

Microbiología Española



Vol. II

N.º 1

MCMXLIX

PRECIO: 22 PESETAS

SUMARIO

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

	<u>Páginas</u>
<i>Algunos métodos de estudio de la flora intestinal, humana y animal, y algunas consideraciones sobre dicha flora,</i> por J. M. Rosell	3
<i>Influencia de la Penicilina en la acción de la Ribonucleasa,</i> por B. Regueiro Varela	43
<i>Las bacterias simbióticas del nitrógeno bajo el Microscopio Electrónico,</i> por G. Palacios-de-Borao, S. J.	51

INFORMACIÓN.

Visita del Profesor Hauduroy	57
V Congreso Internacional de Microbiología	58
Actas de la Sociedad	60

BIBLIOGRAFÍA.

Indice de artículos de Revistas	63
---------------------------------------	----

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON DÉSIRE L'ÉCHANGE
MAN BITTET DEN WECHSEL
WE BEG THE CHANGE

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual: (4 números) 80 pesetas.

ALGUNOS METODOS DE ESTUDIO DE LA FLORA INTESTINAL, HUMANA Y ANIMAL Y ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE DICHA FLORA

Conferencia pronunciada en la Sociedad de Microbiólogos Españoles

por J. M. Rosell.

Exponemos resumidamente en esta conferencia algunos métodos de estudio e investigación microbiológica, de un gran valor práctico, para el mejor conocimiento de determinados grupos de microorganismos, siendo algunos de estos métodos los que la microbiología industrial y aplicada emplean como práctica corriente, y que son poco conocidos o poco empleados en la microbiología médica, a pesar del mucho fruto que de ellos puede obtenerse en un gran número de averiguaciones. Más de veinte años de trabajo en microbiología aplicada o industrial, lactológica, agrícola y de fermentaciones, aunque casi divorciado de la medicina, me ha enseñado lo mucho que de los campos de microbiología no médica, mucho más extensos especialmente que nuestra microbiología patogénica y terapéutica, podría aprovecharse para estas ramas médicas, y en los métodos que aquí exponemos, que han salido en gran parte de los campos citados para ser aplicados en la especialidad del aparato digestivo, podrá verse un ejemplo de lo que decimos.

Exponemos estos métodos con miras a su aplicación en la microbiología intestinal, en cuyo campo empezamos nosotros a hacer amplio uso de ellos, en colaboración con el gran micrólogo W. Henneberg, Director del Instituto de Fermentaciones de Berlín y luego del Instituto de Bacteriología Lactológica de Kiel en los años 1925 a 27, y otros en la sección de Investigación de las Facultades de Medicina Comparada y Agronomía de Oka, Universidad de Montreal, (Québec) Canadá, que en los años 1928 a 1940 estaban bajo nuestro cargo, y en otros como miembro del Consejo Nacional de Investigación de Canadá en los años 1930-35.

No nos ocuparemos en esta exposición de las bacterias oficialmente consideradas como patógenas o las que accidentalmente actúan en el intestino o lo atraviesan, ni del grupo de las bacterias intestinales más ampliamente estudiadas y con más detalles descritas en sus muy numerosas variedades, del género

coli o escherichia. (En el «Tratado del Laboratorio Lactológico», Editorial Labor, próximo a aparecer, exponemos, entre otros, un amplio estudio de estas bacterias del grupo coli, como de las que van relacionadas con la Lactología.)

En esta reseña nos referimos exclusivamente a los métodos de estudio de algunos de los grupos de microorganismos intestinales que pudiéramos llamar simbióticos u obligados, con funciones más o menos conocidas.

En un trabajo reciente: «Funciones conocidas de la flora intestinal simbiótica normal, en especial de sus funciones vitamínicas», comunicación presentada en el V Congreso Nacional de Patología Digestiva y Nutrición, de Zaragoza, 1948, exponíamos una síntesis de lo que hasta la fecha se da como más averiguado en éste, a pesar de lo mucho investigado y publicado, aun en muchos puntos nebuloso campo bacteriológico.

CONSIDERACIONES PRELIMINARES

Antes de entrar en la materia, creemos útiles algunas cortas consideraciones generales sobre microbiología intestinal y coprológica.

A pesar de lo mucho que se ha estudiado y publicado sobre flora intestinal, falta probablemente, como en la mayoría de las ramas de la biología, mucho más por conocer y averiguar que lo que se conoce o se cree conocer.

A) Para un estudio que pudiera llamarse fisiológico o funcional de las bacterias intestinales, es en muchos casos inadecuado el estudio de las bacterias en cultivo puro, como ocurre en muchos otros ramos de la bacteriología aplicada, por ejemplo en la microbiología lactológica industrial, donde la acción transformadora de ciertos microorganismos, por ejemplo, de los penicilios y sus penicilinas, conocidas desde antiguo, en las transformaciones de las proteínas, lactosa, grasa, en ciertos quesos (Camembert, Roquefort, etc.) , hoy casi exactamente conocidas, sólo pueden obtenerse, observarse y estudiarse en asociación o trabajo simbiótico o codependiente de otras bacterias: cocos, bacterias lácticas, ácidoproteolíticas, levaduras, tómulas, oidios, penicilios, etc.

B) Aunque el número de familias, tribus, géneros y especies o variedades de microorganismos que se han encontrado o creído encontrar y descrito en el canal digestivo humano y animal, es muy considerable (al final de este trabajo intentamos dar una lista de las varias docenas de microorganismos estudiados en el tubo digestivo), las especies o grupos que parecen ser los funcionalmente obligados, pueden considerarse relativamente limitados, variando, como se sabe, mucho según el tipo de alimentación y estado funcional del estómago, vías biliares e intestino. Variando el tipo de alimentación, se pueden hasta un cierto punto enriquecer segmentos intestinales y las mismas heces, con determinados grupos de bacterias u hongos, y de este hecho se hace apli-

cación para estudiar la posibilidad de implantación, que casi nunca es permanente, de grupos de determinados microorganismos en el intestino.

