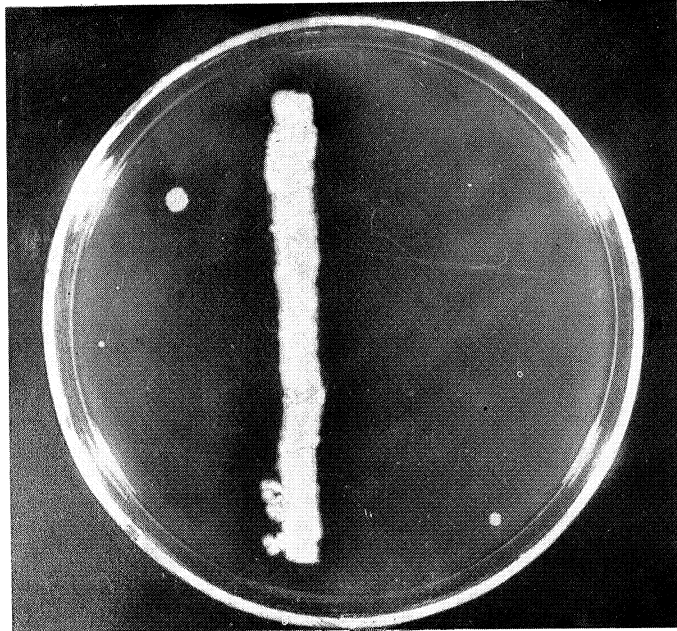
##### *2) Proteólisis*

Para seguir este fenómeno de lisis de distintas proteínas se sembró el organismo en una serie de diferentes medios (agar + caseína, gelatina). Se observó el desarrollo en distintos días de cultivo. El *Streptomyces* mostraba fluidificación de la gelatina muy lenta, ya que la fluidificación total sólo se alcanzaba a los dieciocho-veinte días de cultivo. Dentro de los diez primeros días de incubación, la fluidificación era muy débil ( $\pm$ ) entre el quinto y el sexto día y débil (+) en los tres días siguientes.

En el medio agar + caseína aparecía una zona de lisis (+) no demasiado extensa, al tercer día de cultivo. No aumentaba en los tiempos de incubación sucesivos.



*Figura 1. Microfotografía al microscopio de contraste de fases del Streptomyces M. R.*



*Figura 2. Hemólisis por Streptomyces M. R.*

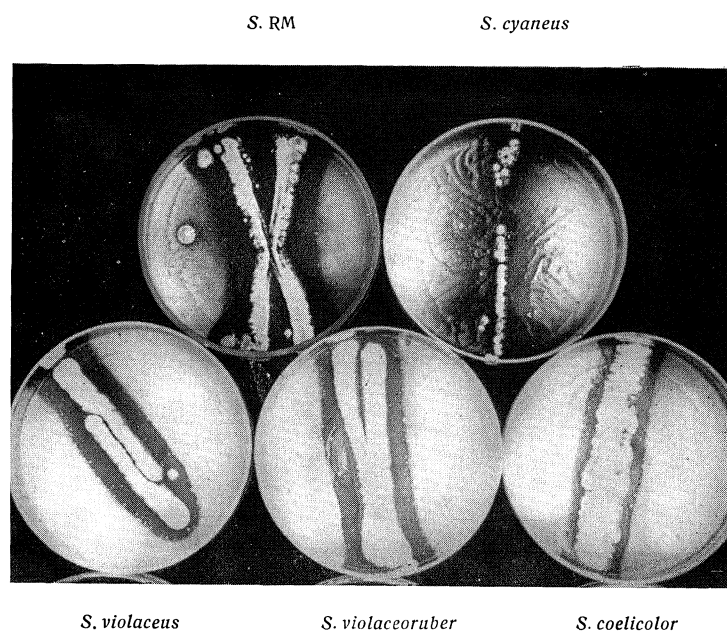


Figura 3. Desarrollo de los Streptomyces en agar + tirosina

### 3) Hidrólisis de almidón

Sembrando en placas con agar + almidón se observó un buen crecimiento, pero la hidrólisis, seguida por coloración con lugol, era bastante débil.

### 4) Utilización de nitratos

Para estudiar la posibilidad de *Streptomyces* MR en la utilización de nitratos como fuente única de nitrógeno, se sembró por duplicado en los medios que se describen y en los que como fuente nitrogenada se utiliza nitrato, mientras que, como fuente carbonada, se utiliza glucosa, glicerina o sacarosa.

A los diez días de incubación se investigó la presencia de nitritos en la primera serie de tubos, con el reactivo de Griess (mezcla de ácido sulfanílico y  $\alpha$ -naftilamina), acidulando con  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Se observó reacción positiva (coloración rosa fuerte) en glucosa + nitrato y glicerina + nitrato. Reacción negativa en sacarosa + nitrato.

En la segunda serie de tubos, se repitió la reacción a los veinte días de cultivo. La reacción seguía siendo negativa en sacarosa + nitrato. Era fuertemente positiva en glicerina + nitrato y débilmente positiva en glucosa + nitrato, indicándonos una posible utilización de nitritos por *Streptomyces* MR en este último caso.

### 5) Hemólisis

Se sembró el organismo objeto de nuestro estudio en placas con agar + sangre y después de incubación a 25°-27 °C se observaba una zona de lisis, al cabo de cuatro-cinco días de cultivo (*figura 2*).

### 6) Antibiosis

Se han realizado pruebas de actividad antibiótica frente a los siguientes microorganismos: *Candida utilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium culmorum*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas siringae*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus*. Sólo mostraba débil actividad frente a *B. subtilis*.

## DISCUSION

Atendiendo a la clasificación de especies del género *Streptomyces*, según el sistema originalmente usado por Waksman y Curtis (12) y modificado por Waksman y Jensen (12), nos encontramos como primera disyuntiva, que nos hace seguir un camino, con el hecho de que los esporóforos de *Streptomyces* MR no están dispuestos en verticilos. El siguiente paso en la clave viene dado por la producción o ausencia de pigmento en medios proteínicos. Es decir, si hay reacción melanino-positiva o melanino-negativa. El *Streptomyces* MR sólo aparece como melanino-positivo en determinadas condiciones. A partir de este punto, producción de pigmento oscuro en medios proteicos, la clave de clasificación se orienta hacia las diferencias de color que presentan en su desarrollo sobre medios sintéticos los *Streptomyces*. Teniendo en cuenta este carácter, *Streptomyces* MR produce pigmento azul cuando crece sobre medio GAE. La única especie descrita como melanino-positiva y capaz de producir pigmento azulado en medio GAE es el *S. cyaneus*. Si consideramos al *Streptomyces* MR como melanino-negativo, nos encontramos con otros tres microorganismos que producen pigmento y desarrollo azul en medios sintéticos. Son éstos: *S. coelicolor*, *S. violaceoruber* y *S. violaceus*.

Con objeto de determinar la especie del *Streptomyces* MR se realizó un estudio comparativo frente a las especies anteriormente mencionadas, de las que se disponía en la Colección Española de Cultivos Tipo. Las cepas utilizadas y su procedencia son: *Streptomyces coelicolor* número 3.080 Hopwood A-3, *S. violaceoruber* núm. 3.086 Kutzner 673 Waksman Curtis, *S. cyaneus* núm. 3.110 H112 Todorovic Beograd y *S. violaceus* H5-CBS Baarn.

En los estudios comparativos realizados con las cuatro especies mencionadas y el *Streptomyces* MR objeto de nuestro trabajo, nos encontramos con que el mayor número de semejanzas se presentan entre los *S. violaceus* y *Streptomyces* MR. Los cuadros 1 y 2 ofrecen un resumen de estos estudios comparativos.

Cuadro 1. Estudio comparativo de los diferentes *Streptomyces* ensayados sobre distintos medios de cultivo (10.º día de incubación)

Medios de cultivo	<i>Streptomyces</i> MR	<i>S. violaceus</i>	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. cyaneus</i>	<i>S. violaceoruber</i>
Almidón (hidrólisis)	débil	débil	++	débil	++
Gelatina (fluidificación)	±	±	++++	+++	+
Caseína (hidrólisis)	++	+	—	—	++
Reacción Tressner-Danga	—	—	—	—	—
Agar + caldo + + tirosina (formación de pigmento)	++	—	—	++++	—
Glucosa + nitrato (nitritos)	+++	+++	+++	—	+++
Sacarosa + nitrato (nitritos)	—	+++	+	—	—
Glicerina + nitrato (nitritos)	++	+++	+++	—	++

El *Streptomyces cyaneus*, único que daba coloración oscura en el medio de agar + caldo + tirosina, como el microorganismo estudiado por nosotros (figura 3), mostraba, por lo demás, notables diferencias. En efecto, durante su desarrollo sobre el medio de agar + caldo + tirosina, *S. cyaneus*, que producía pigmento más oscuro que el *Streptomyces* MR, no manifestaba zona de lisis; además, sus esporóforos se presentan en espirales abiertas, no utiliza nitratos y produce fuerte fluidificación de la gelatina.

Las semejanzas de *Streptomyces* MR con *S. violaceus* son considerables en algunos casos: desarrollo sobre agar + malato cálcico, sobre agar + almidón, leche con tornasol: ambos fluidifican lentamente la gelatina y utilizan nitratos en un medio con glicerina + nitrato. Sin embargo, existen diferencias entre ellos: en la morfología de los esporó-

Cuadro 2. Comparación de las características de desarrollo de los diferentes *Streptomyces* ensayados

Medios de cultivo	Micelio y pigmento	<i>Streptomyces</i> MR	<i>S. violaceus</i>	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. cyaneus</i>	<i>S. violaceoruber</i>
Almidón	Mic. aéreo Mic. veget. Pig. sol.	Blanco, naranja Crema —	Blanco, rosado Crema —	Blanco, gris Azul oscuro +	Escaso, blanco Gris oscuro +	Blanco, gris Rojo azulado —
Agar + malato	Mic. aéreo Mic. veget. Pig. sol.	Gris Gris —	Gris Gris —	Gris Gris azul —	Blanco Blanco —	Gris Gris —
Agar + tirosina	Mic. aéreo Mic. veget. Pig. sol.	Gris Marrón ++	Blanco Naranja —	Blanco gris Azul +	Blanco Negro ++	Blanco, gris Naranja —
Agar + caseína	Mic. aéreo Mic. veget. Pig. sol.	— Blanco cremoso —	— Blanco cremoso —	Blanco Azul +	Escaso, blanco Negro +	Blanco Blanco cremoso —
Agar + peptona, hierro	Mic. aéreo Mic. veget. Pig. sol.	— Crema —	— Crema —	Blanco gris Azul —	Gris Marrón —	Blanco Blanco —

foros, en la forma de las esporas, en la utilización de nitratos a partir de glucosa + nitrato y sacarosa + nitrato, en la ausencia de micelio aéreo del *Streptomyces* MR en el medio de Tressner y Danga, en las diferentes propiedades antibióticas, ya que el *Streptomyces* MR sólo las presenta muy débiles frente al *Bacillus subtilis*, y en la producción de pigmento soluble en el medio de agar + caldo + tirosina. Este último hecho, que podrá ser el más trascendental, porque, siguiendo la clasificación de Waksman y Curtis, nos llevaba como único término de comparación al *S. cyaneus*, con el que, por lo demás, no tiene ninguna semejanza, pierde su importancia, puesto que Hoffman (6) considera y describe la especie *S. violaceus* como melanino-positiva. A pesar de las diferencias existentes, y basándonos en el criterio establecido por Waksman de que no se debe crear un excesivo número de especies, dada la gran variabilidad de los actinomicetos, consideramos al microorganismo estudiado por nosotros como una variedad fisiológica de la especie *S. violaceus* y lo designamos como *S. violaceus* MR.

#### RESUMEN

Un organismo seleccionado por su capacidad de utilizar paredes celulares de levaduras ha sido clasificado atendiendo a sus propiedades morfológicas y bioquímicas como una variedad del *Streptomyces violaceus* y se ha designado como *S. violaceus* MR, no considerándose las diferencias entre ambos microorganismos, que se describen a lo largo del trabajo, como suficientes para el establecimiento de una nueva especie.

#### SUMMARY

An organism able to utilize yeast cell walls has tentatively been classified as a variety of *Streptomyces violaceus* and named *S. violaceus* MR according to its morphological and biochemical properties. The differences between both microorganisms described in this paper are not considered sufficient to establish a new species.



