

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XVII - Núm. 1

1976

Consejo de Redacción

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. D. José Luis Valverde

Vocales:

Prof. Dr. D. Alberto
Cormenzana

Prof. Dr. D. Fermín Sánchez
de Medina Contreras

Prof. Dr. D. Antonio Cerezo
Galán

Secretario de Redacción:

Prof. Dr. D. Luis Bravo Díaz

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia,
Granada - España.

Dep. Legal, GR: núm. 17-1960

Imprime:

Gráficas del Sur, S. A.
Boquerón, 6
Granada 1976.

1.000 ejemplares

De conformidad con lo preceptuado en el artículo 21 de la vigente Ley de Prensa e Imprenta, se hace pública la relación de los *Organos Rectores* de esta revista.

Sumario

PAG.

Memoria de Actividades de la Facultad de Farmacia 3

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Secreción de vitaminas por microorganismos del Rumen. Por P. Romero, M.^a Aguilar 85
- Influencia de agentes Tensioactivos sobre la velocidad de disolución de comprimidos. Por J. Sánchez-Morcillo y E. Sellés... .. 97

TRABAJOS DE COLABORACION

- Ensayos sobre la purificación del agua. Por Jesús Mallol Escobar ... 111
- Orientación Bibliográfica básica para la Historia de Farmacia. Por José-Luis Valverde... .. 117
- Premio «Soler y Batlle», de Investigación Galénica 149
- Crítica de libros 153

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA
Prof. Dr. D. ALBERTO RAMOS CORMENZANA

SECRECION DE VITAMINAS POR MICROORGANISMOS DEL RUMEN

por
P. ROMERO, M.^a M. AGUILAR

INTRODUCCION

Las vitaminas son compuestos orgánicos esenciales para la nutrición de los seres vivos.

Se encuentran tanto en el suelo (1) (2) (3) —procedentes de restos de plantas, animales y bacterias— como en los seres vivos (4) (5) y (6).

BAGDASARIAM (7) confirmó que gran parte de la vitamina B₁₂ que se encuentra en el suelo es producida por especies de *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Azotobacter*. GEORGIEVA y SHEIKOVA (8) aislaron del suelo 175 especies de Actinomicetos productores de dicha vitamina.

En el presente trabajo se pretende el aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias a partir del rumen de animales e investigar la producción de vitaminas por las mismas.

MATERIAL Y METODOS

Material

Muestras.—Se han utilizado 17 muestras de contenido de rumen correspondiendo 8 a vaca y 9 a cordero aislándose 20 estirpes de bacterias anaerobias.

Las características de las muestras así como el tipo de flora observada fue la siguiente (microfotografías núm.: 1-2-3-4):

Muestras núm. 1.—Cordero de unos 6 meses de edad, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: predominio de flora Gram negativa constituida por formas ovales, bacilos tipo *Selenomonas* y cocos aislados, en parejas y cadenas. También se observan cocos Gram positivos.

Aislamiento: En el medio de Hungate modificado (9) se aisló una sola especie correspondiendo a cocos alargados Gram positivos dispuestos en parejas y en masas. Se designa estirpe C-1a (C: cordero 1, núm. de orden y a por ser un solo tipo de colonias observado).

Muestra núm. 2.—Cordero de unos 6 meses, alimentado con pasto. Tinción de Gram: predominio de flora Gram positiva constituida por cocos Gram positivos tipo *Sarcina*, otros en cadena tipo estreptococos y bacilos Gram positivos. También se observan cocos Gram negativos tipo *Lampropedia*.

Aislamiento: Cocos elongados Gram positivos dispuestos en cadenas. Estirpe C-2a.

Muestra núm. 3.—Cordero de unos 6 meses de edad, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: se observan bacilos Gram negativos, *Selenomonas*, otros alargados y finos, así como formas ovales tipo Woodcock. También se observan cocos Gram positivos en parejas.

Aislamiento: cocos Gram positivos: C-3a.

Muestra núm. 4.—Cordero de 1 año, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: abundantes formas ovales de Woodcock, cocos Gram negativos aislados y en cadenas y bacilos tipo *Selenomonas*. También se observan cocos Gram positivos en parejas, bacilos Gram positivos y cocos tipo *Sarcina*.