Que la alteración de la función digestiva va acompañada de variación de la flora normal y viceversa, es un hecho ampliamente establecido, y la biografía a este respecto es abundante. Muchas alteraciones digestivas y del organismo en conjunto, han podido ser atribuidas a alteraciones de la que puede llamarse flora normal o simbiótica, o fisiológica, u obligada, y la medicina del futuro conseguirá seguramente muchas y más seguras observaciones a este respecto, y tanto más cuanto mejor sea estudiada la flora intestinal.

C) Las bacterias que se encuentran en las heces o reservorio rectal, especialmente en las que pudieran llamarse normales y que en un 90 a 99 por 100 en el hombre se encuentran muertas y en algunos animales, en especial ovejas, cabras, conejos, casi totalmente disgregadas o vacías, no pueden dar más que pobrísima e insuficiente o errónea idea sobre la flora en las partes altas del colon y apenas ninguna de la flora intestinal del íleon, yeyuno, duodeno y estómago.

D) La flora normal de estas secciones intestinales altas, de todo el intestino hasta el ciego, como la del estómago, sólo puede ser estudiada en el hombre, como las sondas bacteriológicas, especialmente las cerradas como las empleadas por Ganther, Van der Reis, Shembra y otros muchos investigadores desde 1920 a 21, y por nosotros en trabajos con Van der Reis en la Clínica Médica de la Universidad de Greifswald en 1925 y 26, y en nuestras actividades en Canadá de 1928 a 32 (1). En los animales puede hacerse un estudio de la flora de las diversas secciones del tramo digestivo con vivisecciones apropiadas.

E) Al querer (con muchas probabilidades y posibilidades de juicios erróneos) estudiar la flora intestinal sobre la base de las materias fecales de las deposiciones, debe tenerse muy en cuenta que las heces no son un conjunto homogéneo, sino un mosaico de partículas residuales de la alimentación y de detritus celulares o descamaciones de la mucosa, jabones y otros cuerpos resultantes de reacciones entre bilis y otros jugos digestivos y residuos de la alimentación. Puede decirse, casi matemáticamente, que cada partícula de este heterogéneo complejo de las heces—complejo fácil de disociar al diluirlo en agua sobre un plato de fondo blanco y oscuro, o pasando por un colador la masa disuelta—, que cada partícula de este complejo, es una colonia o colmena de microorganismos diferentes, que a veces parecen estar en cultivo puro. Residuos de patata, habichuelas, garbanzos, guisantes, frutas, pieles de legumbres, restos de hojas de ensalada, coles, son generalmente nidos de los microorganismos que segregan celulosa y digieren pectina y celulosa; por ejemplo, *Clostridium pectinovarum*, *Bact. Omelianski*, *Bacil. metagines*, *Bacil. Ellembergii*, *Bact. Zuntzii*. En los restos de patatas y tubérculos, especialmente los

mal cocidos, los granulobacterias, clostridios o sacarobutíricos y otros microorganismos yodófilos.

En restos de carnes y tejido conjuntivo, se encuentran las bacterias del grupo proteus, putríficus, megaterium, coli, eminentemente ubicuitario, micoides, etc. En residuos vegetales y especialmente en consumo abundante de leche o quesos se encuentran las bacterias lácticas, y al existir fermentaciones ácidas, pueden aislarse de estos residuos vegetales fácilmente, levaduras, tóru-las, monilias, etc. Estas colonias de los mencionados y otros grupos de microorganismos varían de aspecto y caracteres según la mayor o menor cantidad de residuos azucarados y de proteínas y según el pH del medio, y modifican su forma de actividad. Por ejemplo, las bacterias que digieren la pectina y celulosa, no producen metano u otros productos gaseosos o producen menos, si a la vez están presentes abundantes bacterias lácticas. Un ejemplo conocido de ello es que las flatulencias o meteorismo producidas por abundante ingestión de habichuelas o legumbres de otras clases no se presentan, o son menos, si simultáneamente se ingiere «yoghourt» u otras formas de cultivos lácticos en suficiente cantidad o lactosa que facilite el desarrollo de las bacterias lácticas.

Si se imita con cultivos artificiales estos naturales de canal digestivo que acabamos de describir, preparando adecuados medios que permiten hasta un cierto grado producir artificialmente y en forma cada vez más en cultivo puro o simbiosis de beneficio mutuo estos grupos funcionales de la flora intestinal, puede obtenerse cultivos simbióticos parecidos a los del canal digestivo.

Entre estas bacterias digestoras de la pectina y celulosa, sustancias que no pueden atacar los jugos digestivos, como igualmente los restos de féculas y de frutos sin digerir, existen una armonía y sucesión de trabajo, que se realiza en el ciego y resto del colon, hasta que la desecación del bolo fecal impide casi toda actividad microbiana, que la naturaleza no parece desear en el reservorio fecal rectal, donde la concentración de sustancias bactericidas termina con la muerte casi total y autólisis de las bacterias en el cementerio rectal de las mismas.

La falta de estas bacterias pectinovorras y celulósicas, como las lácticas, o su función imposibilitada, constituiría por sí un importante factor patogénico intestinal.

Es sabido, además, que estas bacterias, como el coli y las butílicas, son importantes productoras de vitaminas. La disolución de estos restos celulósicos, especialmente de leguminosas, que llegan sin digerir a las partes bajas del íleon y caldera de fermentaciones del ciego, dejan libre la legumina y otros residuos proteicos, que en estos segmentos digestivos no pueden ser atacados por las triptasas normales y lo son por las bacterias de hidrólisis putrefaciente (proteus, coli, putríficus, etc.) y dan origen a los gases sulfurados de la cistina y otros aminoácidos azufrados. Pueden igual y simultáneamente formarse

fermentaciones butíricas, butílicas, acéticas, acetónicas (bacil. macerans), propiónicas, alcohólicas, etc.

OBSERVACIONES SOBRE BACTERIAS LACTICAS

Las bacterias lácticas las consideraríamos nosotros *la aristocracia*, en cuanto a calidad, utilidad y ubicuidad de servicios, de todas las bacterias de este planeta. Se han escrito libros sobre ellas—principalmente por la bacteriología no médica—, pero se podría escribir aún más de lo que sobre ellas se lleva escrito y estudiado. Creemos que al igual que en la mayor parte de microorganismos, especialmente los que no pertenecen a reducidísimo grupo de los considerados patogénicos, no se ha hecho más que empezar a conocerlos medianamente en algunas de sus aplicaciones o actividades utilitarias más salientes: fermentaciones acética, alcohólica, láctica, butílica, acetónica, celulósica, pectínica, panaria, fijación de nitrógeno, actividades en el ciclo de circulación de la materia, formación de enzimas, vitaminas, etc., etc.