**BIBLIOGRAFIA**

1. CUMMINS, C. S., y HARRIS, N. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173.
2. GARCÍA-MENDOZA, C., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Can. J. Microbiol.*, 9, 141.
3. GASCÓN, S., y VILLANUEVA, J. R. 1963. *Can. J. Microbiol.*, 9, 551.
4. GORDON, R., y SMITH, M. M. 1955. *J. Bacteriol.*, 69, 127.
5. HOARE, D. S., y WORK, E. 1957. *Biochem. J.*, 65, 441.
6. HOFFMAN, G. M. 1958. *Phytopathology*, 34.
7. PRIDHAM, T. G.; HESSELTINE, C. W., y BENEDICT, R. G. 1958. *Appl. Microbiol.*, 6, 52.
8. SALTON, M. R. J. 1955. *J. Gen. Microbiol.*, 12, 25.
9. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177.
10. TRESSNER, H. D., y DANGA, F. 1958. *J. Bacteriol.*, 76, 239.
11. WAKSMAN, S. A. 1940. *J. Bacteriol.*, 39, 549.
12. WAKSMAN, S. A. 1961. *The Actinomycetes*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

LABORATORIOS ALTER  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION  
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

## VALORACION DE ESTREPTOMICINA Y DERIVADOS CON *BACILLUS LICHENIFORMIS* ALTER

por

F. FERNANDEZ

### INTRODUCCION

En los años que llevamos dedicados a la valoración de antibióticos hemos tropezado en ocasiones con diversas dificultades cuando empleamos los gérmenes de ensayo que indican las farmacopeas. Así, por ejemplo, al valorar estreptomicina con *Bacillus subtilis* (ATCC 6.633 y NCTC 8.236), algunas veces se produce un doble halo de inhibición por causas que, según Brownlee y colaboradores (3), no están claras. En próximos trabajos nos referiremos a algunos inconvenientes encontrados al valorar otros antibióticos. En todos los casos nos vamos a referir al tipo de ensayo en placa de agar, que resulta más cómodo para las valoraciones rutinarias.

Durante algún tiempo nos dedicamos a ensayar una serie de gérmenes aislados de placas expuestas al ambiente, comprobando que algunos servían perfectamente para las valoraciones rutinarias de diversos antibióticos. En este trabajo nos vamos a referir concretamente a la valoración de estreptomicina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Este microorganismo es muy fácil de identificar empleando la clave del manual de Bergey (1).

Más adelante nos extenderemos ampliamente en lo que se refiere al tratamiento estadístico que se aplica a este tipo de pruebas cuando

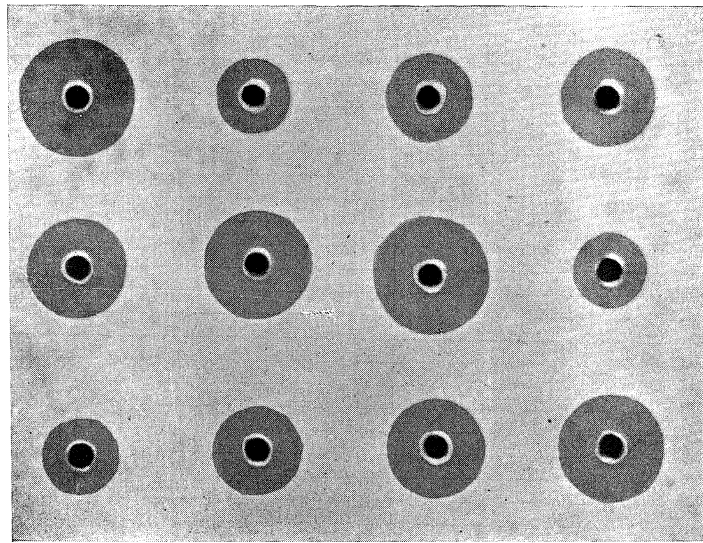
se trata de determinar si existe una relación lineal entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas, lo que debe llevar consigo una regresión altamente significativa, que no exista desviación en la linealidad y que el error intraconcentraciones sea pequeño.

### MATERIAL Y METODOS

Como hemos indicado anteriormente, el organismo de ensayo es el *Bacillus licheniformis* Alter. Para obtener la suspensión de esporas adecuada para el ensayo, se hace crecer el germen durante una semana a 32°-37 °C sobre la superficie de unos 300 cm<sup>3</sup> de medio sólido en un frasco de Roux, como indica la Farmacopea Británica (2). Al cabo de ese tiempo se arrastra el crecimiento con 50 cm<sup>3</sup> de solución salina estéril o agua destilada estéril. La suspensión resultante se calienta a 70 °C durante media hora, tres veces consecutivas y se guarda en nevera, donde se puede conservar durante mucho tiempo. Nosotros usamos una suspensión 1/20 de la original y la cantidad necesaria para inocular el medio de ensayo es aproximadamente del 0,1 por ciento de dicha suspensión.

Para las valoraciones de antibióticos usamos placas grandes cuadradas o rectangulares, formadas por un marco de acero inoxidable que se coloca sobre un cristal perfectamente plano y de tamaño apropiado. Cuando se emplean placas cuadradas puede usarse un diseño en forma de cuadrado latino o casi latino, y en el caso de las placas rectangulares utilizamos diseños adecuados, para compensar un posible desnivel en las placas. Sobre el empleo de placas grandes pueden consultarse los trabajos de Brownlee y colaboradores (3), Kavanagh (11) y Lees y Tootill (13-14). Sobre el procedimiento general para ensayos de difusión sobre agar puede consultarse un trabajo de Gavin (9).

En cuanto al medio de ensayo y al tampón para efectuar las diluciones, empleamos los recomendados por la Farmacopea Británica para la valoración de estreptomycin con *Bacillus subtilis* (NCTC 8.236). Utilizamos una sola capa de agar, lo cual resulta muy cómodo, y una vez enfriado y solidificado el medio se hacen pocillos en su superficie mediante un taladrador estéril. Debajo de la placa se coloca previamente la plantilla adecuada, que servirá como guía para efectuar los taladros y luego para llenar los pocillos con las diferentes diluciones. Las placas



*Figura 1*

una vez terminada toda la operación, se dejan estar una-dos horas a la temperatura ambiente o se guardan durante el mismo tiempo en la nevera antes de su inoculación para aumentar la difusión del antibiótico en el medio, ya que se retrasa el crecimiento del germen, con lo que se obtienen halos de inhibición algo mayores que si se incuban inmediatamente. La temperatura de incubación es de 32°-34 °C durante un período de alrededor de dieciocho horas.

Después de incubadas las placas puede observarse que el crecimiento del germen es perfectamente homogéneo.

Los halos de inhibición que se obtienen son nítidos, bien definidos y de tamaño apropiado. En la *figura 1* pueden verse los halos que resultan para diversas concentraciones del antibiótico. Las lecturas de los diámetros se efectuaron mediante un calibrador adaptado para este tipo de medidas.

Para el ensayo que vamos a analizar empleamos una placa cuadrada y cinco concentraciones distribuidas con arreglo a un diseño en forma de cuadrado latino, o sea, de tal modo que no se repita ninguna concentración en cada fila ni en cada columna. Para cada concentración se obtienen cinco resultados.

Las cinco concentraciones empleadas fueron las siguientes, en microgramos (base)/cm<sup>3</sup>: 3,465, 5,371, 8,325, 12,903 y 20,000. Estas concentraciones forman una progresión geométrica cuya razón es 1,55, lo cual implica que la diferencia entre sus logaritmos es la misma. Esta circunstancia nos será muy útil, como veremos más adelante, para el cálculo de la línea de regresión y el análisis estadístico subsiguiente, ya que permite el empleo de coeficientes polinomiales u ortogonales.

Para preparar las cinco diluciones se obtiene en primer lugar la de 20 µg/cm<sup>3</sup> y a partir de ésta, las demás, teniendo en cuenta que por ser la razón de la progresión igual a 1,55, la proporción de cualquier dilución para preparar la menor inmediata será de 1 de la mayor más 0,55 del tampón.

Para el estudio estadístico se han consultado diversos autores (3-8, 10, 12-15).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones. Para el cálculo estadístico se emplean coeficientes polinomiales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Cuadro 1

Concentraciones, microgramos/cm <sup>3</sup>	3,465	5,371	8,325	12,903	20,000
Logaritmos de las concentraciones	0,53971	0,73004	0,92037	1,11070	1,30103
Coefficientes polinomiales, X	- 2	- 1	0	+ 1	+ 2
Resultados en milímetros, Y	18,0	19,3	21,4	22,6	24,5
	17,8	19,3	21,2	22,9	24,2
	18,3	19,8	20,8	22,6	24,3
	18,2	19,7	21,0	22,3	24,0
	18,4	19,4	20,9	22,9	24,0
Totales, T	90,7	97,5	105,3	113,3	121,0
Medias, Z	18,14	19,50	21,06	22,66	24,20

Para los cálculos estadísticos preferimos los símbolos de Saunders y Fleming (15) aunque con alguna modificación. Así denominamos X a los coeficientes polinomiales, Y a los resultados de las lecturas en milímetros, T a los totales para cada concentración y Z a las medias para cada concentración. El símbolo S quiere decir «suma de» y S<sup>2</sup> indica el total de la suma elevado al cuadrado. N representa el número total de lecturas y n el número de concentraciones. Como veremos más adelante, podemos manejar los valores de las medias de las concentraciones, Z, o los totales, T. Por consiguiente, pueden utilizarse indistintamente y daremos las fórmulas para los dos casos. En el ejemplo que nos ocupa no hay inconveniente en emplear los valores de Z, ya que el número de resultados para cada concentración es igual a 5 ( $N/n = 5$ ), y en este caso todos los cocientes se obtienen con sólo dos decimales, ya que son exactos.

En el *cuadro 2* se dan los valores que podrán manejarse en el cálculo estadístico.

Cuadro 2

$\bar{Z} = 21,112$	$S(Y) = 527,8$
$S(Z) = 105,56$	$S^2(Y) = 278.566,84$
$S(Z^2) = 2.251,9488$	$S(Y^2) = 11.260,96$
$\bar{X} = 0$	$S(T^2) = 56.298,72$
$S(X) = 0$	$S(XT) = 76,4$
$S^2(X) = 0$	
$S(X^2) = 10$	$N = 25$
$S(XZ) = 15,28$	$n = 5$

*Cálculo de la línea de regresión*

El coeficiente de regresión viene dado por la fórmula

$$b = \frac{S(XZ) - S(X)S(Z)/n}{S(X^2) - S^2(X)/n}$$

Como  $S(X) = 0$  y  $S^2(X) = 0$ , la fórmula se reduce a

$$b = \frac{S(XZ)}{S(X^2)} = \frac{15,28}{10} = 1,528$$

Si empleamos los totales, T, tendremos

$$b = \frac{n}{N} \frac{S(XT) - S(X)S(T)/n}{S(X^2) - S^2(X)/n}$$

que se reduce a

$$b = \frac{n}{N} \frac{S(XT)}{S(X^2)}$$

Tendremos que:

$$Z - \bar{Z} = b(X - \bar{X})$$

y como  $\bar{X} = 0$

$$Z = \bar{Z} = bX$$

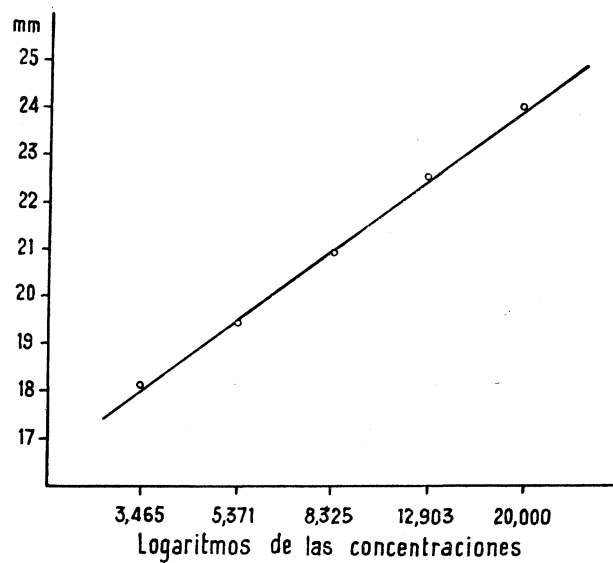
de donde

$$Z - \bar{Z} = bX$$

Substituyendo los valores respectivos, tendremos

$$Z = 21,112 + 1,528X$$

En la *figura 2* damos la línea de regresión con arreglo a los puntos obtenidos utilizando la ecuación anterior.



*Figura 2*

### *Análisis de varianza*

Para comprobar que la regresión es significativa, ver si existe desviación en la linealidad y calcular la magnitud del error experimental (dispersión dentro de cada concentración), se puede efectuar un análisis de varianza con arreglo al *cuadro 3*.