Aislamiento: cocos Gram positivos en cadenas: C-4a.

Muestra núm. 5.—cordero de 1 año, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: cocos Gram negativos en cadenas, formas ovales de Woodcock, cocos Gram positivos tipo *Sarcina* y otros más escasos en parejas.

Aislamiento: cocos Gram negativos en cadenas y parejas: C-5a.

Muestra núm. 6.—Cordero de 8 meses de edad, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: bacilos tipo Selenomonas, formas ovales de Woodcock, formas crescentes y espiroquetas. También se observan cocos Gram positivos y células ovales de Quin.

Aislamiento: cocobacilos Gram positivos en cadenas: C-6a.

Muestra núm. 7.—Cordero de 1 año, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: abundantes formas ovales de Woodcock, cocos Gram negativos en cadenas, y espiroquetas. También se observan cocos Gram positivos tipo Sarcina así como bacilos Gram positivos largos y finos.

Aislamiento: cocos Gram negativos en cadenas: C-7a.

Muestra núm. 8.—Cordero de 9 meses, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos en largas cadenas y formas multicelulares tipo Oscillospira.

Aislamiento.—cocobacilos Gram positivos en cadenas: C-8a.

Muestra núm. 9.—Cordero de 1 año, alimentado con pasto.

Tinción de Gram: ba

formas ovoides y cocos Gram positivos en cadenas.

Aislamiento.—cocos Gram negativos en cadenas: C-9a.

Muestra núm. 10.—Vaca de unos 5 años, alimentada con paja y pienso compuesto.

Tinción de Gram.—cocobacilos Gram negativos, espiroquetas y bacilos tipo Selenomonas. También se observan cocos Gram positivos en cadenas y otros tipo Sarcina.

Aislamiento: dos tipos de bacterias: unos cocobacilos Gram negativos capsulados y anaerobios facultativos V-10a y otros cocos Gram positivos tipo Sarcina: V-10b.

Muestra núm. 11.—Vaca de unos cuatro años, alimentada con pasto.

Tinción de Gram.—flora abundante constituida por bacilos Gram negativos unos con extremos redondos y otros con extremos puntiagudos; espiroquetas y otros tipo Selenomonas. También se observan cocos Gram positivos tipo Sarcina y otros en parejas.

Aislamiento: cocos Gram positivos aislados y en parejas, anaerobios facultativos: V-11a.

Muestra núm. 12.—Vaca de unos 4 años de edad, alimentada con pienso.

Tinción de Gram: bacilos Gram negativos rectos, otros curvados y de extremos puntiagudos. También se observan cocos Gram positivos tipo Sarcina y más escasos cocos Gram positivos aislados.

Aislamiento: cocos Gram positivos en cadenas, anaerobios estrictos; V-12a.

Muestra núm. 13.—Vaca de 5 años de edad, alimentada con pasto.

Tinción de Gram: bacilos Gram negativos incurvados tipo Vibrio, otros tipo coli y cocos Gram negativos en cadena. También se observan Lampropedia, formas en roseta y escasos cocos Gram positivos.

Aislamiento: cocos Gram positivos en parejas y cadenas cortas, V-13a y otros cocos Gram negativos: V-13b.

Muestra núm. 14.—Vaca de 3 años, alimentación rica en paja.

Tinción de Gram: bacilos Gram negativos rectos y otros incurvados, espiroquetas y formas ovoides. También se observan formas tipo Sarcina y cocos Gram negativos.

Aislamiento: cocos Gram negativos: V-14a.

Muestra núm. 15.—Vaca de 4 años de edad, alimentada con pasto.

Tinción de Gram: abundante flora Gram negativa constituida por bacilos rectos, cocos y células ovoides. También se observan cocos aislados Gram positivos y otros tipo Sarcina.

Aislamiento: cocos Gram negativos anaerobios estrictos, V-15a y cocos Gram negativos anaerobios facultativos: V-15b.

Muestra núm. 16.—Vaca de 5 años de edad. Alimentada con paja.