El mostrar las bacterias lácticas, que son además quizá las más beneficiosas desde el punto de vista higiénico o médico, y ser (creemos nosotros con la mayoría de opiniones) los habitantes obligados o fisiológicos más útiles o necesarios y tal vez los más numerosos de la flora intestinal funcional o alta, especialmente en la infancia, junto con las celulósicas y pectinolíticas, y las del grupo coli en épocas posteriores, han hecho despertar el interés especial por ellas, como lo demuestra el hecho que son las únicas y primeras que lo que se llama Naturaleza y que nosotros llamamos Providencia o Sabiduría del que creó la Naturaleza, hace aparecer en el organismo del recién nacido, que encuentra ya que le aguardan en el canal vaginal al salir del mundo uterino estéril; el mostrar, como decimos, las bacterias lácticas estas cualidades privilegiadas y muchas otras que precisarían un gran volumen para ser descritas, ha contribuido a que se les muestre un interés (especialmente por la bacteriología aplicada que es la que más se ha ocupado de ellas) como no se ha tenido para otros grupos de bacterias.

El no haber sido bien conocidas las bacterias lácticas intestinales por la bacteriología médica, es debido a que sólo desde hace poco ha empezado ésta a conocer y utilizar los mejores métodos de su estudio. Los métodos para aislar y estudiar las pocas bacterias lácticas que pueden sobrevivir a la bactericida masa fecal normal, son bastante diferentes de los usuales en la bacteriología humana. Las bacterias lácticas intestinales tienen su función y habitación principal en las partes altas del intestino: duodeno, hasta el final del íleon, donde se encuentran los glúcidos, tipos de proteínas y pH ácido más favorable para ellas. Desde el ciego tropiezan ya con las celulósicas pectínicas, clostridios, amilolíticas, coli-escherichias, las putríficas, etc.

Sobre el origen de las bacterias lácticas que llegan al intestino, puede decirse que los alimentos vegetales crudos y las frutas son sus fuentes principales. Las que se han habituado más a tolerar los ácidos: *estrep. bovis*, *faecius*, *thermobact. bulgaricus*, *lactis*, *yoghourtii*, *helveticum*, *casei*, se encuentran ya abundantes en el estómago de los rumiantes, cuya bacteriología intestinal muy bien estudiada, mejor que la humana, tiene mucho parecido con ésta, especialmente bajo alimentación vegetal o láctea.

La alimentación láctea y los quesos frescos, yoghourts, kefir, etc., de buena calidad (pues los corrientes, malos, son esponjas de caseína y coli) son otra de las ricas fuentes de bacterias lácticas que, a la vez que las aportan, les acompañan sus alimentos preferidos, especialmente si junto a las proteínas de leche, más o menos hidrolizadas, llevan aún abundante lactosa o se les sobreañade.

Los muchísimos análisis publicados sobre el estudio de la flora intestinal en el hombre y en los animales, practicados con los métodos que describimos a continuación, dan un promedio de 40 a 60 por 100 de bacterias lácticas, incluso en la masa fecal en el adulto normal, 90 a 100 por 100 en las zonas altas del intestino, cifras que aumentan en relación a la cantidad de elementos vegetales lácteos y azucarados, y en especial de la lactosa que se ingiera varios días seguidos y del estado normal del canal digestivo, y que disminuyen en proporción a la disminución de estos alimentos mencionados, vegetales, frutas, leche, quesos, azúcares y lactosa especialmente, y al aumento o predominio de la alimentación cárnea y perturbaciones del canal digestivo.

En el infante, sabido es que en tanto está alimentado con el pecho materno y en condiciones normales, la flora predominante hasta 99 por 100, es la de las bacterias acidófilas y *bifidus*, que dan, por así decir, el índice de salubridad del infante.

Las bacterias lácticas se encuentran en todas las zonas terráneas, donde hay vegetales, leche y mamíferos (nosotros los hemos aislado de leche de ballena y reno, que en varios períodos se nos proporcionaba para análisis, obtenida por expediciones árticas científicas de la Universidad de Montreal). Esta ubicuidad y variación de ambiente: vegetales de todas las zonas, especialmente residuos en fermentación láctica, lacticinios de centenares de tipos mantenidos sistemáticamente a temperaturas desde 2° C (mantecas, mantecados, quesos tipos Bel-Paese y Roquefort) hasta las temperaturas corrientes de 65 a 75 de los pasteurizadores y su vida en el interior y exterior de los animales y hombres, hacen comprender fácilmente el por qué de las muchas variedades o especies (aunque nadie sabe aún lo que es una especie) más fenotípicas que genotípicas, de la familia de las bacterias lácticas que tan sólo por sus preferencias térmicas, forman ya grupos naturales, pues los hay que proliferan mejor a 6-7° C: *Streptococcus acetilacticus*; a 14-16°: *Strep. citrovorus* o *paracitrovorus*; las del Kefir, a 20-24°; el *lactis* y *cremoris*, a 30°; el

strep. caesi y las propiónicas y el acidófilus, a 37°; el bifidus, a 40°; el yoghourtii y bulgaricus, a 43°; el Delbrueckii, a 52°; a 60-75°, las termodúricas de las centrales de pasteurización.

CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS QUE SE TOMAN PARA ESTUDIO TAXONÓMICO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Son principalmente: las temperaturas más favorables para su desarrollo, el tiempo que requieren para coagular la leche a las temperaturas más favorables y a otras temperaturas, temperatura máxima de coagulación que depende del que necesitan para acidificar la lactosa hasta el punto isoelectrico de la caseína (pH 4,5 o acidez de 0,75 por 100) a 20° C y de la formación de renina, el tipo de coagulación, cambios en el color de la leche tornasolada, la ácido-proteolisis, la intensidad de acidificación, la resistencia térmica, los tipos de aminoácidos y vitaminas que requieran, la variedad de azúcares y alcoholes que con cierta inconstancia pueden utilizar y fermentar, formación de gas, digestión de la caseína, tipo óptico del ácido láctico, tipo de productos de fermentación, formación o no de volutina (granulaciones metacromáticas), aceleración de la coagulación por medio de la glucosa o del hígado y no formación de catalasas y otras reacciones biológicas, su carácter gram positivo y carencia de esporas.