Cuadro 3

Fuente de variación	Sumas de cuadrados		Grados de libertad	Varianza
	Símbolos	Fórmulas		
Total	S <sub>1</sub>	S(Y <sup>2</sup> ) - S <sup>2</sup> (Y)/N	N - 1	S <sub>1</sub> /N - 1
Entre concentraciones	S <sub>2</sub>	$\frac{N}{n} [S(Z^2)] - S^2(Y)/N$	n - 1	S <sub>2</sub> /n - 1
Regresión	S <sub>3</sub>	$\frac{N}{n} \left[ \frac{[S(XZ) - S(X)S(Z)/n]^2}{S(X^2) - S^2(X)/n} \right]$	1	S <sub>3</sub>
Desviación de la linealidad	S <sub>4</sub>	S <sub>2</sub> - S <sub>3</sub>	n - 2	S <sub>4</sub> /n - 2
Error experimental	S <sub>5</sub>	S <sub>1</sub> - S <sub>2</sub>	N - n	S <sub>5</sub> /N - n

Si se emplean los totales, T

$$S_2 = \frac{n}{N} \left[ S(T^2) \right] - S^2(Y)/N$$

$$S_3 = \frac{1}{Nn} \left[ \frac{[S(XT)n - S(X)S(T)]^2}{S(X^2) - S^2(X)/n} \right]$$

Los valores obtenidos se dan en el cuadro 4.

Cuadro 4

Fuente de variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P = 0,95
Total	118,2864	24			
Entre concentraciones	117,0704	4	29,2676		
Regresión	116,7392	1	116,7392	1.920,00	4,35
Desviación de la linealidad	0,3312	3	0,1104	1,81	3,10
Error experimental	1,2160	20	0,0608		

La razón de las varianzas se obtiene dividiendo las varianzas que interesan por la varianza del error experimental. Una vez obtenido dicho valor se compara con el que se encuentra en las tablas estadísticas de valores F para  $n_1/n_2$ , siendo  $n_1$  la varianza mayor y  $n_2$  la varianza menor, y con arreglo a los grados de libertad para cada varianza.

Como se ve, la regresión es altamente significativa, ya que el valor calculado es mucho mayor que el valor tabulado. Por otro lado, no hay desviación significativa en la linealidad, ya que el valor obtenido es menor que el valor de las tablas estadísticas para valores de F.

Como hemos apuntado anteriormente, se utilizó un diseño en forma de cuadrado latino. Si la placa está perfectamente nivelada podemos prescindir de las fuentes de variación que suponen las filas y las columnas, ya que no vale la pena perder grados de libertad para el error experimental. En efecto, al tener cinco filas y cinco columnas habrá 4 grados de libertad para cada una de dichas fuentes de variación, lo cual disminuirá en 8 los grados de libertad para el error experimental, que pasarían de 20 a 12.

A título de ilustración vamos a dar el procedimiento para efectuar el análisis de varianza teniendo en cuenta las fuentes de variación que suponen las filas y las columnas y que puede aplicarse siempre que se emplee un cuadrado latino como diseño para este tipo de ensayos.

Cada letra representa una concentración. Los totales para las filas se representan por  $T_f$  y las medias por  $Z_f$ . Los totales para las columnas serán  $T_c$  y las medias  $Z_c$ .

En el *cuadro 5* pueden verse los resultados con arreglo al cuadrado latino.

Cuadro 5

	Columnas					T <sub>t</sub>	Z <sub>t</sub>		
Filas	A	B	C	D	E	105,8	21,16		
	21,4	18,0	24,5	19,3	22,6				
	C	D	E	A	B			105,4	21,08
	24,2	19,3	22,9	21,2	17,8				
	E	A	B	C	D			105,8	21,16
22,6	20,8	18,3	24,3	19,8					
B	C	D	E	A	105,2	21,04			
18,2	24,0	19,7	22,3	21,0					
D	E	A	B	C	105,6	21,12			
19,4	22,9	20,9	18,4	24,0					
T <sub>c</sub>	105,8	105,0	106,3	105,5	105,2	527,8	= S(Y)		
Z <sub>c</sub>	21,16	21,00	21,26	21,10	21,04				

Conforme a los datos expuestos en el cuadro 5 puede efectuarse un análisis de varianza con arreglo al cuadro 6.

Cuadro 6

Fuente de variación	Sumas de cuadrados		Grados de libertad	Varianza
	Símbolos	Fórmulas		
Filas	S <sub>t</sub>	$\frac{N}{n} [S(Z^2_t)] - S^2(Y)/N$	n - 1	S <sub>t</sub> /n - 1
Columnas	S <sub>c</sub>	$\frac{N}{n} [S(Z^2_c)] - S^2(Y)/N$	n - 1	S <sub>c</sub> /n - 1
Error experimental (véase cuadro 3)	S <sub>s</sub>	S <sub>1</sub> - S <sub>2</sub>	(N - 3n) + 2	S <sub>s</sub> /(N - 3n) + 2

Si se emplean los totales  $T_r$  y  $T_c$ , tendremos

$$S_r = \frac{n}{N} [S(T_r^2)] - S^2(Y)/N$$

$$S_c = \frac{n}{N} [S(T_c^2)] - S^2(Y)/N$$

Los valores obtenidos se dan en el *cuadro 7*.

*Cuadro 7*

Fuente de variación	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P = 0,95
Filas	0,2944	4	0,0735	0,72	3,49
Columnas	0,4499	4	0,1125	1,11	3,49
Error experimental	1,2160	12	0,1013		

Como puede verse, los valores obtenidos para la razón de las varianzas son menores que los valores tabulados, lo cual quiere decir que la variación debida a las filas y a las columnas es tan pequeña que pueden segregarse dichas fuentes de variación.

El valor obtenido para la razón de las varianzas en las filas es menor que la unidad, lo que indica que las desviaciones observadas dentro de las filas son menores que las que podrían esperarse del grado de variación encontrado dentro de las concentraciones (error experimental). Los valores de F menores que la unidad no se encuentran en las tablas estadísticas y para poder ensayar su significado tomamos el valor inverso, que es 1,37, y yendo la tabla para  $n_1$  con 12 grados de libertad y  $n_2$  con 4 grados de libertad, vemos que el valor tabulado es 5,91, que es mayor que 1,37, lo cual quiere decir que las variaciones dentro de las filas, aunque algo más pequeñas de lo que podría esperarse, no son tan pequeñas que deban atribuirse a defecto en la técnica del ensayo.

### Comentario final

Para las valoraciones rutinarias de antibióticos solemos utilizar un ensayo de tipo  $2 \times 2$ . En este caso que hemos estudiado utilizamos corrientemente las concentraciones de 5 y 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , que son las mismas que indica la Farmacopea Británica para la valoración de estreptomicina con *Bacillus subtilis*. En cada placa pueden incluirse varios problemas, que se comparan simultáneamente con el mismo patrón. Para el cálculo de la potencia, prueba de paralelismo y obtención de los límites de error seguimos las fórmulas e indicaciones de la Farmacopea Británica.

En el tiempo que llevamos valorando la estreptomicina con *Bacillus licheniformis* hemos comprobado que los resultados obtenidos coinciden significativamente con los conseguidos mediante la valoración química por el método del maltol.

### CONCLUSIONES

A la vista de todo lo anteriormente expuesto se deduce que puede valorarse la estreptomicina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter, ya que:

- 1) El crecimiento del germen en las placas es perfectamente homogéneo.
- 2) Los halos de inhibición que se producen son nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.
- 3) La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas es lineal dentro de límites convenientes.

### RECONOCIMIENTO

Mi agradecimiento, en primer lugar, a la Dirección técnica de Alter, S. A., por las facilidades dadas para la realización de este trabajo y al Prof. Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, por la buena acogida dispensada para la publicación de este artículo. Agradezco también la colaboración entusiasta de la Srta. Blanca Santos Corral, a cuyo cargo corrió la parte práctica de las experiencias realizadas.

## RESUMEN

Se estudia la valoración de estreptomycin con *Bacillus licheniformis* Alter. Se analiza estadísticamente la línea logarítmica concentraciones-respuestas, incluyendo el cálculo de la regresión y el análisis de varianza de los resultados obtenidos.

## SUMMARY

The assay of Streptomycin with *Bacillus licheniformis* Alter is studied. Statistical analysis is made from the results obtained, including the regression calculation and the variance analysis.

## BIBLIOGRAFIA

1. BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. 7.<sup>a</sup> edición. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
2. British Pharmacopoeia, 1963.
3. BROWNLEE, K. A.; DELVES, C. S.; DORMAN, M.; GREEN, C. A.; GRENFELL, E.; JOHNSON, J. D. A., y SMITH, N. 1948. Biological assay for streptomycin by a modified cylinder plate method. J. Gen. Microbiol., 2, 40.
4. BURN, J. H.; FINNEY, D. J., y GOODWIN, L. G. 1950. Biological standardization. Oxford Medical Publications, Londres-Nueva York-Toronto.
5. DAVIES, O. L. 1957. Statistical methods in research and production. Oliver and Boyd, Londres.
6. DEUTSCHBERGER, J., y KIRSHBAUM, A. 1959. Simplified equations for fitting least square lines of data. Antibiot. Chemotherapy, 9, 752.
7. EMMENS, C. W. 1948. Principles of biological assay. Chapman Hall Ltd., Londres.
8. FINNEY, D. J. 1952. Statistical method in biological assay. Charles Griffin Company Ltd., Londres.
9. GAVIN, J. J. 1957. Microbiological process report. App. Microbiol., 5, 25.
10. HARRISON, E.; LEES, K. A., y WOOD, E. 1951. The assay of vitamin B<sub>12</sub>. VI. Microbiological estimation with a mutant of *Escherichia coli* by the plate method. Analyst, 76, 696.
11. KAVANAGH, F. 1963. Analytical Microbiology. Academic Press, Nueva York-Londres.

12. KIRSHBAUM, A.; ARRET, B., y HARRISON, J. D. 1959. Dose-response lines for antibiotic microbiological assays. *Antibiot. Chemotherapy*, 9, 301.
13. LEES, K. A., y TOOTILL, J. P. R. 1955. Microbiological assay on large plates. I. General considerations with particular reference to routine assay. *Analyst*, 80, 95.
14. LEES, K. A., y TOOTILL, J. P. R. 1955. Microbiological assay on large plates. II. Precise assay. *Analyst*, 80, 110.
15. SAUNDERS, L., y FLEMING, R. 1957. *Mathematics and statistics for use in Pharmacy, Biology and Chemistry*. The Pharmaceutical Press, Londres.

C. S. I. C.  
INSTITUTO DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y MICROBIOLOGIA

## RESISTENCIA TERMICA DE LACTOBACILOS Y LEVADURAS

por

M. J. FERNANDEZ-DIEZ y F. GONZALEZ-CANCHO

### INTRODUCCION

De los diferentes agentes físicos que actúan sobre los microorganismos, la temperatura puede ejercer sobre los mismos una influencia muy variable (7). Así, dependiendo de la intensidad y del período de exposición, puede, en unos casos, estimular el desarrollo de los microorganismos, y en otros, alterar su morfología y metabolismo, produciendo cambios en los procesos vitales de los mismos. Igualmente, destacaremos su acción como agente esterilizante. Generalmente, tales alteraciones van acompañadas por ciertos cambios físico-químicos de la sustancia celular, por lo que la temperatura ejerce su influencia sobre las reacciones bioquímicas que tienen lugar en dichas sustancias.

Se supone que la destrucción de los microorganismos por el calor se debe, bien a la coagulación de proteínas, inactivación de las enzimas, o a ciertos fenómenos de oxidación (4, 6), variando el tratamiento térmico necesario para destruir dichos gérmenes y sus esporos con las condiciones ambientales, con la clase de los mismos, etc.

Entre los múltiples factores que afectan a la termorresistencia de las bacterias, citaremos (4), como más importantes:

1) Concentración inicial de gérmenes. Cuanto mayor es el número de bacterias presentes es necesario mayor tratamiento térmico para destruirlas.



- 2) En igualdad de condiciones, el tiempo necesario para destruir los microorganismos disminuye al aumentar la temperatura.
- 3) En general, las bacterias presentan su máxima resistencia durante las últimas etapas de la fase de latencia, y la mínima durante la fase de crecimiento logarítmico. Asimismo, los esporos jóvenes son menos resistentes que los maduros.
- 4) En términos generales, las bacterias y sus esporos son más resistentes al calor, en presencia de substratos neutros o de pH próximos a la neutralidad.

Igualmente, la termorresistencia de las levaduras y sus esporos varía con las distintas especies e incluso con las cepas. En general, las formas vegetativas se destruyen a una temperatura de 50°-58 °C durante diez-quince minutos, mientras que los ascosporos necesitan unos 5°-10 °C más de temperatura. La mayoría de los ascosporos se destruye a 60 °C durante diez-quince minutos, y ninguno puede resistir un breve calentamiento a 100 °C.