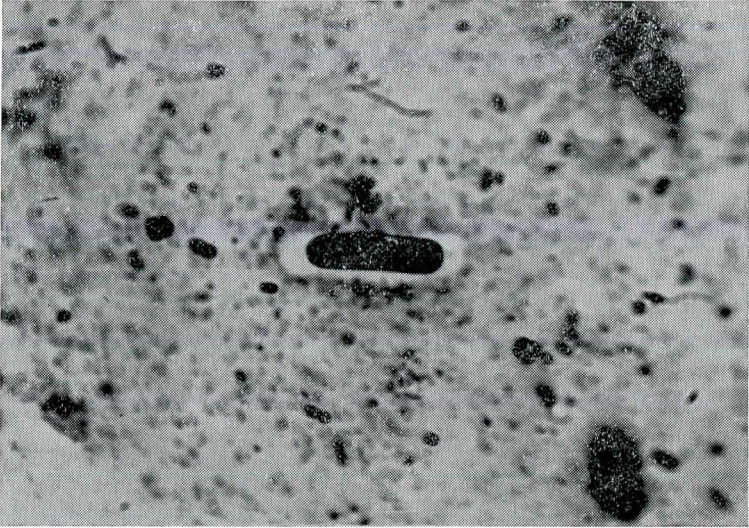
Tinción de Gram: formas Gram negativas constituida por cocos en masas y en cadenas y formas ovales. También se observan escasos cocos Gram positivos.

Aislamiento: cocos Gram positivos V-16a.

Muestra núm. 17.—Vaca de 4 años de edad, alimentada con pienso compuesto.

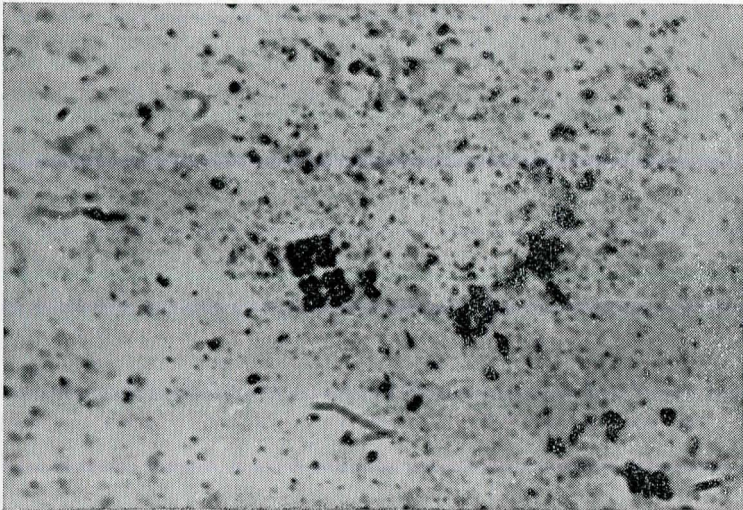
Tinción de Gram: abundante flora Gram negativa constituida por bacilos, cocos y formas incurvadas. También se observa escasos cocos Gram positivos.

Aislamiento: cocos Gram positivos tipo estreptococo: V-17a.



MICROFOTOGRAFIA NUM. 1

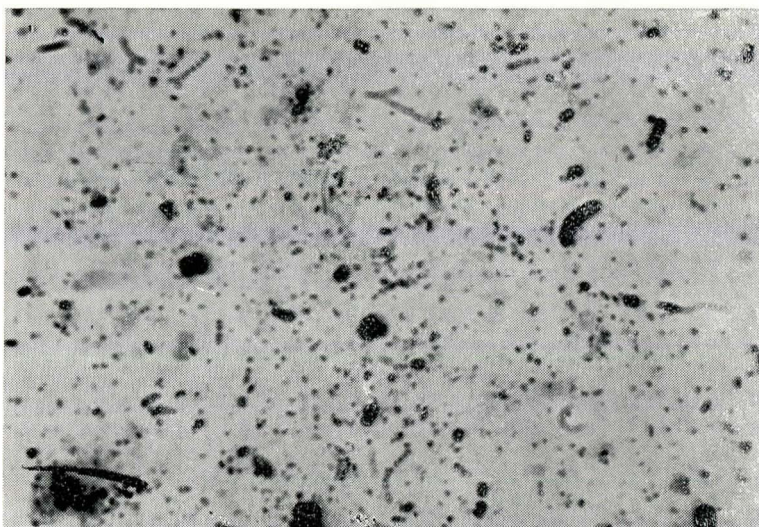
Se destaca

(Aumento $\times 1.250$)