Además, los caracteres morfológicos, que en estas bacterias varían mucho según el tipo del medio de cultivo, si sólido o líquido, y según la temperatura, cultivo superficial o profundo, ya que las colonias y forma de las bacterias varían considerablemente, cultivadas en superficie de placa de Petri o en capas diferentes de agar en tubos, según la tensión de oxígeno y otras características aún no bien interpretadas desde el punto de clasificación.

Al querer hacer estudio de estas cualidades fisiológicas, o debe hacerse con bacterias recién aisladas, o deben cultivarse varias veces con reinoculaciones seguidas en el medio de cultivo y a las temperaturas que se desea emplear, especialmente al estudiar la fermentación o utilización de azúcares u otros glúcidos, glicerina, alcoholes o fuentes de hidratos de carbono que, en general, se prueban sobre base de agua de levadura con tornasol, o indicador de Andrade, o azul de bromotimol, o púrpura de bromocresol. Deben llevarse cultivos paralelos.

ALGUNOS FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO Y CULTIVO DE LAS MISMAS

Las bacterias lácticas requieren proteínas completas con todos sus aminoácidos, como los de la leche o extractos de levadura y, además, azúcares: lactosa o glucosa o maltosa. Los factores vitamínicos tienen gran importancia. El autolizado de levadura resulta una buena fuente de nitrógeno, mientras que no lo es la peptona. La leche, no obstante ser un buen medio de cultivo para ellas, es un pobre origen de nitrógeno, sobre todo para los gérmenes no proteolíticos, salvo previa digestión péptica o triptica. Las bacterias lácticas genuinas no prosperan en un medio de cultivo cuya única fuente de nitrógeno sea un solo ácido aminado o una sal amónica. Los estreptococos se desarrollan más deprisa que los lactobacilos, con las peptonas de caseína más complejas, proliferando mejor en la caseína digerida pépticamente, durante, máximo, unos quince días, pues si la digestión prosigue más tiempo, disminuye la proliferación microbiana.

Las bacterias lácticas o lactacidógenas, como el organismo humano, necesitan todos los aminoácidos esenciales o una mezcla compleja de productos de la desintegración proteínica, pues sus necesidades de nitrógeno no se pueden satisfacer por completo con sales amoniacaes inorgánicas. El grado alcanzado de la fermentación del sustrato glucídico, depende en parte de la concentración de la fuente nitrogenada en el medio de cultivo. Las necesidades de nitrógeno son casi uniformes para todas las bacterias lácticas o lactacidógenas, pero difiriendo las de nutritivos accesorios. El grupo homofermentativo prolifera bien en la leche y muy poco en un medio de cultivo inorgánico con peptona y glucosa.

Son necesarios los elementos «bios» de la leche. La leche contiene sustancias de crecimiento para las bacterias lácticas, y al ser extraídas estas sustancias por el carbón activado, las bacterias no crecen (leche inactivada).

Esta leche inactivada puede en cierto grado ser regenerada por hidrólisis que desdobra algunos aminoácidos, dando, según parece, origen a estas sustancias de crecimiento que pertenecen al grupo «bios».

La lactoflavina (B_2) es importante para las bacterias lácticas, no la B_1 (aneurina). Añadiendo un miligramo de lactoflavina por litro y el *bios* extraído por el carbón, extraído de éste por elución, queda la leche nuevamente activada y en cierto grado mejorada, pues el carbón también elimina las sustancias bacteriostáticas o bactericidas que contiene la leche.

La leche que lleva neutralizantes y se pasteuriza, pierde gran parte de la sustancia *bios*. Esto ocurre con gran frecuencia.

Las leches mamáticas, según muy extensos trabajos realizados por nosotros

en el Ministerio de Agricultura de Québec (Canadá) y Departamento de Industria animal del Ministerio de Agricultura de Wáshington en los años 1932 a 38 en colaboración con técnicos de dichos Departamentos, contienen sustancias que, en proporciones de hasta 10 por 100 de dichas leches, añadidas a la leche normal, paraliza o perjudica el crecimiento de las bacterias lácticas, especialmente de los estreptococos. 30 por 100 más que menos de las vacas de todos los países padecen de mamitis, y ello explica el por qué de muchos fracasos de los cultivos lácticos en leche (2).

Las peptonas obtenidas por digestión péptica, contienen *bios* suficientes para estreptococos; pero no para lactobacilos. Extractos vegetales de alfalfa, tomate, gérmenes de malta, autolizados de levadura y extractos de hígado, pueden sustituir al *bios* y mejorar los medios para aislar y cultivar las bacterias lácticas. Pequeñas cantidades de cistina, lisina, asparagina, mejoran el crecimiento de las termobacterias lácticas y paralizan el efecto depresor del crecimiento de las sustancias *bacteriostáticas*.

Algunas bacterias como el estrep. cremoris y betacocos precisan más sustancias accesorias o autolizados de levaduras que las otras bacterias.

Extractos de heces de vacas (vitaminas de bacterias intestinales?) producen efectos mejoradores en ciertos aspectos similares al *bios* y extractos de levaduras. También la fluorescina o extractos de cultivos hervidos de fluorescens y piocianeus, activan, como hemos podido probar, las leches inactivadas por el carbón.

Acido pantoténico, amida del ácido nicotínico y ácido adenilfosfórico y cozimasa de levadura, tienen en parte efecto parecido al *bios*, del cual son componentes.

El ácido paraminobenzoico es una sustancia de crecimiento que puede compensar el efecto perjudicial de las sulfonamidas sobre estreptococos patógenos, y a esta sustancia se atribuye parte del efecto de los autolizados de levaduras, igualmente a los aminoácidos azufrados de los hidrolizados de levaduras.

