

- 19) OEDING, P.; HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1976).—A comparison of antigenic structure and phage pattern with biochemical properties of *S. aureus* strains isolated from sheep. *Acta Pathl. Microbiol. Scand., Sect. B.*, **84**, 61-65.
- 20) PARKER, M. T. (1972).—Phage typing of *S. aureus*. En *Methods in Microbiology*, Vol. 7 B, J. R. NORRIS y D. W. RIBBONS (editors), Academic Press Inc., N. Y., 1-28.
- 21) SUBCOMMITTEE ON PHAGE TYPING OF STAPHYLOCOCCI (1975).—Report. *Int. J. Sist. Bacteriol.*, **25**, 240-242.
- 22) SUBCOMMITTEE ON PHAGE TYPING OF STAPHYLOCOCCI (1971).—Report. *Int. J. Sist. Bacteriol.*, **21**, 167-170.

## PRODUCCION DE LISOZIMA, PROTEASAS Y LIPASAS EN ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE LECHE MAMITICA DE OVEJA

Por: L. Gutiérrez  
I. Menes  
M.<sup>a</sup> L. García  
B. Moreno

### INTRODUCCION

Los estafilococos de origen humano y animal difieren en algunas propiedades, pero todos ellos producen, tanto «in vivo» como «in vitro» un número considerable de sustancias extracelulares con actividad enzimática. A pesar de que su mecanismo de acción no es bien conocido, todas ellas actúan sobre el hospedador, existiendo correlación, a veces muy elevada, entre su elaboración y el carácter patógeno y/o enterotoxigénico.

De todos los enzimas producidos por los miembros del género *Staphylococcus*, las coagulasas y las nucleasas termostables son consideradas de gran valor para identificar especies y diferenciar estafilococos potencialmente patógenos. Teniendo en cuenta, sin embargo, que la virulencia de estos microorganismos se encuentra relacionada más que con un factor único, con la elaboración de una amplia gama de toxinas y enzimas, son muy abundantes los trabajos en los que se investiga la capacidad de producir estas sustancias, ya que esta información contribuye a completar la caracterización de las cepas. En este sentido, cabe destacar la producción de lisozima, de proteasas (gelatinasa y caseinasa) y de lipasas.

La presencia de lisozima en cultivos de estafilococos coagulasa positivos fue observada por Kashiba et al.<sup>20</sup>, quienes asociaron la producción de este enzima con la patogenicidad. Posteriormente, Grosgebauer et al.<sup>10</sup>, señalan que la elaboración de lisozima es un buen índice de patogenicidad, superior incluso a la producción de coagulasa libre. Esta idea no fue aceptada por otros investigadores<sup>16 18 22</sup>, y en la actualidad se considera que la capacidad de elaborar lisozima es un carácter frecuente de *S. aureus*, que presentan también otras especies de estafilococos coagulasa negativos e incluso algunos miembros del género *Micrococcus*<sup>21 22</sup>.

Las proteasas estafilocócicas constituyen un grupo heterogéneo de enzimas, entre las que se encuentran la gelatinasa, la caseinasa, la fibrinolisisina o estafiloquinasa y el factor Muller. De ellas, la fibrinolisisina sirve para clasificar en biotipos las cepas de *S. aureus*, mientras que la gelatinasa y la caseinasa, aunque de valor muy limitado<sup>4 6 30</sup>, se utilizan como índices de patogenicidad. Martley et al.<sup>23</sup>, han propuesto el empleo del tipo de actividad proteolítica en un medio conteniendo caseinato sódico para tipificar cepas de estafilococos coagulasa positivos, especialmente las que no son susceptibles a los bacteriófagos.

Los estafilococos producen también enzimas con actividad lipolítica, entre los que destaca el denominado factor yema de huevo, que es una lipasa que actúa sobre las lipoproteínas, asociada generalmente con las cepas de estafilococos coagulasa positivos<sup>12 19 26</sup>.