MICROFOTOGRAFIA NUM. 2

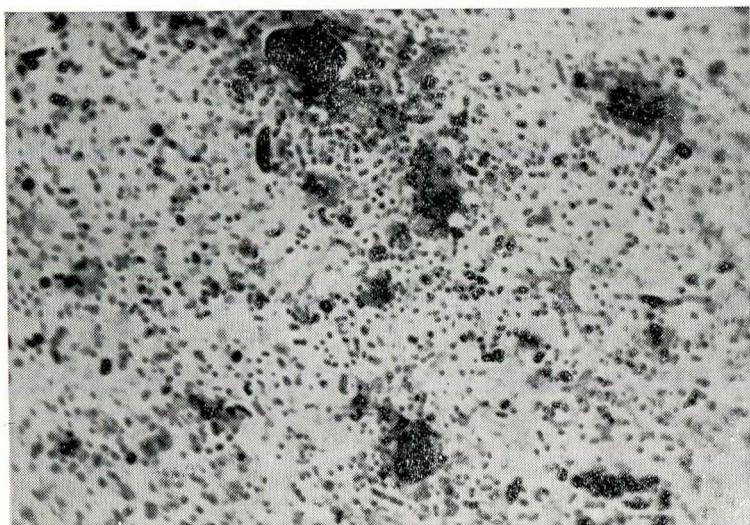
Agrupaciones de cocos Gram positivos que a su vez se disponen formando láminas, tipo Lampropedia

(Aumento $\times 1.250$)



MICROFOTOGRAFIA NUM. 3

Cocos Gran positivos (de mayor tamaño) y escasos cocos Gram negativos (de menor tamaño). También se observa una forma incurvada Gram negativa tipo Selenomonas (Aumento $\times 1.250$)



MICROFOTOGRAFIA NUM. 4

Formas ovales Gram negativas, abundantes cocos Gram negativos y algunos Gram positivos. (Aumento $\times 1.250$)

Cepas auxotróficas.—*Leuconostoc mesenteroides* ATCC-8.042 para la vitamina B₁₂ y pantenol; *Lactobacillus fermentium* ATCC 9338 para niacina y riboflavina.

Medio para el aislamiento de gérmenes celulolíticos. Medio de Hungate modificado por ROMERO y CAMPOS (9).

Cada 100 ml contiene:

- | | |
|---|-------|
| a) Solución de Hungate | 25 ml |
| b) Solución de fosfato monopotásico al 0,3%... .. | 25 ml |
| c) Solución nutritiva... .. | 50 ml |
| d) Agar agar | 2,2 g |

pH: 6,5, esterilizado a 112° durante 30 minutos.

Solución de Hungate. Composición: fosfato monopotásico 0,3%, sulfato amónico 0,3, cloruro sódico 0,6%, cloruro cálcico 0,03%, sulfato magnésico 0,03%.

Solución nutritiva —sustituye al líquido del rumen— composición: extracto de levadura 0,2 g; extracto de carne 0,3 g; celulosa 0,1 g; 50 ml.

Medio base para revelado.— Se emplea el medio de Hungate modificado (anteriormente descrito), exento de extracto de levadura y de extracto de carne.

Medio de ensayo para vitaminas.—Preparados y esterilizados según manual Difco (10).

Bacto B₁₂ assay medium USP deshidrated Code 0457-15.

Bacto niacin assay medium deshidrated Code 0322-15

Bacto riboflavin assay medium deshidrated code 0325-15.

Bacto panthenol assay medium deshidrated. Code 0994-15.

Medio inculo para revelado.—Preparado y esterilizado según manual Difco (10): Bacto lactobacilli broth deshidrated. Code 0901 15-3.