Fosfato potásico (2 por 1.000), sulfato magnésico (1 por 1.000), trazas de hierro y cobre son necesarios. Los estreptobacterias necesitan manganeso; los lactobacilos y estreptococos, no lo necesitan. Es sorprendente que las bacterias lácticas, que son aún más exigentes en aminoácidos que el hombre y los animales superiores, pues precisan como aminoácidos esenciales, además de los necesarios para el hombre, la arginina, ácido glutamínico, asparagina, creatina, no precisan triptofán. Pero no todas las bacterias lácticas precisan los mismos aminoácidos ni las mismas vitaminas, aunque, excepto la aneurina, todas precisan las demás del grupo B, que muchas de ellas sintetizan.

Los azúcares y glúcidos en general que pueden utilizar, varían en las diferentes especies y se acomodan a ellos, no siendo siempre constante, sino variable y modificable, el poder de una cepa para fermentar un azúcar.

El empleo de temperaturas de incubación, desde 6 a 70° C, es otro medio útil y necesario para facilitar el aislamiento de diferentes variedades de bacterias lácticas; igualmente, el cultivo a diferentes tensiones de oxígeno.

Las condiciones o exigencias de los otros grupos de bacterias del intestino, no han sido estudiadas aún con la extensión que se ha hecho en las lácticas, pero hay mucho averiguado sobre el «Werwendungs-Stoffwechsel» (metabolismo funcional) de las demás bacterias intestinales como de otros microorganismos, si bien lo que falta conocer en biología de los microorganismos es probablemente varias veces más de lo que hoy se conoce.

MEDIOS Y METODOS DE CULTIVO DE LAS BACTERIAS LACTICAS

Los siguientes métodos de cultivo para aislar y estudiar estas bacterias, medios que aquí sólo podemos mencionar y que pueden hallarse descritos en nuestra obra próxima a aparecer (1), son los más adecuados para aislar, cultivar y reproducir y estudiar las bacterias lácticas, ya en cultivos líquidos o sólidos, aerobios, microaerobios o anaerobios o, en especial, en la forma de los microcultivos que exponemos más adelante.

Los medios de cultivo más convenientes para aislar y contar el conjunto de microorganismos presentes en la materia de estudio (saliva, jugo gástrico, contenido intestinal de diferentes zonas, heces, contenido vaginal u otras materias problema), así como los medios apropiados para aislar selectivamente y luego estudiarlos sobre sus diversas capacidades biológicas, los mencionamos esquemáticamente en la lista de microorganismos a estudiar y de medios de cultivo que damos al final de este trabajo.

Ahora exponemos solamente algunos de los métodos de cultivo y estudio para los microorganismos del canal digestivo, en general, como decimos, poco conocidos por la microbiología médica, a pesar de ser los más eficaces, y algunos de ellos los únicos conducentes a ciertos objetivos propuestos en el estudio de estas bacterias. Siendo ya generalmente bien conocidos los métodos clásicos de cultivo empleados para recuento y aislamiento de los microorganismos llamados saprofitos o pasantes, más o menos obligados, del intestino o de las heces, como enterococos, proteus, putríficus, perfringens, clostridios, sacarobutíricos, etc., nos referiremos principalmente a los que nosotros, siguiendo a las escuelas que se han ocupado con más extensión del estudio de la flora funcional o simbiótica intestinal, consideramos como los microorganismos *esencialmente funcionales* de la misma y que son, principalmente, el grupo de las bacterias lácticas, el de las pectínicas o celulósicas y los de las fer-

(1) «Tratado de Laboratorio Lactológico y Bases Microbiológicas de las Industrias Lácteas», por José M.^a Rosell e Ignacio dos Santos. Editorial Labor, 1950.

mentaciones de los restos de hidrocarburos no digeridos por las diastasas correspondientes, en las partes del intestino donde éstas deben fisiológicamente actuar.

Estos tres grupos de esquizomicetos: las bacterias lácticas en las partes altas del intestino hasta el ciego y colon; las pectínicas y celulósicas tan necesarias para el intestino del hombre como de los rumiantes para el desdoblamiento de la celulosa, en estos últimos en el rumen ya del estómago y en el hombre en los últimos tramos del íleon, ciego y primeros del colon, donde con sus celulasas verifican las funciones hidrolíticas de la celulosa que el intestino humano no puede ejecutar por no tener celulasas; y las bacterias desdobladoras de las féculas que llegaron a estos tramos bajos del intestino sin poder ser atacadas por las diastasas amilolíticas glandulares, actuando con sus grandes capacidades químicas específicas, por sus lactasas, a pectinasas, celulasas y amilasas, en trabajo independiente y simbiótico; estos tres grupos de bacterias, decimos, asociadas más tarde con las del grupo coli y las putrefactivas, en funciones estas dos últimas fisiológica y utilitariamente, aún no bien conocidas y explicadas, son las que hasta hoy con más propiedad podrían llamarse, por ser mejor conocidas, *las bacterias funcionales simbióticas del canal digestivo*.

Otros microorganismos muy a menudo presentes, incluso en las heces, de los que hacemos mención en la lista de los microorganismos estudiados o encontrados en el aparato digestivo, y que damos al final de este trabajo, entre ellos especialmente los hongos: sacaromices, tórulas, oidios, monilias y otros hongos, son en general considerados como *pasantes* que encuentran habitación accidental más o menos favorable, según las clases de alimentación o quizá más probablemente de alteración funcional del canal digestivo, pudiendo ser a su vez factores patogénicos por los productos generalmente anormales de fermentación o desdoblamiento de los hidrocarbonados o proteídos no digeridos o de las grasas.