En este trabajo se ha investigado la capacidad de producir lisozima, gelatinasa, caseinasa y factor yema de huevo, así como de hidrolizar los Tweens 20, 40, 60 y 80, en una población de 71 cepas de estafilococos aisladas a partir de leche mamítica de oveja. Se han establecido, además, relaciones entre estas propiedades y la producción de coagulasa y de termonucleasa.

## MATERIAL Y METODOS

### *Cepas*

De las 71 cepas de estafilococos incluidas en este estudio, 59 correspondían a *S. aureus*, 1 a *S. simulans*, 5 a *S. epidermidis*, 1 a *S. haemolyticus* y 5 a no clasificadas. Todas ellas habían sido aisladas por nosotros a partir de muestras de leche obtenidas de ovejas con síntomas de mamitis.

### *Producción de lisozima*

Para detectar la producción de este enzima se empleó una técnica en placa descrita previamente por García y Moreno<sup>5</sup>. Las cepas se consideraban como positivas (+) si a las cuarenta y ocho horas de incubación a 37° C mostraban un área de lisis intensa, de más de 2 mm. desde el borde de la línea de crecimiento, como débilmente positivas (±) cuando el área de aclaramiento era inferior a 2 mm., y como negativas (—) cuando no presentaban ningún tipo de lisis.

### *Producción de gelatinasa*

La capacidad de licuar la gelatina se puso de manifiesto en Chapman-Stone Medium (Difco) siguiendo el método descrito por García y Moreno<sup>5</sup>. Se consideraban positivas (+) las cepas que mostraban un halo de aclaramiento, medido desde el borde de la línea de crecimiento, superior a 2 mm., débilmente positivas (±) las que

presentaban áreas inferiores a 2 mm. y negativas (—) cuando no presentaban aclaramiento.

### *Actividad caseinasa*

Esta prueba se llevó a cabo en el medio denominado Standard Methods Caseinate Agar en la forma recomendada por Martley et al.<sup>23</sup>. Después de la incubación de los cultivos a 30 y 37° C, durante cuarenta y ocho horas, las cepas fueron clasificadas en los grupos A-E descritos por Martley et al.<sup>24</sup>, teniendo en cuenta el aspecto de las zonas de proteolisis observables alrededor de las colonias.

### *Reacción en yema de huevo*

Para el estudio de esta propiedad, se utilizó el procedimiento descrito por García y Moreno<sup>5</sup>. Transcurrido el período de incubación, cuarenta y ocho horas a 37° C, las cepas se consideraban positivas tanto si únicamente aclaraban el medio como si tras el aclaramiento inicial presentaban opacidad y brillo superficial.

### *Hidrólisis de los Tweens*

Para la puesta en evidencia de la actividad lipolítica de las cepas estudiadas sobre los Tweens 20, 40, 60 y 80, se empleó el medio Blood Agar Base (BBL), al que se añadía 0,01 % de cloruro cálcico dihidratado y 1 % del Tween correspondiente. Las siembras se llevaban a cabo depositando un asa de un cultivo de dieciocho horas en caldo BHI (Difco) sobre el medio contenido en placas de Petri de fondo plano. La reacción positiva se manifestaba, después de incubar dieciocho horas a 37° C y mantener las placas otras veinticuatro horas a temperatura ambiente, por la aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento.

## RESULTADOS

Los resultados relativos a la producción de lisozima y de gelatinasa, así como el tipo de proteolisis en agar caseinato, se recogen en la tabla I. De las 71 cepas estudiadas, 64 producían lisozima, si bien 36 de ellas lo hacían de forma intensa y las 28 restantes débilmente. Se observó fuerte actividad gelatinasa en 53 cepas y débil en 14. Por lo que se refiere a los tipos de proteolisis en agar caseinato a 30° C, el tipo encontrado más frecuentemente fue el C (50 cepas), seguido del D (9 cepas), el A (7 cepas) y el E (5 cepas). La mayor frecuencia a 37° C correspondió al A (56 cepas), siendo mucho menor la aparición de los tipos C (12 cepas), D (1 cepa) y E (2 cepas).