La pasterización se puede definir como un tratamiento térmico que se realiza a temperaturas inferiores a 100 °C y que es suficiente para destruir algunos, pero no todos, de los microorganismos presentes en un producto dado (3).

Empleada en un principio por Pasteur para destruir los gérmenes del vino, cerveza, etc., su uso se ha extendido para la conservación de otros productos alimenticios, tales como leche y jugo de frutas, que no pueden resistir tratamientos térmicos muy elevados sin que se perjudique la calidad de los mismos.

Ha parecido conveniente estudiar la termorresistencia de algunas cepas de lactobacilos y levaduras, teniendo en cuenta que, si bien en la bibliografía se encuentran datos generales que no difieren grandemente de los expuestos anteriormente, sin embargo, no es fácil hallar resultados concretos sobre el comportamiento particular de los diferentes géneros y especies. Al mismo tiempo, dichos microorganismos se encuentran en algunos productos fermentados, bien como causantes de las típicas fermentaciones que sufren, o como contaminantes que es necesario destruir para la posterior conservación de los mismos.

## PARTE EXPERIMENTAL

## A) Materiales y métodos

Para la realización de estos estudios se han empleado las siguientes cepas de lactobacilos y levaduras, aisladas de salmueras de aceitunas fermentadas:

*Lactobacillus plantarum* (4 cepas)  
*Candida krusei*  
*C. mycoderma*  
*C. parapsilosis*, var. *intermedia*  
*C. pseudotropicalis*  
*C. rugosa*  
*C. tropicalis*  
*Debaryomyces nicotianae*  
*Hansenula anomala*  
*H. mrakii*  
*H. subpelliculosa*  
*Pichia fermentans*  
*Saccharomyces cerevisiae*  
*Sacch. chevalieri*  
*Sacch. fructuum*  
*Sacch. italicus*  
*Sacch. veronae*  
*Torulopsis holmii*

La sistemática de los lactobacilos se ha seguido según las normas del manual de Bergey (2), y la de las levaduras, según el tratado de Lodder (5).

Se ha empleado como medio de cultivo, infusión de levadura con 2 por ciento de glucosa, a un pH de 5,50, excepto en el estudio comparativo de lactobacilos, en el que se utilizaron, además, los valores de pH de 3,65 y 4,50.

Los estudios se han realizado según la técnica del tubo simple (3). Para ello se utilizaron tubos de vidrio del mismo tamaño y diámetro (18 × 200 mm) conteniendo 5 cm<sup>3</sup> del citado medio. Una vez inocula-

dos con un cultivo de cuarenta y ocho horas, se incuban durante dos días en estufa (a 30 °C, los lactobacilos, y a 25 °C, las levaduras). Después de este período de incubación, se sumergen en un baño termostático mantenido a diferentes temperaturas constantes y durante tiempos variables. Al final del calentamiento, los tubos se enfriaron rápidamente en baño de agua. Se observa la supervivencia, agitando el cultivo después de pasterizado y sembrando 0,1 cm<sup>3</sup> en placas de Petri, que contienen agar + infusión de levadura + glucosa e incubando a 30° y 25 °C, respectivamente.

Para cada punto de la curva se utilizó un número de tubos comprendido entre 4 y 8, considerándose únicamente puntos de destrucción aquellos en que el resultado fue negativo en todos ellos.

### B) Resultados

En las *figuras 1-9* se dan los resultados obtenidos con los microorganismos que se citan anteriormente. Las temperaturas de pasterización se representan en abscisas (escala aritmética), expresadas en grados centígrados, y en ordenadas (escala logarítmica), el tiempo de calentamiento en minutos. Las líneas de supervivencia, en primera aproximación, se han obtenido siguiendo los criterios indicados por Townsend, Esty y Baselt (8).

Como parámetros fundamentales se emplean los siguientes:

$z$  (*pendiente*). Es el número de grados centígrados necesario para que la línea de supervivencia atraviese un ciclo logarítmico, en el papel. Es decir, el número de grados centígrados que es necesario aumentar la temperatura para disminuir a la décima parte la resistencia térmica. *U.P.* (*unidades de pasterización*). Es la ordenada de la línea correspondiente a la abcisa de 56 °C, y representa el número de minutos necesario para destruir el microorganismo que se estudia a la citada temperatura.

Si bien en la bibliografía (1) se utiliza la temperatura de 60 °C para referir las unidades de pasterización, hemos creído conveniente utilizar una temperatura inferior en este trabajo, dada la escasa resistencia de algunas de las cepas estudiadas.