MÉTODOS ESPECIALES PARA AISLAMIENTO O ESTUDIO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

En la lista ya mencionada de medios de cultivo para el estudio de las diferentes actividades de las bacterias que damos al final, mencionamos los medios de cultivo más recomendados y más eficaces en la actualidad para el estudio de estas bacterias. En la obra indicada (1) se encuentra descrita con todo detalle la preparación de estos medios de cultivo para los microorganismos lactológicos, como sus métodos de estudio. De lo que se ha dicho anteriormente de los requerimientos nutritivos y de otras condiciones de cultivo de las bacterias lácticas, puede deducirse el por qué de la composición y otras

condiciones que deben tener estos medios. Los convenientes para aislar las bacterias lácticas, del contenido intestinal de los diferentes sectores, pero muy especialmente de las heces, donde excepto las bacterias lácticas de carácter más fecal, como el acidófilus o el bífidus y los enterococos, las otras se hallan en su mayoría muertas o fuertemente debilitadas, se requiere tengan las condiciones de nutrición y selectividad adecuadas y dificulten en lo posible el crecimiento de otras bacterias que vamos a citar, ajustándonos a un pH entre 5 y 6 y cultivando en lo posible en condiciones microaerófilas. Un procedimiento recomendable para aislarlas incluso de las heces, es el llamado cultivo en *placas de Petri de Henneberg, con el uso de cubres*. Consiste en preparar en pequeñas placas de Petri con agar sueropeptona, agar lactosa, extracto de levadura y peptona, a pH 5,6 y, si se desea, azul de china, (5 centímetros cúbicos de solución saturada estéril de azul de china por 100 gramos de agar) y en 4-6 lugares de la placa, practicar una extensión de diferentes diluciones de contenido intestinal o de heces, en lactosuero estéril, o de agua de levadura y cubrir con cubre objetos las zonas inoculadas.

Incubando diferentes placas a 20, 30, 37, 45 y 50° C se obtienen con facilidad colonias de los diferentes tipos de bacterias lácticas, fácilmente observables a los débiles y fuertes objetivos secos e incluso de inmersión. En esta clase de medios de cultivos, al pH poco favorable para las demás bacterias intestinales o fecales y en las condiciones microaerófilas que crea el cubre objetos, dificulta e impide el crecimiento no sólo de las bacterias del grupo coli y otros grupos emparentados, sino de las bacterias esporuladas, no sólo aerófilas, sino anaerobias, que difícilmente pueden desarrollarse a este pH y de la mayoría otras, de las materias fecales, excepto de las lácticas que requieren pH más elevados y también otros tipos de medios de cultivo.

AGAR TOMATE DE KULP MODIFICADO

Este es un medio de cultivo principalmente empleado para aislar el acidófilus de las heces, pero que también presta buenos servicios para las demás bacterias lácticas, excepto para el bífidus que requiere además de los elementos nutritivos de este agar, hígado o cistina, glucosa y condiciones estrictamente anaeróbicas. Este agar de Kulp se compone de: 400 c. c. de zumo de tomate filtrado, 10 grs. de peptona, pero al cual nosotros añadimos 10 grs. de lactosa, y 600 c. c. de suero de leche para un litro, más 10 grs. de extracto de levadura y 15 de agar, y ajustado a un pH 6,5 para el acidófilus y 5,5 para otros microorganismos lácticos. Puesto este agar en placas de Petri, se procede a la inoculación del espécimen en estudio, preferentemente diluido en las diluciones que se consideren convenientes, que pueden practicarse, por ejemplo, en el

mismo caldo de cultivo o agua de levadura estéril o suero fisiológico estéril. Puede inocularse por estrías o por zonas, a diferentes diluciones, y puede, si se desea, recubrir algunas de estas zonas con cubres; por el mencionado sistema de Henneberg, para obtener zonas microaerófilas. Es aconsejable inocular diferentes placas a diferentes diluciones e incubarlas a las diferentes temperaturas expuestas más arriba. Algunas placas pueden incubarse en condiciones de tensión de oxígeno disminuídas, colocándolas invertidas en cajas metálicas de cultivo cerradas, en las cuales con un tubo de goma que llegue hasta el fondo se ha introducido ácido carbónico o, en último caso, gas del alumbrado, y en condiciones anaeróbicas estrictas, produciendo la absorción de oxígeno o extracción del aire por cualquiera de los métodos conocidos.

Puede, naturalmente, hacerse enriquecimientos previos de bacterias lácticas, cultivándolas con uno o dos varios pases en los citados medios selectivos, líquidos y a temperaturas diferentes, para ir seleccionando grupos o especies en cultivo más puro, inhibiendo a la vez, tanto por la selección de las sustancias favorables para algunos grupos y desfavorables para otros, y que hemos mencionado más arriba, como especialmente por el empleo de las temperaturas más adecuadas para cada grupo, las bacterias de otros grupos con las no deseables, y con lo cual se puede llegar ya con relativa facilidad a obtener cultivos a veces puros o casi puros, y que pueden acabar de purificarse por los métodos de cultivo en agar que acabamos de mencionar.

Pero el procedimiento de cultivo que más amplio y perfecto estudio permite de las bacterias lácticas, y a la vez también de la mayoría de los demás microorganismos no patogénicos, aunque también podría emplearse en éstos con las debidas precauciones, es el de *los microcultivos* que mencionamos luego y que describimos con algún detalle por ser poco conocido, en general, en nuestro país y por la valía inigualada del mismo en estudios microbiológicos.

ALGUNOS MEDIOS Y MODOS ESPECIALES DE CULTIVO (*)

Utilizando debidamente uno o varios de estos medios de cultivo, y en diferentes condiciones térmicas y de tensión de oxígeno, pueden fácilmente aislarse y hacer el recuento y estudio de casi todos los tipos de bacterias lácticas presentes en la cavidad bucal, gástrica, intestinal, vaginal, heces, productos lácteos o de cualquier otro ambiente.

Los medios siguientes, sistematizados especialmente por Henneberg, Orla-Jensen, Demeter, Todoroff, Davis, y alguno por nosotros, son, entre otros, los que consideramos más adecuados: :

1. Leche desnatada, seleccionada de vacas libres de afección mamítica y

(*) Extractados de la obra citada (1).

que no sea de períodos calostrales o de celo ni de vacas enfermas. Esta leche se emplea desnatada eventualmente diluída con 20 por 100 de suero fisiológico u otros medios de dilución apropiada, tindalizada en seis o siete días diferentes o filtrada por filtro bacteriológico Seitz o esterilizada, la que no resulta adecuada para algunos tipos de bacterias. Puede ser enriquecida o modificada para estudios especiales, con autolizados de levadura, peptona, de caseína o levadura, hidrolizados trópicos de caseína, jugo de tomate o de otros vegetales, tintura de tornasol, azul de bromotimol o bromocresol púrpura o azul de metileno y materiales tampón o tope con carbonato de cal o fosfato dipotásico.