La tabla II presenta los resultados referidos a las lipasas (factor yema de huevo e hidrólisis de los Tweens). Únicamente 35 cepas producían el factor yema de huevo, mientras que 68 hidrolizaban el Tween 20, 61 el Tween 40, 48 el Tween 60 y sólo 12 el Tween 80.

**TABLA I**  
Producción de lisozima y de gelatinasa, y tipo de proteólisis en agar caseinato

Especie	Prod. de lisozima			Prod. de gelatinasa			Tipo de proteólisis en agar caseinato									
	+	±	-	+	±	-	30° C*					37° C**				
							A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
<i>S. aureus</i>	35	24		46	13			49	8	2	49		9	1		
<i>S. simulans</i>	1				1								1			
<i>S. epidermidis</i>		2	3	5			5				5					
<i>S. haemolyticus</i>			1			1				1			1			
No clasificadas		2	3	2		3	2		1	2	2		1	1		
<b>TOTALES</b>	36	28	7	53	14	4	7	50	9	5	56		12	1		

\* Tipos observados tras un período de incubación de cuarenta y ocho horas a 30° C.

\*\* Tipos observados tras un período de incubación de cuarenta y ocho horas a 37° C.

Los datos referentes a las cepas agrupadas según las especies a las que fueron adscritas se muestran también en las tablas I y II. Todas las cepas clasificadas como *S. aureus* producían lisozima y gelatinasa, aunque con intensidad diversa. En agar caseinato a 30° C, 49 de las cepas incluidas en esta especie mostraron el tipo C de proteólisis, 8 el D y 2 el E, mientras que a 37° C, 49 pertenecían al tipo A, 9 al C y 1 al E. Sólo 31 de las 59 cepas de *S. aureus* eran yema de huevo positivas, 57 hidrolizaban el Tween 20, 51 el Tween 40, 40 el Tween 60 y 6 el Tween 80. La única cepa clasificada como *S. simulans* fue lisozima y gelatinasa positiva, mostraba a 30 y 37° C los tipos D y C de proteólisis en agar caseinato, era incapaz de actuar sobre la yema de huevo e hidrolizaba los cuatro Tweens estudiados. Las cinco cepas incluidas en la especie *S. epidermidis* licuaban la gelatina y dos producían lisozima, todas ellas presentaban el tipo A de crecimiento en agar caseinato tanto a 30 como a 37° C, tres producían el factor yema de huevo, cinco hidrolizaban el Tween 20, cuatro el Tween 40, una el Tween 60 y tres el Tween 80. La cepa de *S. haemolyticus* era gelatinasa, lisozima y yema de huevo negativa, carecía de actividad caseinasa a 30° C, mostraba el tipo C a 37° C e hidrolizaba los Tweens 20, 40 y 60, pero no el 80. Finalmente, de las cinco cepas no clasificadas, dos producían gelatinasa y lisozima. En agar caseinato a 30 y 37° C, 2 eran del tipo A, 1 del C y 1 del E. La cepa restante carecía de actividad caseinasa a 30° C y era del tipo D a 37° C. Sólo 1 de estas 5 cepas no clasificadas actuaba sobre la yema de huevo, todas ellas hidrolizaban el Tween 60, 4 los Tween 20 y 40 y sólo 2 el Tween 80.

La relación existente entre estas propiedades y la capacidad de producir coagulasa se presenta en la tabla III.