Medio para conservación de cepas de revelado.—Preparado y esterilizado según manual Oxoid (11): M. R. S. agar. Code CM-361.

Solución Ringer.—Cloruro sódico 1,8g; cloruro potásico 0,25g; Cloruro cálcico 0,3 g; bicarbonato sódico 0,2 g; agua destilada 1000 ml.

Solución Ringer al cuarto: se diluyen 100 ml en 300 ml de agua destilada. Como agente solidificante se añade agar purificado al 3%.

Métodos

Toma de muestras.—Se realizó en el matadero municipal de Granada. El contenido del rumen se obtuvo de animales sacrificados cruentamente y dentro de la hora siguiente a su muerte.

Aislamiento: se realizó por diseminación en superficie en el medio de Hungate modificado por ROMERO y CAMPOS (9). La incubación se practica en campanas de anaerobios a 37°C durante 48 horas, empleándose como generador de gas el sistema Gas-Pak

Revelado: la técnica está basada en el método de revelado en placa de UDAKA (12) y GUINEA (13) modificado para vitaminas.

Las estirpes a ensayar se siembran en masa en 4 puntos equidistantes y se incuban en anaerobiosis a 37°C durante 5 días procediéndose a continuación al revelado. Para ello en Lactobacillibroth AOAC se siembra la bacteria auxotrófica adecuada a la vitamina a ensayar y se incuban a 30°C durante 24 horas. Un asa calibrada de este inóculo se suspende en 6 ml de un medio de ensayo de composición definida (10) que posee los nutrientes necesarios para su crecimiento a excepción de la vitamina a ensayar. A continuación se vierte sobre 6 ml de agar-Ringer al cuarto fundido a 45°C, retornando nuevamente la muestra al medio para vitaminas, que se extiende sobre la placa que contiene las estirpes a investigar e incubándose a 30°C en aerobiosis durante 72 horas.

Lectura.—Los resultados positivos dan lugar a halos de crecimiento de la cepa auxotrófica —observables macroscópicamente o microscópicamente mediante lupa de 40 aumentos— de diferente extensión y densidad. Es más precisa y exacta la lectura microscópica ya que aprecia la densidad y amplitud y la zona de crecimiento. Se expresan atendiendo a los siguientes criterios:

negativo: —; positivo microscópico: + m; halo de 0,5 a 2 mm: +; halo de 2 a 4 mm: ++; más de 4 mm: +++; halo de inhibición del crecimiento rodeado de zona de crecimiento: h.

Resultados discusión

Los resultados obtenidos se indican en la tabla I y II. La tabla I muestra las estirpes aisladas a partir del rumen de cordero y vaca. En ella se observa un 50% de cocos Gram negativos, un 40% de cocos Gram positivos y un 10% de cocobacilos Gram positivos.

La tabla II muestra las estirpes en las que se ha investigado la secreción de vitaminas.

Estos resultados indican que el número de especies bacterianas aisladas en anaerobiosis a partir de cada muestra —en las condiciones de experimentación indicadas— es muy escaso y concretamente para cordero una sola especie por muestra y para vaca una o dos especies (muestras 10-13 y 15). En ningún caso de las 20 estirpes sayadas se detectó la secreción de vitamina B₁₂, niacina, pantenol ni riboflavina.

TABLA I.— ESTIRPES AISLADAS DE RUMEN DE CORDERO Y VACA

Muestra n.º	Rumen de:	Descripción
1	cordero	Cocos alargados Gram positivos
2	cordero	Cocos Gram positivos
3	cordero	Cocos Gram positivos, en cadenas
4	cordero	Cocos Gram positivos, en cadenas
5	cordero	Cocos Gram negativos en cadenas
6	cordero	Cocobacilos Gram positivos en cadenas
7	cordero	Cocos Gram negativos, en cadenas
8	cordero	Cocobacilos Gram positivos en cadenas
9	cordero	Cocos Gram negativos en cadena
10	vaca	a) Cocos Gram negativos, capsulados b) Cocos Gram positivos, tipo sarcina
11	vaca	Cocos Gram positivos en parejas
12	vaca	Cocos Gram positivos, en cadenas
13	vaca	a) Cocos Gram negativos en cadenas b) Cocos Gram negativos aislados
14	vaca	Cocos Gram negativos
15	vaca	a) Cocos Gram negativos b) Cocos Gram negativos
16	vaca	Cocos Gram negativos
17	vaca	Cocos Gram positivos en cadenas