2. Leche desnatada inactivada por absorción por carbón para el estudio de requerimientos de sustancias accesorias de nutrición.

3. Suero de leche o queso, natural o desproteínizado, inactivado con aditivos varios, como peptona, agua de levadura, autolizados de levadura, hidrolizados pépticos o trópicos de caseína o en suero inactivado y desproteínizado como elemento base al que pueden añadirse las sustancias accesorias nutritivas o metabolitos (bios, aminoácidos especiales, vitaminas, etc.)

4. Agua de levadura natural o previa fermentación de sus glúcidos por el coli, para ser utilizada igualmente como medio básico para probar otros elementos nutritivos, especialmente la capacidad de fermentación a los diferentes azúcares, alcoholes, etc.

5. Leche con previa digestión péptica o tróptica y los demás elementos convenientes.

6. Caseína pura en solución de 2 por 100 bajo digestión péptica o tróptica como medio básico para la prueba de fermentación de los diferentes glúcidos o fuentes de hidrocarburos, así como de vitaminas, etc.

7. Medios a base de malta o mosto de cerveza combinados con cualquiera de los otros mencionados.

8. Estos mismos medios conteniendo materiales sólidos como granos molidos de malta o centeno o pedacitos de papel de filtro o de carne muscular triturada o hígado o corazón triturados en pequeños fragmentos, especialmente para cultivos anaerobios en tubos con 20 o más c. c. de contenido.

9. Cualquiera de los medios líquidos mencionados en forma de agar o gelatina, para utilizar tanto en placas como en tubos de capa elevada o de agar inclinado o microcultivos para empleo en forma aerobia o anaerobia.

10. Medios para conservación de los cultivos, siendo especialmente recomendables los de agar en botellas o tubos o capa profunda con sólo 0,3 por 100 de sustancia hidrocarbonada para evitar la superacidificación del medio o tamponados con carbonato de cal para neutralizar el exceso de acidez.

En la obra mencionada se puede encontrar en detalle la preparación y empleo de los mencionados medios de cultivo. A base de estos medios de

cultivo y con el uso de los métodos corrientes de aislamiento por diluciones y placas de Petri o en agar inclinado por el método Burri o en tubos en capa alta por el método Todoroff y en formas a diferente tensión de oxígeno y a temperaturas variadas entre 0 y 70°, ya que hay bacterias lácticas que crecen entre estas diferentes temperaturas, pueden estudiarse las características que se deseen, y especialmente: las temperaturas óptimas de crecimiento, tiempo de coagulación de la leche, acidez máxima producida y rapidez de la misma, cambios en la leche tornasolada (7 por 100 de tintura de tornasol Kahlbaum) o de azul de metileno a diferentes concentraciones o indicadores de pH, o sustancias bacteriostáticas como violeta de genciana, verde brillante y muchas otras, formación de volutina o granos metacromáticos, capacidad proteolítica, determinación de las series de azúcares transformables o utilizables, tipo de ácido láctico formado, formación de gas, producción de catalasas, etc., etc.

NOTA.—Para el estudio morfológico de colonias y de individuos, pueden utilizarse todos los medios conocidos, pero, especialmente, el inigualado método los microcultivos Lindner-Henneberg de los trazos a la pluma en cubreobjetos sobre fondo excavado, detallados más adelante.

12. *Agar de tres medios en uno o agar universal.*—Siendo el suero de leche, los caldos de malta o mosto de cerveza y los caldos de carne peptonados mejorados con agua o extracto de levadura o los azúcares y sales que se han mencionado los medios más adecuados para los diferentes grupos de bacterias intestinales u otras sustancias, puede hacerse una mezcla de éstos tres tipos de medios de cultivo en las proporciones que se desee y emplearlos en las formas expuestas: a diferentes temperaturas, aeróbica o anaeróticamente, en capa de agar superficial o profunda, etc.

Por este procedimiento, de un agar o caldo universal o de triple composición, pueden aislarse más seguramente los microorganismos representantes de los diferentes grupos que estén presentes en la sustancia objeto de estudio.

13. *Método de las pequeñas placas de Frost* para el estudio global de las bacterias presentes en material del contenido intestinal, y para recuento de las bact. lácticas o de otros grupos, empleando los medios de cultivo ya especificados.

MATERIAL Y REACTIVOS NECESARIOS PARA EL MÉTODO DE FROST:

Portaobjetos desgrasados, secos y flameados, con un área enmarcada de 4 cm . (se puede emplear la técnica empleada por el método de Breed, utilizando un patrón de metal o carbón o cristal que tiene marcada dicha área, y sobre cuya lámina se adosa el portaobjetos), lo que se puede conseguir marcando el área con un simple lápiz de parafina.

Pipetas divididas en centésimas de centímetro cúbico.

Asa de platino.

Termostato o cámara caliente que consiste en una simple caja sobre la cual se colocan los portaobjetos y que se puede calentar llenándola con agua caliente (a 45°) o de cualquier otro modo. La misma platina de secar los portaobjetos o el bañomaría caliente pueden servir, regulando su temperatura de suerte que no sea excesiva, pero manteniendo licuado el agar.

Cámara húmeda que se puede improvisar con placas de Petri dotadas en su fondo con papel de filtro húmedo o con un desecador, colocando sobre la rejilla el recipiente (placa de Petri, por ejemplo) que contiene los portaobjetos con los cultivos. El desecador se tapa, colocando algo de agua en el fondo para mantener la humedad, y con esto ya queda dispuesto para llevarlo a la estufa de cultivos.

Estufa de cultivos.

Desecador.

Alcohol acético.

Cubeta especial para teñir y colorante, que puede ser el azul de metileno, el de toluidina o el de Loeffler diluido con agua destilada al cuarto. Un colorante satisfactorio es el constituido por 10 c. c. de solución alcohólica saturada de azul de metileno con 400 c. c. de agua destilada.

Pinzas.

TÉCNICA:

Se marcan los portaobjetos (dos cuadros en cada uno) y se flamean. Se colocan sobre la cámara caliente a 47-48° C.