#### DISCUSION

El escaso número de publicaciones existentes sobre estafilococos de origen ovino y el hecho de que muy pocos autores estudien las propiedades de las que se da cuenta

**Tabla II**  
Producción de lipasas: factor yema de huevo e hidrólisis de los Tweens 20, 40, 60 y 80

Especie	Producción del factor yema de huevo		Hidrólisis de los Tweens							
	+	-	T20		T40		T60		T80	
			+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i>	31	28	57	2	51	8	40	19	6	53
<i>S. simulans</i>		1	1		1		1		1	
<i>S. epidermidis</i>	3	2	5		4	1	1	4	3	2
<i>S. haemolyticus</i>		1	1		1		1		1	
No clasificadas	1	4	4	1	4	1	5		2	3
<b>TOTALES</b>	35	36	68	3	61	10	48	23	12	59

**TABLA III**  
Relación entre la producción de coagulasa y la producción de lisozima, enzimas proteolíticos y lipasas

Producción de coagulasa	Producción de lisozima			Producción de gelatinasa			Tipo de proteólisis en agar caseinato				Factor yema de huevo		Hidrólisis de los Tweens (cepas +)						
	+	±	-	+	±	-	30°				37°								
							A	C	D	E	A	C	D	E	+	-	20	40	60
Cepas coagulasa positivas: 60	35	25		46	13	1	49	8	3	49	9	1	1	31	29	58	52	41	6
Cepas coagulasa negativas: 11	1	4	6	7	1	3	7	1	1	2	7	3	1	4	7	10	9	7	6

en este trabajo limitan necesariamente el estudio comparativo de nuestros resultados y obliga a introducir en esta discusión datos referidos a cepas de otros orígenes.

La capacidad de producir lisozima ha sido considerada por algunos autores como exclusiva de las cepas de *S. aureus*<sup>10</sup>. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores, como Lachica et al.<sup>22</sup>, quienes señalan que esta propiedad es compartida por cepas de estafilococos coagulasa negativas. Como puede observarse en la tabla I, producían este enzima, además de las 59 cepas de *S. aureus*, la clasificada como *S. simulans* y 2 de las 5 adscritas a *S. epidermidis*. El número de trabajos en los que se investiga la actividad lisozima de cepas de *S. aureus* es muy numeroso, siendo mucho menor el de los referidos a las especies coagulasa negativas. Hajek y Marsalek<sup>15</sup> encuentran que el 100% de las 84 cepas de *S. aureus* aisladas de fosas nasales de ovejas sanas y de leche mamática de oveja producían lisozima, actividad que según Hajek<sup>11</sup> mostraban también las 44 cepas de esta especie aisladas por él de quesos elaborados con leche de oveja. La capacidad de *S. simulans* para producir esta enzima ha sido previamente descrita en cepas de origen humano por Kloos y Schleifer<sup>21</sup> y

Gramoli y Wilkinson<sup>9</sup>. Tampoco es sorprendente el hecho de que cepas de *S. epidermidis* muestren actividad bacteriolítica<sup>6 17 21 22</sup>.

El que la actividad gelatinasa no es un carácter específico de *S. aureus* ha sido ya señalado por diversos investigadores<sup>25 29</sup>. En este estudio, no sólo hidrolizaban la gelatina las 59 cepas de *S. aureus*, sino también la clasificada como *S. simulans* y las 5 adscritas a *S. epidermidis* (tabla I). La producción de gelatinasa parece una propiedad común de las cepas de *S. aureus* de origen ovino<sup>11 14</sup> y de otros orígenes, no es extraña en las de *S. simulans* de origen animal<sup>2</sup> y aparece frecuentemente en las de *S. epidermidis* de origen humano y animal<sup>2 6 7</sup>.