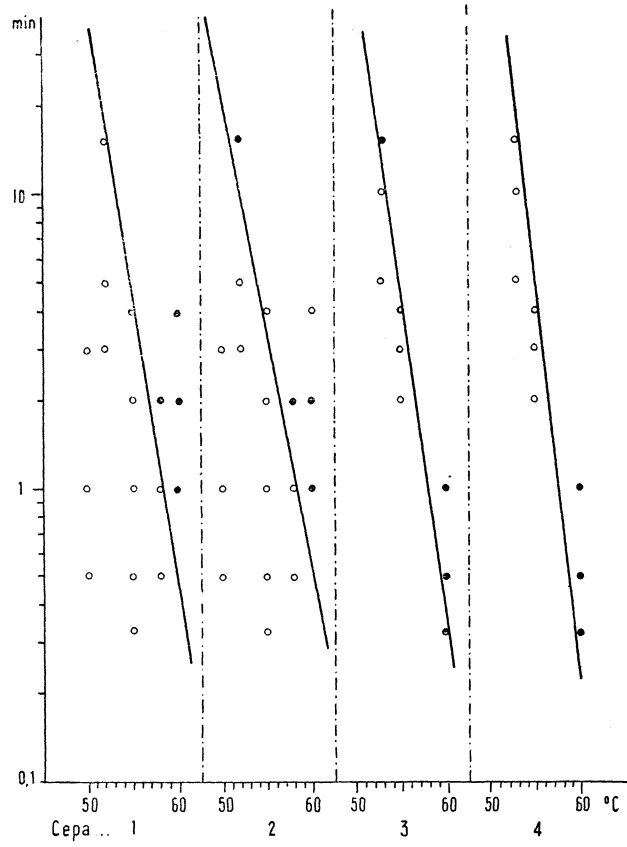


Figura 1. *L. plantarum*. pH: 5,50

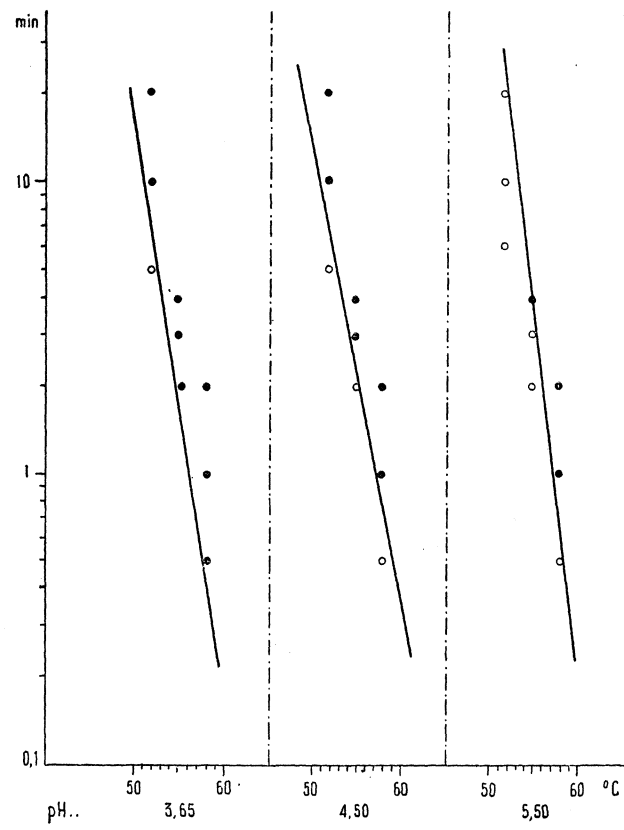


Figura 2. *L. plantarum*, cepa 1

5

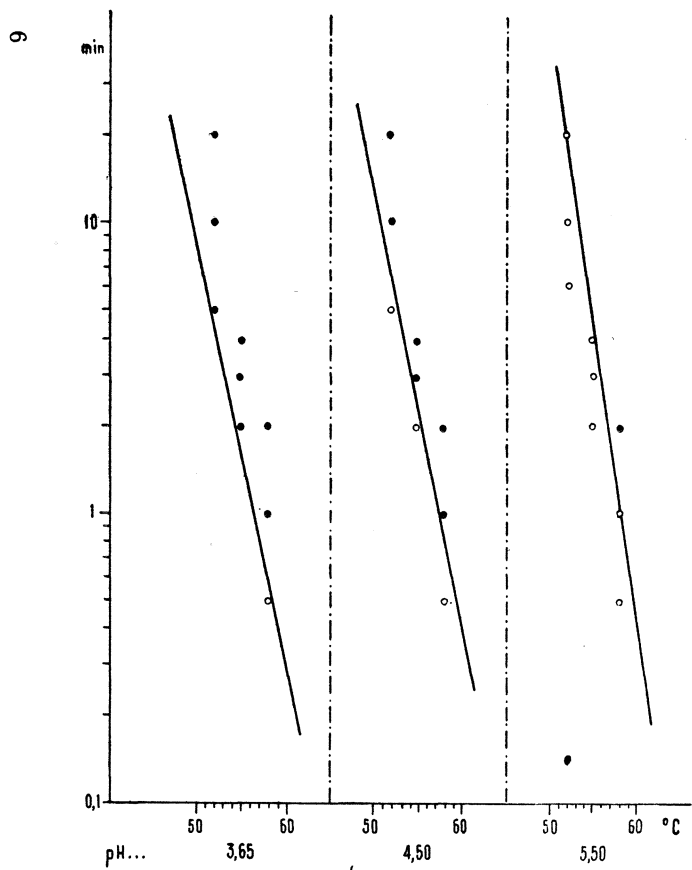


Figura 3. *L. plantarum*, cepa 2

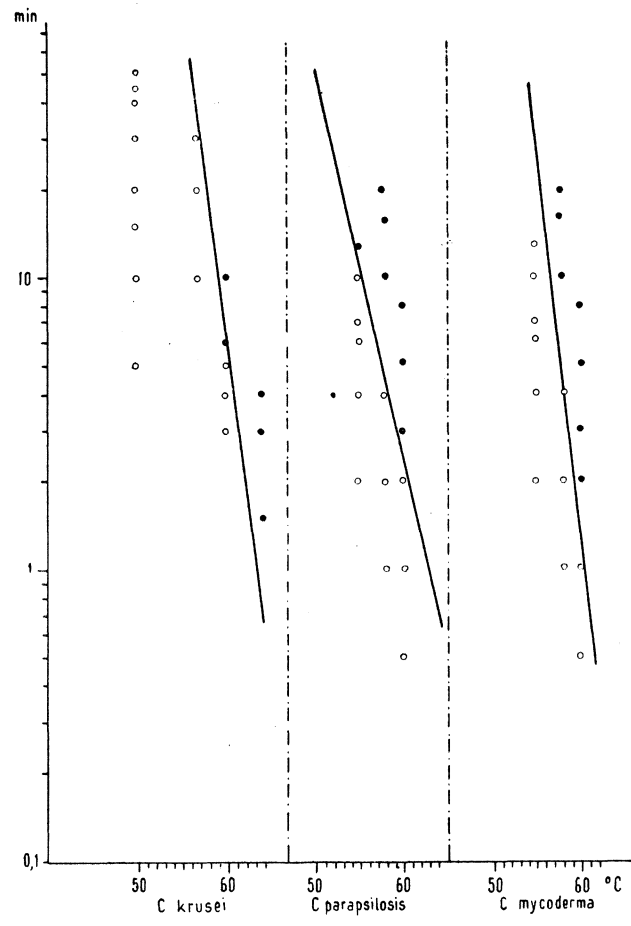


Figura 4. pH: 5,50

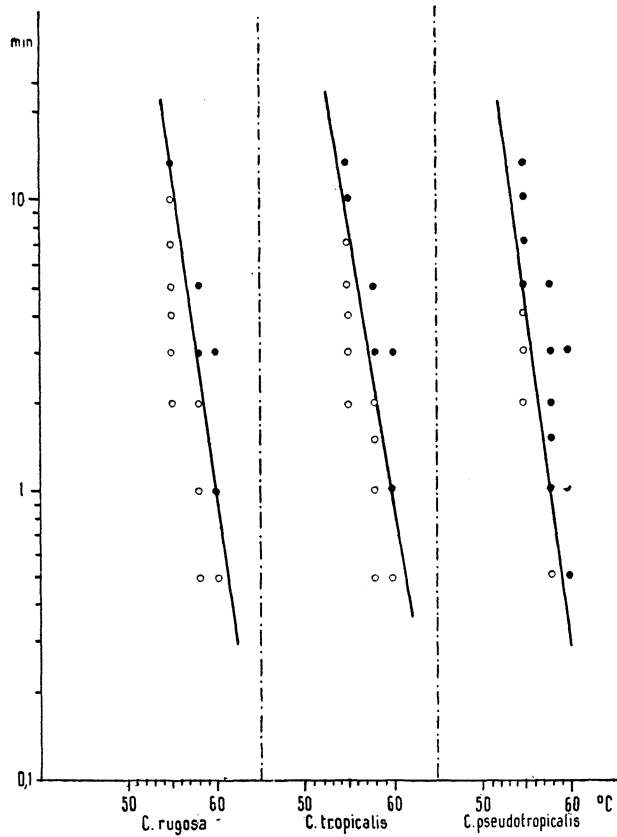


Figura 5. pH: 5,50

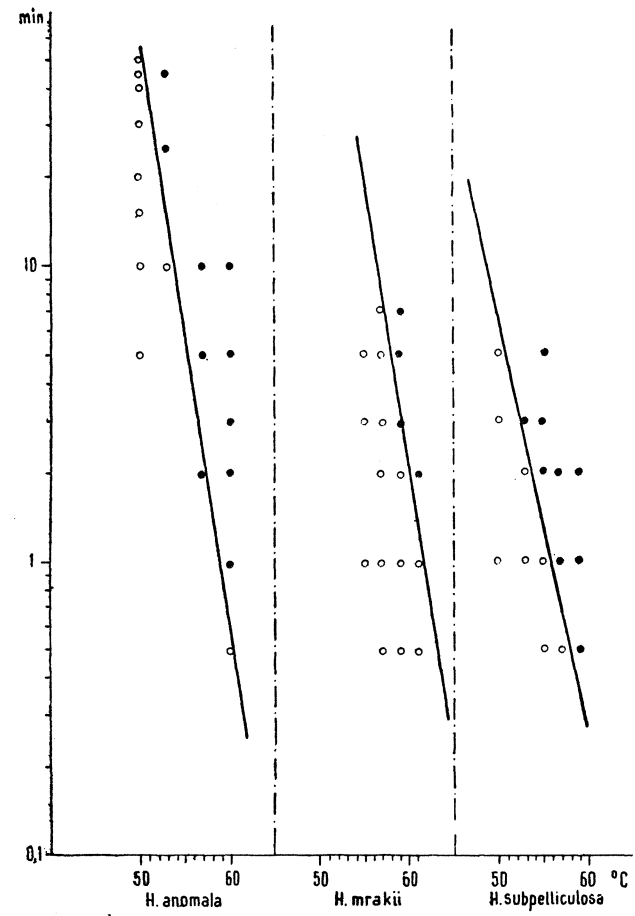


Figura 6. pH: 5,50

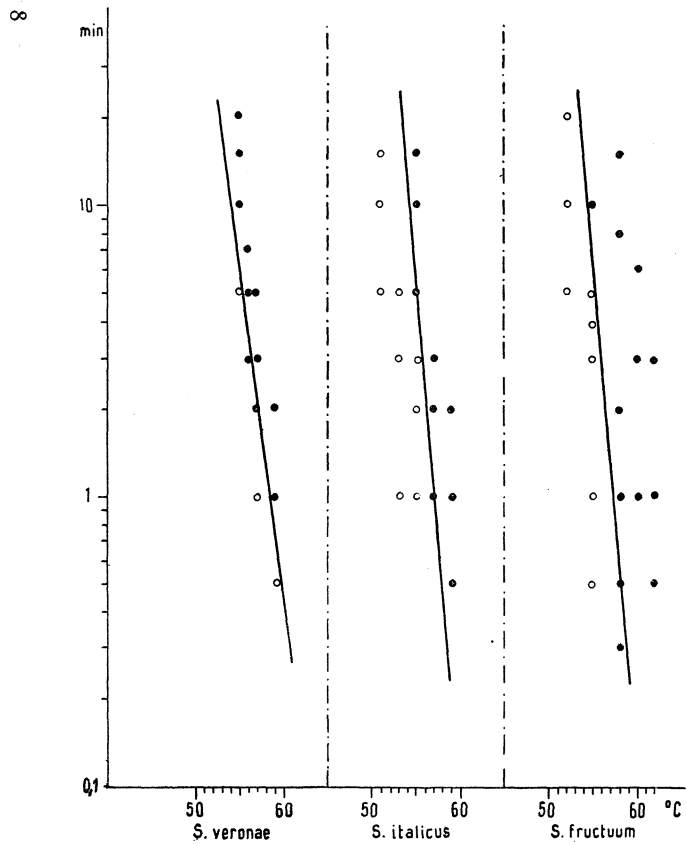


Figura 7. pH: 5,50

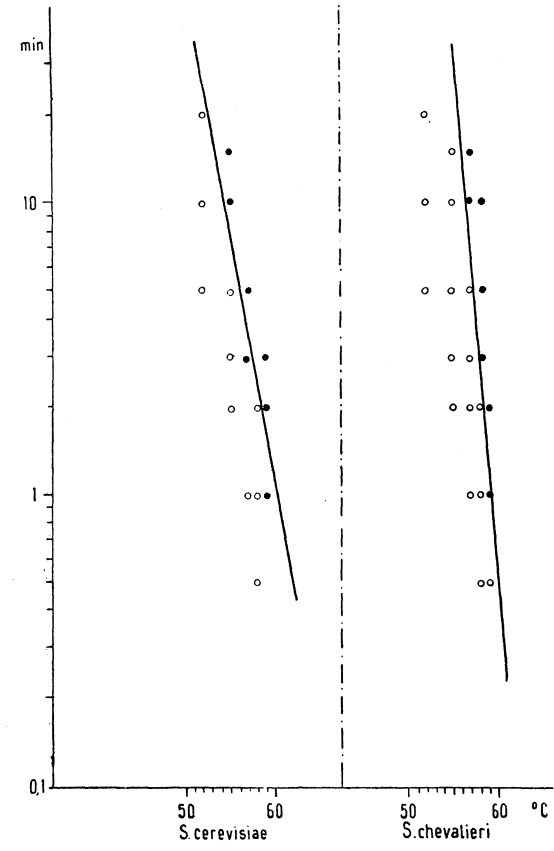


Figura 8. pH: 5,50

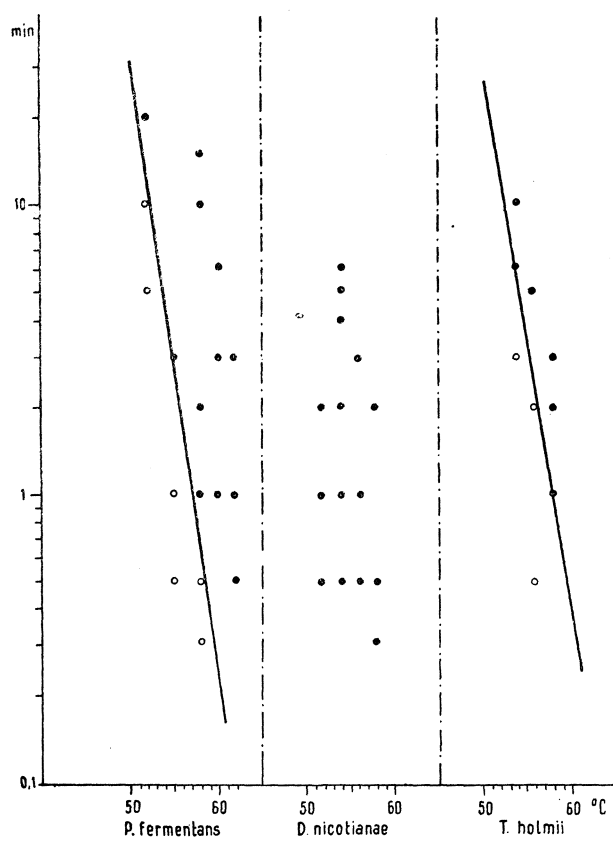


Figura 9. pH: 5,50



Los valores de dichos parámetros se indican en los cuadros 1-3.

*Cuadro 1. Resistencia térmica de diferentes cepas de Lactobacillus plantarum, a un pH de 5,50*

Cepa	U. P., minutos	Z, grados centígrados
1	2,6	5
2	2,2	6
3	2,5	5
4	2,1	4

*Cuadro 2. Resistencia térmica de dos cepas de Lactobacillus plantarum a diferentes valores de pH*

Cepa	pH	U. P., minutos	Z, grados centígrados
1	3,65	1,0	5
1	4,50	1,5	6
1	5,50	1,9	4
2	3,65	1,1	6
2	4,50	1,4	6
2	5,50	2,4	5

Cuadro 3. Resistencia térmica de diferentes cepas de levaduras a un pH de 5,50

Género	Especie	U. P., minutos	Z, grados centígrados
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	51,0	5
	<i>parapilosis</i> var. <i>intermedia</i>	7,8	7
	<i>mycoderma</i>	16,0	4
	<i>rugosa</i>	7,0	5
	<i>tropicalis</i>	4,4	5
	<i>pseudotropicalis</i>	2,5	5
<i>Hansenula</i>	<i>anomala</i>	3,3	5
	<i>mrakii</i>	10,5	5
	<i>subpelliculosa</i>	0,9	7
<i>Saccharomyces</i>	<i>veronae</i>	3,5	5
	<i>italicus</i>	2,0	3
	<i>fructuum</i>	2,0	3
	<i>cerevisiae</i>	4,4	6
	<i>chevalieri</i>	10,0	3
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	1,7	5
<i>Debaryomyces</i>	<i>nicotianae</i> (*)		
<i>Torulopsis</i>	<i>holmii</i>	2,0	5

(\*) Parámetros no calculados, por no haber encontrado puntos de supervivencia en las condiciones estudiadas.

### C) Discusión

La resistencia termina a un pH de 5,50 (figura 1 y cuadro 1) de las cuatro cepas estudiadas de *Lactobacillus plantarum* es prácticamente análoga, no pudiendo, por lo tanto, establecerse diferencias significativas entre las mismas. Para ello se necesitarían mayor número de puntos y duplicados, que permitiesen un ajuste estadístico de las líneas de supervivencia, lo cual puede ser objeto de una investigación posterior.

Las figuras 2-3 y cuadro 2 muestran claramente el efecto del pH, disminuyendo la resistencia de los lactobacilos al acidificar el medio.

Finalmente, de la observación de las figuras 4-9 y cuadro 3 puede deducirse la gran diferencia de valores que presenta la resistencia térmica de las diferentes cepas de levaduras estudiadas, incluso dentro del mismo género, y en condiciones análogas de desarrollo, pH, etc., lo cual,

como indican Ball y Olson (1), demuestra la urgente necesidad de realizar una extensa investigación sobre la resistencia térmica de levaduras, antes de que la pasterización de los diferentes productos pueda realizarse sobre una base científica tan sólida como aquella en que se cimienta la teoría de la esterilización.

#### RESUMEN

Se ha realizado un estudio preliminar sobre la resistencia térmica de lactobacilos y levaduras.

Por lo que respecta a las cepas estudiadas de lactobacilos, no existe diferencia significativa entre las mismas dentro del mismo valor del pH, disminuyendo, en cambio, la resistencia cuando éste decrece.

En las levaduras se observa la gran diferencia que existe entre los distintos géneros y especies, lo cual indica la necesidad de hacer un estudio detenido antes de utilizar la pasterización como medio de conservación en aquellos productos donde se encuentran dichos microorganismos.

#### SUMMARY

A preliminary study was performed on the thermal resistance of lactobacilli and yeasts.

No significant difference was found among the several strains of lactobacilli, within the same pH value. However, for the same strain, the lower the pH, the lower the thermal resistance.

With respect to the yeasts, a great difference was found among the different genera and species, which emphasizes the necessity to do a careful study on this point before the pasteurization could be used for preservation purposes in those products where these microorganisms are present.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BALL, C. O., y OLSON, F. C. W. 1957. *Sterilization in Food Technology*. McGraw-Hill Book Co., Inc., Nueva York.
2. BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D., y SMITH, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7.<sup>a</sup> edición. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

3. CRUSSL, W. V. 1958. Commercial Fruit and Vegetable Products. McGraw-Hill Book Co., Inc., Nueva York.
4. FRAZIER, W. C. 1962. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza.
5. LODDER, J., y KREGER-VAN RIJ, N. J. W. 1952. The Yeasts. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
6. PARKER, M. E., y LITCHFIELD, J. H. 1962. Food Plant Sanitation. Reinhold Publishing Corp., Nueva York.
7. ROGER, J. 1950. Bacterial Chemistry and Physiology. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.
8. TOWNSEND, C. T.; ESTY, J. R., y BASELT, F. C. 1938. Food Res., 3, 323.