TABLA II.—RESULTADOS DE LA SECRECIÓN DE VITAMINAS POR LAS ESTIRPES ENSAYADAS

Estirpe	B ₁₂	Niacina	Pantenol	Riboflavina
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10a	—	—	—	—
10b	—	—	—	—
11	—	—	—	—
12	—	—	—	—
13a	—	—	—	—
13b	—	—	—	—
14	—	—	—	—
15a	—	—	—	—
15b	—	—	—	—
16	—	—	—	—
17	—	—	—	—

RESUMEN

Se indica los medios de cultivo, técnica de aislamiento de bacterias celulolíticas de rumen de cordero y vaca, y el método de UDAKA modificado para el revelado de vitaminas. Se concluye que las estirpes investigadas no segregaron al medio de cultivo ninguna de las vitaminas estudiadas: vitamina B₁₂, niacina, pantenol, y riboflavina.

SUMMARY

“Vitamins segregation from rumen's bacteria”

It is shown the culture medium and isolated method for rumen's cellulolytic bacteria from lamb and cow by the UDAKA'S modified method to reveal vitamins. We conclude that the tested strains do not segregated on the medium any of the vitamins testing: B₁₂, niacin, panthenol and riboflavin.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ROULET, M. A.; SHOPFER, W. H. (1950).—“Les vitamines du sol et leur signification”. *Trans. Inter. Cong. Soil Scien.* 4.^a Cong. Amsterdam, 1, 202, Ref.: *Soil. Science* 82, 237.
- 2.—AFRIKYAN, E. K.; BOBIKYAN, R. A. (1959).—“Presence and formation of Vitamin B₁₂ in soil”. *Dokl. Akad. Nankarmyan. SSR*, 29, (2), 89. Ref.: 1933 *Soils and fertilizers*, 24 (4).
- 3.—SUNDARA RAO, W. V. B.; WENKALAROMAN, K. V. (1963).—“Estudied on the rhizosphere microorganisms of wheat”. *Indian J. Agric. Sci.* 33, 163. Ref.: 1513 *Soils and fertilizers* 27 (3).
- 4.—HUNGATE, R. E.; (1966).—“The Rumen and its microbes”. Academic Press. London.
- 5.—POE, S. E.; MITCHELL, G. E.; ELY, D. E. (1972).—“Rumen development in lambs”. III Microbial B. vitamin synthesis. *J. Anim. Sci.* 826-829.
- 6.—ALLISON, M. J., (1969).—“Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms”. *J. Animal Sci.* 29, 797.
- 7.—BAGDASARIAN, E. G. (1965).—“Production of vitamin B₁₂ by soil bacteria”. *Mikrobiologiya*, 34, 502.
- 8.—GEORGIEVA, J.; SHEIKOVA, G. (1963).—“Vitamin B₁₂ formation from various Actinomycetes isolated from Bulgarian Soils”. *Fol. Microbiol.* 8, 322 Ref.: 301 *Soils and fertilizers* 27, (1).
- 9.—CAMPOS TRISTAN, C. A.; ROMERO P. (1971).—“Estudio de la flora bacteriana del rumen y técnica del rumen artificial”. *Tesina Archivos de la Facultad de Farmacia, Granada*.
- 10.—DIFCO (1965).—“Microbial assay of vitamins and aminoacids” Difco. Laboratories. Detroit. Michigan.
- 11.—The oxoid manual 3.^a ed. London.
- 12.—UDAHA, S. (1960).—“Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*”. *J. Bact* 75, 754.
- 13.—GUINEA, J. (1970).—“Análisis colonial de la producción de ácido glutámico por *Citrobacter intermedium* C₃” *Microbiol. Españ.* 23, 13.