La hidrólisis de la caseína es una prueba utilizada con relativa frecuencia en la caracterización de los miembros del género *Staphylococcus*<sup>1 2 8</sup>. Además, Martley et al.<sup>23</sup>, proponen emplear el tipo de proteólisis en agar caseinato para la tipificación de cepas de estafilococos coagulasa positivos. Los resultados de la tabla I indican que la mayoría de nuestras cepas de *S. aureus* producían enzimas capaces de hidrolizar la caseína, pero que esta propiedad era mostrada también por los miembros de las especies coagulasa negativas. Por lo que se refiere al tipo de proteólisis en agar caseinato, resulta muy difícil la interpretación de los resultados obtenidos. A 30° C, la mayoría de las cepas de *S. aureus* (49) presentaban el tipo C, mientras que a 37° C, idéntico número de cepas de esta especie eran del tipo A. También eran del tipo A, a ambas temperaturas, las cinco cepas de *S. epidermidis*. En interpretación de Martley et al.<sup>24</sup>, los diferentes tipos de proteólisis mostrados por las cepas de *S. aureus* al ser incubadas a 30 y a 37° C indican que, al aumentar la temperatura, se incrementa no sólo la actividad caseinasa de las cepas, sino también la de las proteasas que actúan sobre el paracaseinato cálcico precipitado. En las otras especies, estos efectos no se producirían. Parece interesante señalar, por otra parte, la ausencia total de cepas del tipo B, que fue el más frecuentemente hallado por Martley et al.<sup>23</sup>, al estudiar cepas de *S. aureus* de origen humano y bovino.

La producción del factor yema de huevo es una propiedad generalmente asociada con las cepas de estafilococos coagulasa positivos<sup>18 26 28</sup>. Sin embargo, los resultados por nosotros obtenidos indican que en cepas de origen ovino esta correlación es muy escasa. Como puede observarse en la tabla II, el 47,3% de las cepas de *S. aureus* eran yema de huevo negativas, mientras que tres de las cinco cepas clasificadas como *S. epidermidis* presentaban esta propiedad. En este sentido, Hajek y Marsalek<sup>15</sup> señalan que únicamente el 6,7% de 84 cepas de *S. aureus* aisladas de ovejas mostraban fuerte actividad lipolítica en un medio conteniendo yema de huevo y que otro 74,7% eran muy débilmente positivas. De las 44 cepas de *S. aureus* aisladas por Hajek<sup>11</sup> de quesos elaborados con leche de oveja, el 70,4% presentaba este carácter, pero sólo un 22,7% mostraba una reacción intensa. Aunque no ha sido posible obtener datos relativos a la actividad lipolítica sobre yema de huevo de cepas de *S. epidermidis* de origen ovino, parece que esta propiedad es presentada con bastante frecuencia por miembros de esta especie de origen animal<sup>2 6</sup>. Los resultados negativos obtenidos con las cepas clasificadas como *S. simulans* y *S. haemolyticus*

coinciden con los encontrados por Devriese<sup>2</sup>, quien estudia 14 cepas de la primera especie y 71 de la segunda, aisladas de leche de vaca, encontrando que sólo dos cepas de cada grupo eran positivas.

Baird-Parker<sup>1</sup> propuso la hidrólisis de los Tweens 20, 40, 60 y 80, como una prueba útil para diferenciar las cepas de *S. aureus* y los cinco subgrupos de *S. epidermidis* por él establecidos. De los resultados por nosotros obtenidos, cabe destacar la similitud de los porcentajes de cepas coagulasa positivas y negativas que hidrolizaban los Tweens 20, 40 y 60. De las cepas coagulasa positivas, el 96,6% hidrolizaba el Tween 20, el 86,6% el Tween 40 y el 68,3% el Tween 60, siendo los porcentajes de positividad de las cepas coagulasa negativas frente a estos Tweens del 90, 81,8 y 63,6%, respectivamente. Por el contrario, mientras que un 54,5% de nuestras cepas coagulasa negativas mostraba actividad lipolítica sobre el Tween 80, sólo un 10% de las coagulasas positivas poseería este carácter. Parece, pues, existir una relación inversa entre la capacidad de coagular el plasma y la hidrólisis del Tween 80. Hajek<sup>11</sup> encuentra también que sólo el 9,5% de 84 cepas de *S. aureus* de origen ovino hidrolizaban el Tween 80. Asimismo, en un estudio de 544 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes especies animales, Devriese y Oeding<sup>3</sup> señalan que sólo el 18% de las procedentes de ganado vacuno hidrolizaban este Tween, mientras que en las aisladas de otros animales esta cifra era mucho mayor (entre el 69 y el 100%). En este mismo trabajo se da el porcentaje del 78% de cepas de *S. aureus* de origen humano Tween 80 positivas. Este porcentaje es del 58% en un estudio de Piotrowska y Jofczyk<sup>27</sup> de 310 cepas de *S. aureus* también de origen humano. Aunque los datos aquí expuestos son limitados, parece que las cepas de *S. aureus* aisladas de oveja y vaca, incluidas en el biotipo C de Hajek y Marsalek<sup>15</sup>, muestran mucha menor actividad hidrolítica frente al Tween 80 que las de otros orígenes.