C. S. I. C.  
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

## LA INFRACILIACION DE *FRONTONIA LEUCAS* EHRENBERG

por

ROSARIO GIL y J. PEREZ-SILVA

### INTRODUCCION

En publicaciones anteriores hemos descrito la infraciliación de *Frontonia depressa* Stokes (3) y de *Fr. acuminata* Ehrenberg (4), destacando algunas características de posible interés taxonómico y estableciendo diferencias entre las distintas estirpes estudiadas, en cuanto a los detalles de la infraciliación.

Continuando en esta línea de investigación, en el presente trabajo se estudian cuatro estirpes de *Frontonia leucas* Ehrenberg, comparando nuestras observaciones con la descripción que hace Roque (6) de esta misma especie, y señalando algunas características de la infraciliación que pueden tener significado taxonómico.

### MATERIAL Y METODOS

Hemos estudiado las cuatro estirpes de *Frontonia leucas* siguientes:  
*Estirpe 1.* Se mantiene en cultivo en el «Zoologisches Institut», de la Universidad de Tubinga (Alemania), en medio de extracto de suelo al que se le añade *Haematococcus* como alimento.

*Estirpe 2.* Aislada en agosto de 1960 a partir de una muestra de agua recogida en La Perala (Toledo). Se mantuvo en cultivo durante cuatro meses, en medio de extracto de suelo, añadiendo como alimento una suspensión de *Saccharomyces pastorianum*.

*Estirpe 3.* Aislada de una muestra de musgo recogida en Lourdes (Francia), en septiembre de 1960. Se mantuvo en cultivo durante un año, en medio de extracto de suelo, al que se añadía periódicamente una suspensión de *Saccharomyces pastorianum*.

*Estirpe 4.* Aislada en septiembre de 1960, a partir de una muestra de agua recogida en la fuente que hay en el patio del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid). Se mantuvo en cultivo hasta junio de 1961, empleando el mismo medio y añadiendo el mismo alimento que para las dos estirpes anteriores.

Para poner de manifiesto la infraciliación se empleó el método de impregnación argéntica de Chatton-Lwoff, tal como lo describe Corliss (2).

La tinción de núcleos se realizó por la reacción nuclear de Feulgen, fijando con el líquido de Sanfelice e hidrolizando durante ocho minutos.

## RESULTADOS

A continuación se describen cada una de las estirpes de *Frontonia leucas* estudiadas, atendiendo a la morfología y a la infraciliación somática, oral y vestibular.

### *Estirpe 1*

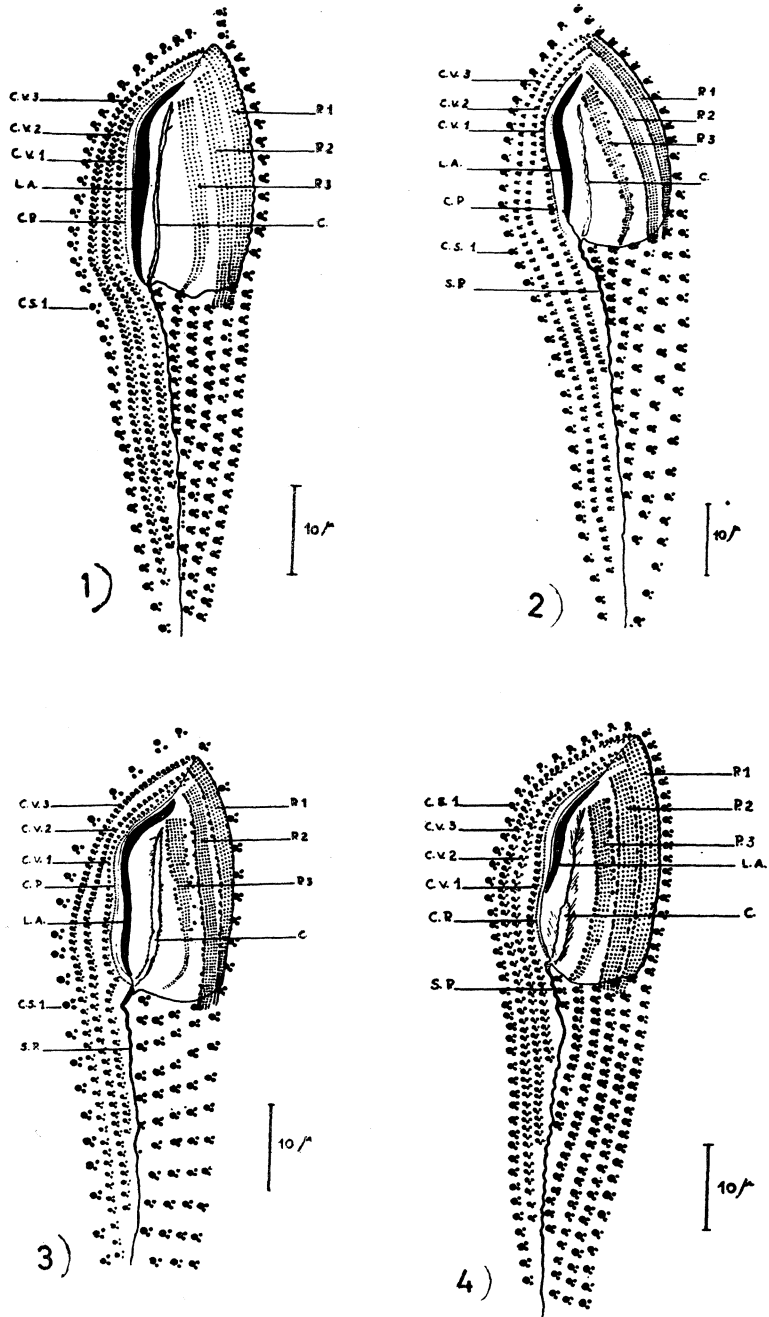
#### *Morfología*

Cuerpo de forma elipsoidal (*figura 5*), ligeramente deprimido, de un tamaño que oscila entre 122 y 185  $\mu$  de longitud, por 60-102  $\mu$  de anchura (*cuadro 1*).

La abertura bucal está situada hacia la parte media de la mitad anterior del cuerpo; tiene forma lanceolada (*figuras 1, 5 y 13-14*), apuntada por la parte anterior y truncada por la posterior. Del vértice posterior derecho parte la sutura postoral (*figura 1*), que se extiende longitudinalmente hasta el extremo posterior del cuerpo.

Existe una vacuola pulsátil situada detrás de la línea ecuatorial y en la mitad derecha del cuerpo; la vacuola presenta un solo poro excretor (*figura 6*).

Hay un sólo macronúcleo elipsoidal y dos o más micronúcleos, fusiformes o piriformes.



Figuras 1-4. *Frontonia leucas*. Esquemas del aparato bucal de las estirpes 1, 2, 3 y 4. C., citostoma; C.P., cinetia paraoral; C.S.1, primera cinetia somática; C.V.1, C.V.2 y C.V.3, cinetias vestibulares; L.A., línea argéntofila; P.1, P.2 y P.3, penículos

*Infraciliación somática*

El cuerpo presenta unas 115 cinetias somáticas meridianas que corren más o menos paralelas a la sutura postoral. Los cinetosomas de estas cinetias están integrados por tres gránulos dispuestos formando un triángulo, y alternan con los tricocistos. En el campo postoral hay 5 cinetias, que parten del borde posterior de la abertura bucal y terminan en la sutura postoral (*figuras 1 y 14*).

*Infraciliación vestibular*

A la derecha de la abertura bucal existen 3 cinetias vestibulares que parten del vértice anterior de la abertura bucal, frente al primer penículo (*figuras 1 y 14*), y corren más o menos paralelas entre sí hasta terminar sucesivamente en la sutura postoral. Los cinetosomas de estas cinetias vestibulares son de menor tamaño que los somáticos y están muy próximos entre sí.

*Infraciliación oral*

En la pared izquierda de la cavidad bucal existen tres penículos (*figuras 1 y 13*); los dos primeros (los más externos) corren muy juntos entre sí y paralelos al borde izquierdo de la cavidad bucal. Cada uno de estos penículos está integrado por 4 hileras de gránulos finos (*figura 1*). La longitud del primer penículo es de 29-30  $\mu$  (*cuadro 1*).

*Cuadro 1. Medidas de longitud (L) y anchura (A) del cuerpo, relación entre longitud y anchura (L/A) y longitud (P) del primer penículo, tomadas en ocho individuos de la estirpe 1 de Frontonia leucas, impregnados con plata*

Individuos	L, micras	A, micras	L/A	P, micras
1	138	68	2,02	30
2	185	102	1,81	30
3	150	80	1,87	29
4	122	63	1,95	29
5	180	100	1,80	29
6	160	62	2,58	29
7	150	60	2,50	30
8	135	63	2,14	29



El tercer penículo está algo separado de los otros dos, y en su último tercio se incurva hacia el fondo de la cavidad bucal. Está integrado por cuatro hileras de gránulos finos (*figura 1*); la primera de estas hileras (la más externa) se interrumpe poco antes de iniciarse la curvatura del penículo; la segunda se extiende hasta poco después de la curvatura, y las otras dos llegan hasta el extremo posterior.

La cinetia paraoral (*figura 1*) recorre todo el borde derecho de la cavidad bucal y está muy próxima a la primera cinetia vestibular.

A lo largo de la pared derecha de la cavidad bucal se puede observar claramente la línea argentófila (*figuras 1, 5 y 13*).

#### *Estirpe 2*

##### *Morfología*

Cuerpo de forma oval, ligeramente apuntada por el extremo anterior (*figura 7*). Su tamaño oscila entre 115 y 170  $\mu$  de longitud, por 62 a 90  $\mu$  de anchura (*cuadro 2*).

La abertura bucal está situada hacia la parte media de la mitad anterior del cuerpo (*figura 7*), es apuntada en su parte anterior y truncada por la posterior. De su vértice posterior derecho parte la sutura postoral (*figura 2*), que se extiende longitudinalmente hasta el extremo posterior de la célula.

Hay una sola vacuola pulsátil, situada detrás de la línea ecuatorial, en la mitad derecha del cuerpo, y con un solo poro excretor, de posición lateral (*figura 8*).

En cada individuo se observa un macronúcleo elipsoidal y dos micronúcleos fusiformes.

##### *Infraciliación somática*

El cuerpo presenta unas 100 cinetias meridianas, cuyos cinetosomas están integrados por tres gránulos dispuestos formando un triángulo. En el campo postoral hay 5 cinetias que, partiendo del borde posterior de la abertura bucal, terminan en la sutura postoral.

##### *Infraciliación vestibular*

A la derecha de la cavidad bucal hay 3 cinetias vestibulares que se inician junto al ápice de la cavidad bucal, a la altura de la parte anterior del primer penículo (*figuras 2 y 16*), y se extienden hacia la

parte posterior hasta alcanzar la sutura postoral. Estas 3 cinetias transcurren paralelas en su primer tramo; pero al llegar a la altura de la parte media de la cavidad bucal, las dos más externas se separan de la primera, volviendo a hacerse paralelas, una vez rebasado el borde posterior de dicha cavidad.