La relación existente entre las propiedades estudiadas y la producción de coagulasa se presenta en la tabla III. Todas las cepas coagulasa positivas producían lisozima y, con una excepción, gelatinasa, pero ambos enzimas eran elaborados también por un número considerable de cepas coagulasa negativas. La actividad caseinasa y la hidrólisis de los Tweens 20, 40 y 60 fue, asimismo, mostrada por ambos grupos de cepas en proporciones semejantes. La producción del factor yema de huevo há sido negativa en 29 de las 60 cepas coagulasa positivas, siendo, sin embargo, observada en cuatro de las coagulasas negativas. Finalmente, hemos de señalar que la hidrólisis del Tween 80 aparece más frecuentemente entre las cepas coagulasa negativas que entre las positivas.

## RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al estudiar la producción de lisozima y de ciertas proteasas y lipasas por parte de 71 cepas de estafilococos aisladas de leche mamática de oveja.

Las 59 cepas de *S. aureus* y 5 de las cepas adscritas a especies coagulasa negativas o no clasificadas producían lisozima. Todas las cepas de *S. aureus* producían además gelatinasa, presentando también esta propiedad 7 cepas coagulasa negativas.

Por lo que se refiere a la actividad caseinasa, la mayor parte de las cepas coagulasa positivas y negativas poseían este carácter. A 30° C los tipos de proteólisis más frecuentes en agar caseinato eran el C para las coagulasa positivas y el A para las negativas. Sin embargo, a 37° C, predominaba en ambos grupos el tipo A.

La producción del factor yema de huevo la presentaban 4 cepas coagulasa negativas y únicamente 31 de las clasificadas como *S. aureus*. Los porcentajes de cepas coagulasa positivas y negativas con actividad hidrolítica sobre los Tweens, 20, 40 y 60 eran muy similares. Se ha observado, sin embargo, una relación inversa entre la capacidad de hidrolizar el Tween 80 y la producción de coagulasa.

### PRODUCTION OF LISOZYME, PROTEASES AND LIPASES BY STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM OVINE MASTITIC MILK

#### SUMMARY

A total of 71 strains of staphylococci isolated from ovine mastitic milk were tested for lysozyme production, gelatin and casein hydrolysis, egg yolk factor production and lipase activity. Fifty nine of these cultures were previously classed as *S. aureus*, 1 as *S. simulans*, 5 as *S. epidermidis*, 1 as *S. haemolyticus* and 5 could not be classified as any accepted or newly proposed species.

All of the *S. aureus* strains produced lysozyme and gelatinase, but these properties were also shared by coagulase negative cultures. The production of caseinase was demonstrated in almost all of the coagulase positive and coagulase negative strains. At 30° C, a large majority of the *S. aureus* strains were assigned to group C, but at 37° C, the precipitation zones changed to type A. *S. epidermidis* produced similar zones (type A) at both temperatures.

The egg yolk factor was produced by only 31 of the 59 strains classed as *S. aureus*. In addition, 4 cultures belonging to coagulase negative species gave positive reaction. Although similar percentages of coagulase positive and coagulase negative strains split Tween 20, 40 and 60, the lack of activity on Tween 80 was more often associated with *S. aureus* strains.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) BAIRD-PARKER, A. C. (1965).—Staphylococci and their classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **128**, 4-25.
- 2) DEVRIESE, L. A. (1979).—Identification of clumping factor negative staphylococci isolated from cows'udder. *Res. Vet. Sci.*, **27**, 313-320.

- 3) DEVRIESE, L. A. y OEDING, P. (1976).—Characteristics of *S. aureus* strains isolated from different animal species. *Res. Vet. Sci.*, **21**, 294-291.
- 4) ELEK, S. D. (1959).—Citado por ABRANSON, C. (1972).—Staphylococcal enzymes. En *The Staphylococci*, J. O. COHEN (editor), John Wiley, N. Y., 187-248.
- 5) GARCÍA, M. L. y MORENO, B. (1978).—Algunas propiedades enzimáticas en estafilococos aislados de muestras de leche procedentes de casos de mastitis y su relación con la producción de coagulasa, de termonucleasa y sensibilidad a la lisostafina. *An. Fac. Vet. León*, **XXIV**, 183-193.
- 6) GARCÍA, M. L.; MORENO, B. y BERGDOLL, M. S. (1980).—Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 548-553.
- 7) GEMMELL, C. G.; THELESTAM, M. y WADSTROM, T. (1976).—Toxinogenicity of coagulase negative staphylococci. En *Staphylococci and Staphylococcal Diseases*, J. JELJASZEWICZ (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 133-136.
- 8) GIBBS, T. A.; PATTERSON, J. T. y HARVEY, J. (1978).—Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *S. aureus* strains isolated from poultry. *J. Appl. Bacteriol.*, **44**, 57-74.
- 9) GRAMOLI, J. L. y WILKINSON, B. J. (1978).—Characterization and identification of coagulase negative, heat-stable deoxyribonuclease-positive staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, **105**, 275-285.
- 10) GROSSGEBAUER, K.; SCHMIDT, B. y LANGMARCK, H. (1968).—Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci. *Appl. Microbiol.*, **16**, 1745-1747.
- 11) HAJEK, V. (1978).—Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 264-268.
- 12) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1969).—A study of staphylococci of bovine origin: *S. aureus* var. *bovis*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, **209**, 154-160.
- 13) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1971).—The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, **217**, 176-182.
- 14) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1976).—Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. En *Staphylococci and Staphylococcal Diseases*, J. JELJASZEWICZ (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 11-21.
- 15) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1976a).—Staphylococci outside the hospital. *S. aureus* in sheep. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B*, **161**, 455-461.
- 16) HAWIGER, J. (1968).—Staphylococcal lysozyme. I. Occurrence of lysozyme in comparison with other staphylococcal factors. *Med. Doswiadczalna Mikrobiol.*, **19**, 313-320.
- 17) HECZKO, P. B. (1973).—The taxonomy of *S. epidermidis*. En *Staphylococci and Staphylococcal Infections*, J. JELJASZEWICZ (editor), Contributions to Microbiology and Immunology, vol. I, Karger, Basel, 41-46.
- 18) JAY, J. M. (1966).—Production of lysozyme by staphylococci and its correlation with three other extracellular substances. *J. Bacteriol.*, **91**, 1804-1810.
- 19) JAY, J. M. (1970).—Effect of borate on the growth of coagulase positive and coagulase negative staphylococci. *Infect. Imm.*, **1**, 78-79.
- 20) KASHIBA, S.; NUZU, K.; TANAKA, S.; NOZU, H. y AMANO, T. (1959).—Lysozyme as index of pathogenic staphylococci. *Biken's J.*, **2**, 50-55.
- 21) KLOOS, W. E. y SCHLEIFER, K. H. (1975).—Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* and *S. simulans*. *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, **25**, 62-79.
- 22) LACHICA, R. V. F.; HOEPRIKH, P. O. y GENIGEORGIS, C. (1971).—Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *S. aureus* and other catalase positive cocci. *Appl. Microbiol.*, **21**, 823-826.
- 23) MARTLEY, F. G.; JARVIS, A. W.; BACON, D. F. y LAWRENCE, R. C. (1970).—Typing of coagulase positive staphylococci by proteolytic activity on buffered caseinate agar, with special reference to bacteriophage nontypable strains. *Infect. Immun.*, **2**, 439-442.
- 24) MARTLEY, F. G.; JAYASHANKAR, S. R. y LAWRENCE, R. C. (1970a).—An improved agar medium for the detection of proteolytic organisms in total bacterial counts. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 363-370.
- 25) NISKANEN, A. y KOIRANEN, L. (1977).—Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *J. Food Protection*, **40**, 543-548.
- 26) OLSON, J. C.; CASMAN, E. P.; BAER, E. F. y STONE, J. E. (1970).—Enterotoxigenicity of *S. aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.*, **20**, 605-607.