#### *Infraciliación oral*

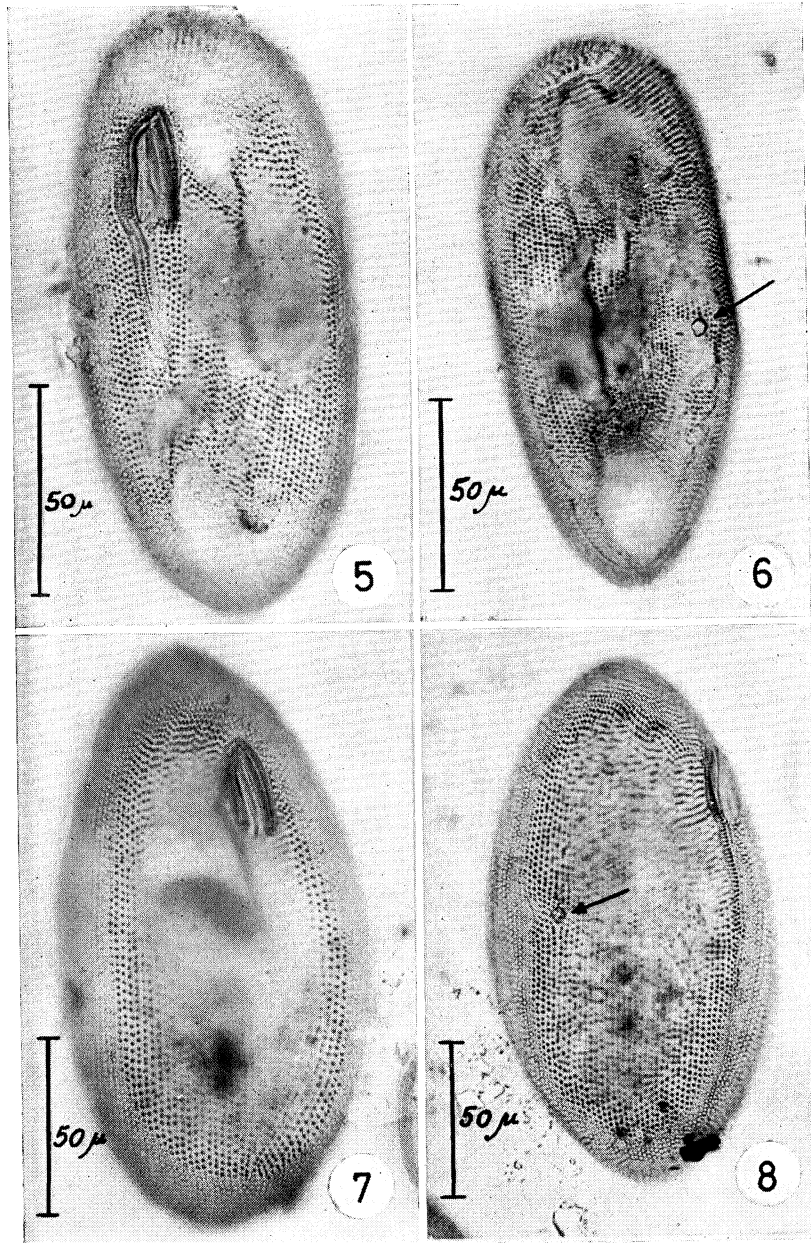
En la pared izquierda de la cavidad bucal hay tres penículos (*figuras 2, 7 y 15*), los dos más externos corren muy próximos entre sí y paralelos al borde izquierdo de la cavidad bucal; cada uno de estos dos penículos está integrado por cuatro hileras de gránulos finos (*figuras 1 y 15*). La longitud del primer penículo es de 29-30  $\mu$  (*cuadro 2*).

*Cuadro 2. Medidas de la longitud (L) y anchura (A) del cuerpo, relación entre longitud y anchura (L/A) y longitud (P) del primer penículo, tomadas en diez individuos de la estirpe 2 de Frontonia leucas, impregnados con plata*

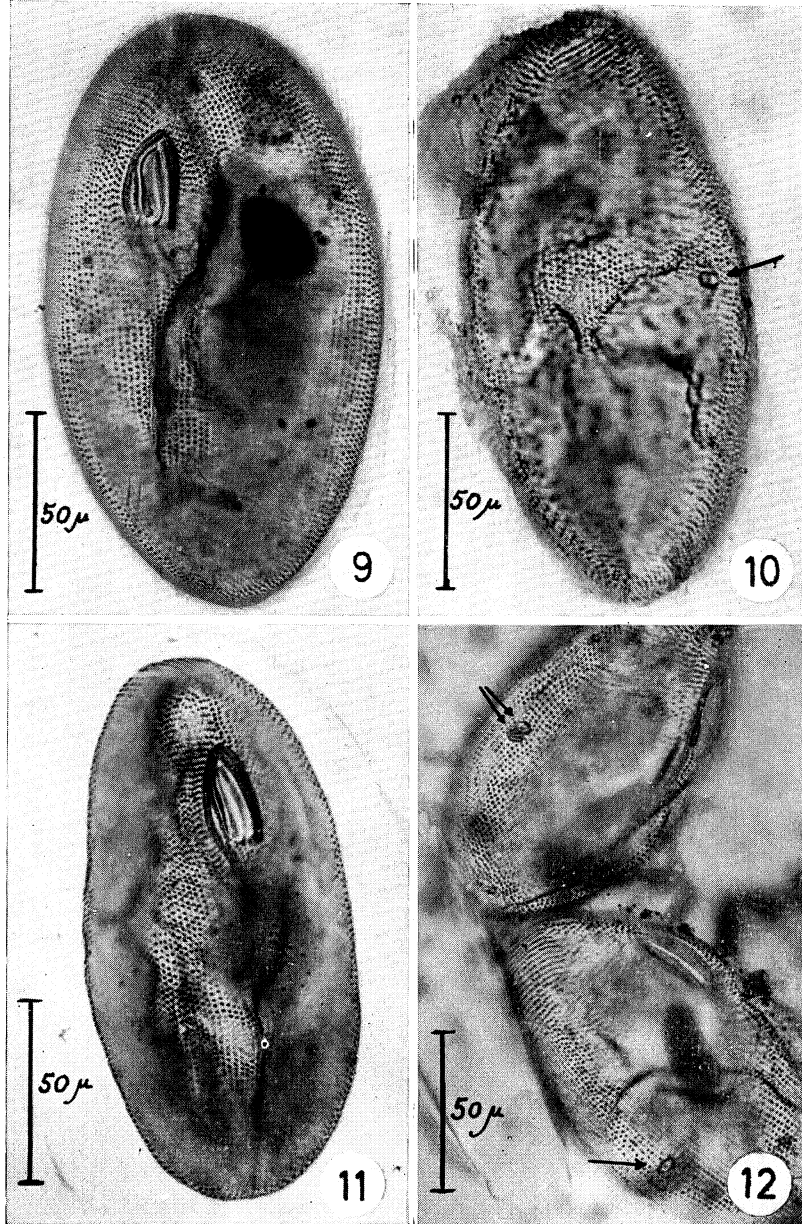
Individuos	L, micras	A, micras	L/A	P, micras
1	115	62	1,85	29
2	160	90	1,66	29
3	138	62	2,22	29
4	160	80	2,00	29
5	155	82	1,86	29
6	165	90	1,83	30
7	130	65	2,00	29
8	165	75	2,20	29
9	170	90	1,87	29
10	160	80	2,00	29

El tercer penículo está algo separado de los otros dos y en su tramo posterior presenta una curvatura hacia el citostoma; en su parte anterior se observan cinco hileras de gránulos; en su tramo medio, cuatro, y en su extremo posterior, sólo tres (*figura 2*).

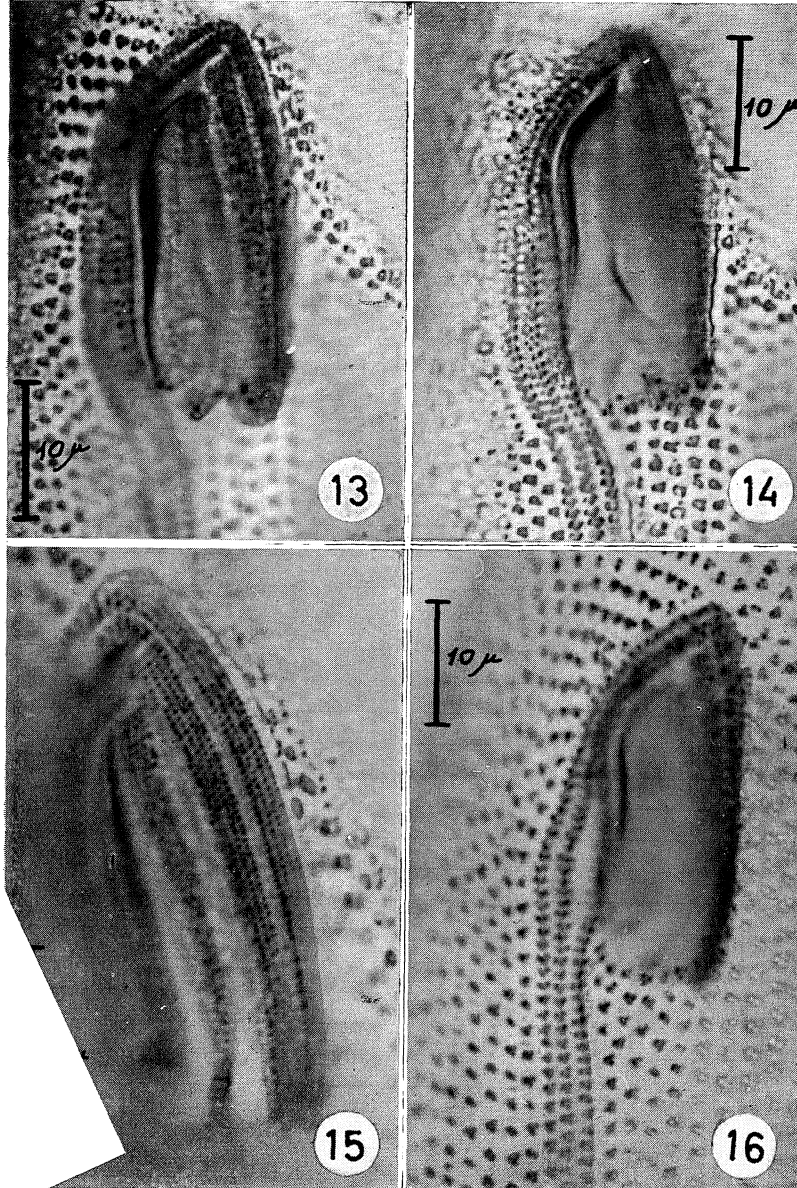
La cinetia paraoral (*figura 2*) recorre todo el borde derecho de la cavidad bucal, muy próxima a la primera cinetia vestibular. La línea argentófila se extiende a lo largo de la pared derecha de la cavidad bucal (*figura 2*).



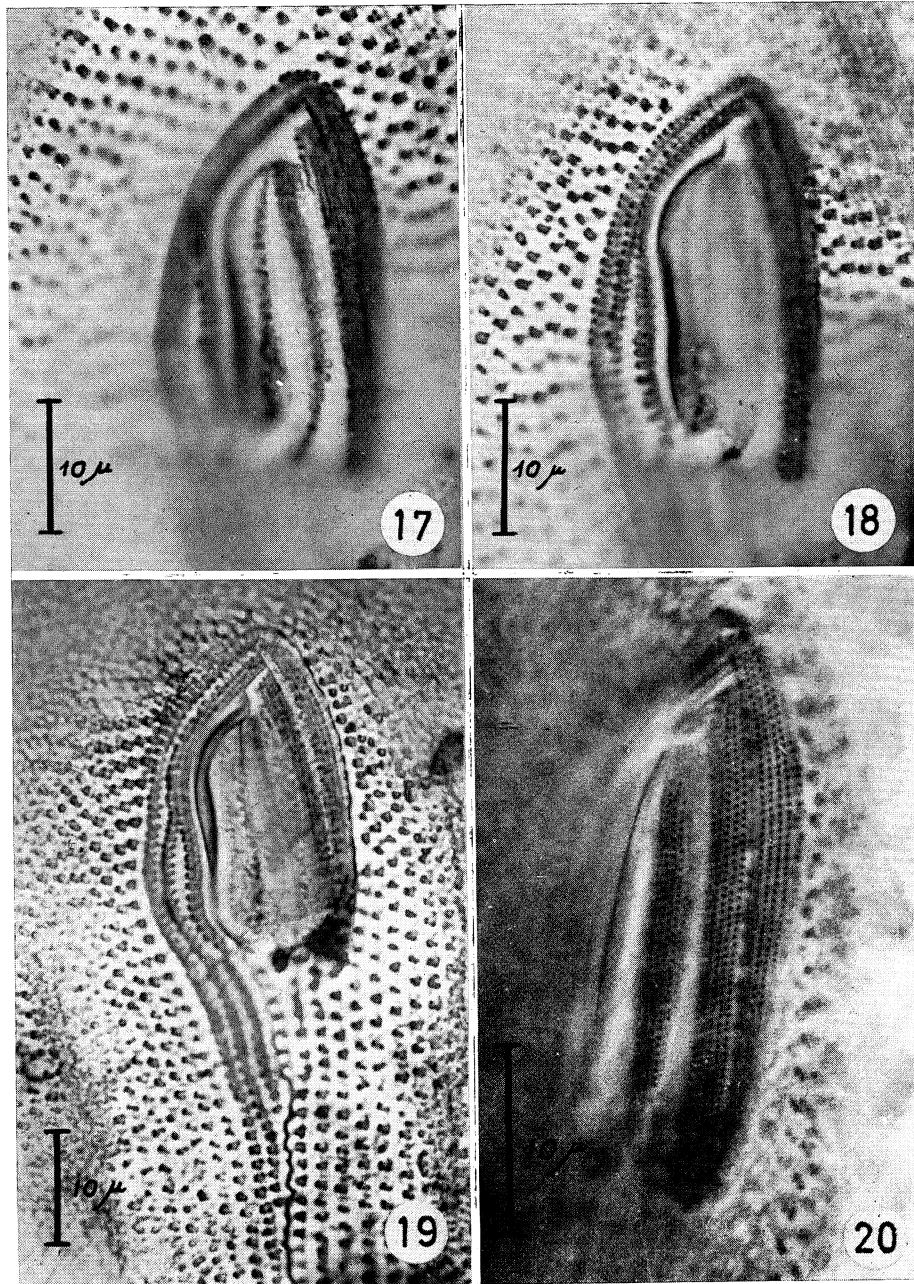
Figuras 5-8. Frontonia leucas. Impregnación argéntica. Las flechas señalan el poro excretor. 5-6) Vistas ventral y dorsal, respectivamente, de la estirpe 1. 7-8) Vistas ventral y lateral de la estirpe 2



Figuras 9-12. *Frontonia leucas*. Impregnación argéntica. Las flechas indican la posición de los poros excretorios. 9-10) Vistas ventral y dorsal, respectivamente, de la estirpe 3. 11-12) Vistas ventral y lateral de la estirpe 4



Figuras 13-16. *Frontonia leucas*. Impregnación argéntica. 13-14) Dos enfoques del área bucal de un mismo individuo de la estirpe 1. 15) Peniculus de la estirpe 2. 16) Área oral de la estirpe 2 (se enfocan las cinetias vestibulares)



Figuras 17-20. *Frontonia leucas*. Impregnación argéntica. 17-18) Dns enfoques del área oral de un mismo individuo de la estirpe 3. 19) Área oral de la estirpe 4. 20) Detalle de los peniculos de la estirpe 4

*Estirpe 3**Morfología*

Cuerpo de forma elipsoidal (*figura 9*), ligeramente deprimido; su tamaño oscila entre 130 y 190  $\mu$  de longitud, por 70 a 85  $\mu$  de anchura (*cuadro 3*).