- 27) PIOTROWSKA, E. y JOZEFczyk, Z. (1976).—Toxin-forming potency of clinical strains of *S. aureus*. En *Staphylococcus and Staphylococcal Diseases*, J. JEJASZEWICZ (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 577-582.
- 28) REID, W. B. y WILSON, J. B. (1959).—A study of the staphylococci associated with the bovine udders. *Am. J. Vet. Res.*, **20**, 825-831.
- 29) SAINT GEORGE, C.; RUSSELL, K. B. y WILSON, J. B. (1962).—Characteristics of staphylococci from bovine milk. *J. Infect. Dis.*, **110**, 75-79.
- 30) ZEMELMAN, R. y LONGERI, L. (1965).—Characterization of staphylococci isolated from raw milk. *Appl. Microbiol.*, **13**, 167-170.

**REGULACION EN BACTERIAS LACTICAS  
DE LA SINTESIS DE LOS ENZIMAS DEL CATABOLISMO  
DEL DIACETILO POR REDUCCION: (I) LACTOBACILLUS  
CASEI Y L. PLANTARUM**

Por: S. Monroy  
J. Burgos  
R. Martín Sarmiento

**INTRODUCCION**

El diacetilo juega un importante papel, a veces favorable y otras desfavorable, en el aroma de gran número de productos alimenticios, especialmente en los derivados lácteos. Se sintetiza por reacciones de condensación del acetaldehído activado<sup>9 14 17</sup> y se consume, en los sistemas biológicos, principalmente vía su reducción a acetoína y la de ésta a butilenglicol, en dos reacciones (diacetilo reductasa y butilenglicol deshidrogenasa) catalizadas por enzimas dependientes de los piridín nucleótidos<sup>1 3 5 16 18</sup>.

Para regular su metabolismo, la industria alimentaria ha venido recurriendo a medidas con frecuencia insuficientemente eficaces y no siempre aplicables, como el control del pH, la temperatura y el grado de aireación del medio, una adecuada selección de los microorganismos utilizados como starters y, cuando se pretende potenciar su producción, a la adición de sustancias precursoras del mismo. La observación de que el citrato y el piruvato inducen la biosíntesis de algunas de las deshidrogenasas del catabolismo del diacetilo<sup>2 3 10 15</sup> parece abrir una nueva posibilidad de regular el acúmulo de este metabolito en los sistemas biológicos.

Los autores han intentado explorar esta posibilidad en diversas bacterias acidolácticas, los gérmenes más frecuentemente implicados en la producción de diacetilo en los alimentos, utilizando como efectores, además de los ya citados, el propio diacetilo y sus productos de reducción. En este artículo se da cuenta de los estudios efectuados con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*.

**MATERIAL Y METODOS**

La acetoína (BDH) fue purificada por lavado con éter etílico<sup>20</sup> y el diacetilo (BDH) por destilación fraccionada, recogiendo la fracción que destila a 88-89° C a 760 mm Hg.