La abertura bucal está situada hacia la parte media de la mitad anterior del cuerpo, y es apuntada por su extremo anterior y truncada por la parte posterior (*figura 9*). Del vértice posterior derecho parte la sutura postoral (*figura 3*), que se prolonga hasta el extremo posterior del cuerpo.

Posee una vacuola pulsátil, situada detrás de la línea ecuatorial, y que se abre al exterior por un solo poro excretor, de posición dorsal (*figura 10*).

Hay un solo macronúcleo elipsoidal y dos o más micronúcleos piriformes.

*Infraciliación somática*

El cuerpo presenta unas 110 cinetias meridianas, cuyos cinetosomas están alternando con los tricocistos; los cinetosomas de estas cinetias se componen de tres gránulos dispuestos formando un triángulo. En el campo postoral se observan 4 cinetias que, partiendo del borde posterior de la abertura bucal, van a terminar en la sutura postoral.

*Infraciliación vestibular*

Las 3 cinetias vestibulares (*figuras 3 y 18*) corren paralelas entre sí hasta el primer tercio de la cavidad bucal, donde la primera de estas cinetias se separa de las otras dos, hasta que, rebasado el borde posterior de la cavidad bucal, vuelven a hacerse paralelas y así continúan hasta que terminan en la sutura postoral.

*Infraciliación oral*

En la pared izquierda de la cavidad bucal hay tres penículos (*figuras 3 y 17*); los dos primeros (los más externos) corren muy próximos entre sí y paralelos al borde izquierdo de la cavidad bucal, y están integrados por cinco hileras de gránulos muy finos. La longitud del primer penículo es de 29-30  $\mu$  (*cuadro 3*).

Cuadro 3. Medidas de la longitud (L) y anchura (A) del cuerpo, relación entre longitud y anchura (L/A) y longitud (P) del primer penáculo, tomadas en ocho individuos de la estirpe 3 de *Frontonia leucas*, impregnados con plata

Individuos	L, micras	A, micras	L/A	P, micras
1	155	80	1,93	30
2	130	85	1,52	29
3	190	84	2,26	30
4	160	85	1,87	30
5	132	72	1,83	29
6	170	71	2,39	30
7	190	95	2,00	30
8	170	70	2,42	30

El tercer penáculo está algo separado de los otros dos, sobre todo en su tramo final, que se incurva hacia el citostoma. Está integrado por cinco hileras de gránulos, de distinta longitud (*figura 3*); las tres primeras son incompletas, comienzan en el extremo anterior del penáculo y van terminando escalonadamente antes de que se inicie la curvatura del penáculo, y las dos restantes son completas (llegan hasta el extremo posterior del penáculo).

La cinetia paraoral (*figura 3*) recorre todo el borde derecho de la cavidad bucal y está muy próxima a la primera cinetia vestibular. La línea argentófila es muy patente y se extiende a lo largo de la pared derecha de la cavidad bucal (*figuras 3 y 18*).

#### Estirpe 4

##### Morfología

El cuerpo, de forma elipsoidal (*figura 11*), mide de 113 a 160  $\mu$  de longitud, por 48 a 90  $\mu$  de anchura (*cuadro 4*).

La abertura bucal está situada hacia la parte media de la mitad anterior del cuerpo, tiene forma lanceolada (*figuras 11 y 19*), apuntada por la parte anterior y truncada por la posterior.

Del vértice posterior derecho de la abertura bucal parte la sutura postoral (*figura 4*), que se extiende longitudinalmente hasta el extremo posterior del cuerpo (*figura 11*).



Hay una vacuola pulsátil situada detrás de la línea ecuatorial y que se abre al exterior por uno o dos poros excretores localizados en el flanco derecho de la célula (*figura 12*).

Cada individuo posee un macronúcleo de forma elipsoidal y dos o más micronúcleos piriformes.

#### *Infraciliación somática*

El cuerpo presenta unas 110 cinetias somáticas meridianas, cuyos cinetosomas están integrados por tres gránulos argentófilos agrupados formando un triángulo; en cada cinetia, estos cinetosomas están alternando con los tricocistos. En el campo postoral se observan 5 cinetias que van desde el borde posterior de la abertura bucal a la sutura postoral (*figura 4*).

#### *Infraciliación vestibular*

A la derecha de la abertura bucal hay 3 cinetias vestibulares que se inician frente al extremo anterior del primer penículo (*figuras 4 y 19*) y que corren más o menos paralelas entre sí hasta alcanzar la sutura postoral, donde terminan escalonadamente.

#### *Infraciliación oral*

En la pared izquierda de la cavidad bucal existen tres penículos (*figuras 4 y 19*); los dos primeros corren muy próximos entre sí y paralelamente al borde izquierdo de la cavidad bucal. Cada uno de estos dos penículos está integrado por cinco hileras de gránulos finos (*figuras 4 y 20*). La longitud del primer penículo es de 29-30  $\mu$  (*cuadro 4*).

Cuadro 4. Medidas de la longitud (L) y anchura (A) del cuerpo, relación entre longitud y anchura (L/A) y longitud (P) del primer penículo, tomadas en diez individuos de la estirpe 4 de *Frontonia leucas*, impregnados con plata

Individuos	L, micras	A, micras	L/A	P, micras
1	160	70	2,28	30
2	130	55	2,35	29
3	140	73	1,91	30
4	143	67	2,13	30
5	120	60	2,00	29
6	150	90	1,66	30
7	113	48	2,35	30
8	130	67	1,94	29
9	150	70	2,14	30
10	130	69	1,88	29

El tercer penículo está algo separado de los otros dos y en su último tercio se incurva hacia el fondo de la cavidad bucal. Está integrado por cinco hileras de gránulos, de distinta longitud, siendo las tres primeras incompletas, y las dos últimas, completas.

La cinetia paraoral (*figuras 4 y 19*) recorre todo el borde derecho de la cavidad bucal y está muy próxima a la primera cinetia vestibular. La línea argentófila se extiende a lo largo de la pared derecha de la cavidad bucal, pero en su tramo posterior es muy poco patente.

## DISCUSION

Siguiendo las claves de Kahl (5) o las de Bullington (1), las cuatro estirpes estudiadas en este trabajo se pueden identificar como *Frontonia leucas* Ehrenberg; sin embargo, según nuestras observaciones, existen claras diferencias entre ellas, en cuanto a los detalles de su infraciliación (*cuadro 5*). En efecto, las estirpes 1 y 2 presentan cuatro hileras

Cuadro 5. Algunas de las características de la infraciliación observadas en distintas estirpes de *Frontonia leucas*

Estirpe	Longitud micras del primer penículo	Número de cinetias				
		Peniculares			Postorales	Somáticas
		P1	P2	P3		
1	29-30	4	4	4	5	115
2	29-30	4	4	5	5	100
3	29-30	5	5	5	4	110
4	29-30	5	5	5	5	110
(Roque)		6	5	5	8	100-120

de gránulos en los dos primeros penículos, mientras que en las estirpes 3 y 4 se observan cinco hileras; las estirpes 1, 2 y 4 poseen 5 cinetias postorales, en cambio, la estirpe 3 sólo posee cuatro. Además, nuestras postorales; en cambio, la estirpe 3 sólo posee 4. Además, nuestro describe seis hileras de gránulos en el primer penículo, y cinco en los otros dos; asimismo describe 8 cinetias en el campo postoral. Aún podemos añadir otra diferencia entre nuestras observaciones y las de Roque (6): según el esquema que hace esta autora, los extremos anteriores de los penículos de *Fr. leucas* están alineados, mientras que en nuestras estirpes se presentan claramente escalonados.

Estas diferencias entre las estirpes nos inducen a poner en duda la idea generalmente aceptada de que la infraciliación es un carácter fijo al nivel de la especie, y en consecuencia creemos que para describir la infraciliación de una especie es necesario estudiar diversas estirpes, lo cual permitirá, no sólo conocer los límites de variabilidad de los distintos caracteres, sino también establecer nuevos criterios taxonómicos que sirvan de base para la revisión del género.

También hemos encontrado diferencias en cuanto al número y localización de los poros excretores. Las estirpes 1, 2 y 3 presentan un solo poro excretor, mientras que en la estirpe 4 se pueden observar uno o dos; el poro es dorsal en las estirpes 1 y 3, y lateral en las estirpes 2 y 4.

El carácter más fijo que hemos encontrado es la longitud del primer penículo. Esta longitud es de 29 a 30  $\mu$  en las cuatro estirpes estudiadas,

y es independiente de las dimensiones del cuerpo del protozoo (véanse los cuadros 1-4). Por ello, creemos que puede servir como carácter diferencial de *Frontonia leucas*.

#### RESUMEN

Empleando la técnica de impregnación argéntica de Chatton-Lwoff, se estudia la infraciliación de cuatro estirpes de *Frontonia leucas* Ehrenberg. Se discute el posible valor taxonómico de algunos detalles de la infraciliación y se propone como carácter diferencial de la especie, la longitud (29-30  $\mu$ ) del primer penículo.

#### SUMMARY

By using the Chatton-Lwoff impregnation technic, the infraciliature of four strains of *Frontonia leucas* Ehrenberg is studied, and the taxonomic value of some features discussed. The feature more constant, common to the four strains, is the length (29-30  $\mu$ ) of the first peniculus. The authors propose this feature as differential one.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BULLINGTON, W. E. 1939. A study of spiraling in the ciliate *Frontonia* with a review of the genus and description of two new species. Arch. Protistenk., 92, 10-66.
2. CORLISS, J. O. 1953. Silver impregnation of ciliated Protozoa by Chatton-Lwoff technic. Stain Technol., 28, 97-100.
3. GIL, R., y PÉREZ-SILVA, J. 1964. The infraciliature of *Frontonia depressa* Stokes. Arch. Protistenk, 107, 363-72.
4. GIL, R., y PÉREZ-SILVA, J. 1964. La infraciliación de *Frontonia acuminata* Ehrenberg. Microbiol. Españ., 17, 69-78.
5. KAHL, A. 1930-1935. Urtiere oder Protozoa. 1. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 2. Holotricha. En Die Tierwelt Deutschlands. G. Fischer, Jena.
6. ROQUE, M. 1961. Recherches sur les Infusoires Ciliés. Les Hymenostomes Peniculiens. Bull. Biol. France Belg., 95, 432-519.

## EL PROXIMO CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Está proyectada la celebración del IX Congreso Internacional de Microbiología en Moscú, del 24 al 30 de julio de 1966. Tendrán lugar dos o tres conferencias a cargo de especialistas, nueve o diez simposios y sesiones de comunicaciones. El programa científico se ajustará, en principio, al temario siguiente:

- A. Fisiología y genética de los microorganismos.
- B. Actividades químicas de los microorganismos.
- C. Microbiología industrial y agrícola.
- D. Microbiología médica y veterinaria.
- E. Virología.
- F. Inmunología.
- G. Epidemiología.

Toda la correspondencia debe dirigirse al Prof. Sdanof, Secretario General del Comité Nacional Soviético de Organización del IX Congreso Internacional de Microbiología, Instituto de Virología, Moscú D-98 (U. R. S. S.).

Depósito Legal: M. 702. - 1958

---

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15 - Madrid