Con una pipeta caliente se mide 0,05 c. c. del medio de cultivo deseado y licuado y enfriado a 45° C y se encha en el cuadrado, sobre el cual también se pone, inmediatamente después, el volumen conveniente de la sustancia que se desea analizar, bien homogeneizada, teniendo el cuidado de limpiar la punta de la pipeta con papel de filtro esterilizado.

Se flámea el alambre de platino, se deja enfriar y con él se mezclan uniformemente el medio de cultivo y la sustancia en estudio. Sin demora, se introduce el portaobjeto en la cámara húmeda y después en la estufa de cultivos.

Se incuba, si es posible, a las temperaturas de 24, 30, 37 y 43° C durante cuatro horas o más tiempo, según se vea ser el desarrollo de colonias. Es conveniente poner cultivos duplicados en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas, pero antes pueden hacerse subcultivos de colonias aisladas.

Terminada la incubación, se desecan sin pérdida de tiempo durante quince minutos a 90° C, y después los portaobjetos se fijan en alcohol acético al 10 por 100 (el alcohol ha de ser de 95°).

En cierta manera puede suprimirse la desecación sumergiendo el portaobjetos en alcohol acético, o bien en un colorante durante dos minutos y luego en agua. Se seca en la estufa a 37° C o en aire caliente de 50 a 60° C.

El recuento se practica con el microscopio, utilizando un aumento mayor según sea el tamaño de las colonias, pero sin recurrir al objetivo de inmersión, a no ser que la preparación se monte con bálsamo. Se examina toda ella para adquirir una noción general del cultivo y se cuentan las colonias presentes en cinco campos microscópicos, prescindiendo de las que contactan con el borde izquierdo y contando tan sólo la mitad de las que contactan con el borde derecho del mismo. Si la incubación ha durado ocho o más horas y a diferentes temperaturas, prácticamente todos los gérmenes presentes y vivos al principio en la sustancia en estudio, ya han desarrollado colonias bien deslindadas.

El número de colonias así desarrolladas, permite averiguar su promedio por campo que, multiplicado por el aumento microscópico, expresa la riqueza microbiana por centímetro cúbico de la sustancia en estudio.

Algunos autores recomiendan el empleo de una laminilla de cristal, de 23 × 27 mm., que en una de sus caras tiene tallada una cuadrícula de milímetros cuadrados. Esta laminilla se aplica sobre el cultivo con la superficie cuadrículada hacia abajo. Cada milímetro cuadrado recubre 0,0001 c. c. de la sustancia en estudio, de suerte que cada colonia presente en él corresponde a una riqueza microbiana de 1.000 gérmenes por centímetro cúbico de la sustancia en estudio.

En la práctica se cuentan todas las colonias presentes en filas alternas y el número global se multiplica por 20, pero si las colonias son muy numerosas, se hace el recuento en 25 cuadrados y el número obtenido se multiplica por 200. A continuación se sobrepone la laminilla en el otro cuadro del portaobjetos, se realizan los recuentos y se calcula el promedio.

Si la sustancia en estudio contiene más de un millón de gérmenes por centímetro cúbico, conviene diluirla de antemano. Para que la cantidad de sustancia en estudio empleada en cada cultivo no sea relativamente menor, estas diluciones se han de hacer con la misma sustancia esterilizada en lugar de con cualquier otro diluyente.

Recontadas las colonias, se ha de tener en cuenta la dilución en el cálculo del número de gérmenes correspondientes a un centímetro cúbico de la sustancia en estudio.

14. *Agar Roseli* para aislar bacterias lácticas, para el recuento de las mismas y para la conservación de cultivos de bacterias lácticas.

Este medio tiene por objeto suministrar junto a los elementos de la leche, que siempre son los más convenientes para las bacterias lácticas, otros elementos nutritivos, como son los hidrolizados pépsicos y trísicos de la caseína,

hasta aminoácidos, conteniendo todos los que se han mostrado esenciales para las bacterias lácticas, conteniendo también el medio el conjunto de elementos vitamínicos requeridos por las bacterias lácticas en general.

Digestión péptica de caseína (caseína peptonizada) desecada	0,5 por 100
Hidrolizado total de caseína hasta aminoácidos desecado...	0,5 por 100
Na HPO 2 H O	0,3 por 100
Citrato sódico	0,2 por 100
Glucosa	1,0 por 100
Infusión de 500 gr. de carne	200 c. c. por 1.000
Suero de leche	50 c. c. por 1.000
Extracto de levadura	0,3 por 100
Agar	1,5 por 100

Preparación de un litro de este medio de cultivo.

A) *Preparación de la caseína por digestión péptica utilizable para varias veces.*

Preparación de la caseína digerida de Orla-Jensen:

Caseína comercial	280 grs.
Agua	3.000 c. c.
Pepsina	8 grs.
Acido clorhídrico concentrado	36 c. c.

Manténgase la estufa a 37° C durante seis-diez días, para digerir.

Filtrese y añádase:

Fosfato bipotásico	10 grs.
Sulfato magnésico	5 grs.

Gradúese a pH 6,8 con carbonato sódico.

Agréguese la cantidad de agua necesaria para completar 2.500 c. c.

Clarifíquese, filtrese y llénense botellas de 1.000 c. c., después esterilícese o deséquese en el vacío para obtener la sustancia seca, o empléese la peptona seca de caseína.

Cada botella contendrá, aproximadamente, 35 grs. de caseína digerida hasta peptonas y polipéptidos, correspondiendo a la mitad de la caseína que contiene un litro de leche normal. La otra mitad se añadirá en forma de hidrolizados de caseína hasta aminoácidos. Estos *hidrolizados de caseína* pueden separarse por los conocidos métodos de hidrolisis enzimática a base de pancreatina, papaína y tripsina, pero siendo el procedimiento algo laborioso y largo, es más práctico obtener ya estos hidrolizados que ofrece el comercio, tales como el «Aminoid» o «Aminogen» puros americanos o el «Omnia-Amin I. R.» español.

Partiendo de este último, añádase 7,5 grs. de «Omnia-Amin» por litro de cultivo, que equivale aproximadamente a los hidrolizados totales de 15 gramos de caseína, con lo que el litro de este medio contendrá aproximadamente 30 grs. de caseína, la mitad en hidrolisis péptica y la otra mitad en hidrolisis total hasta aminoácidos conteniendo todos los aminoácidos considerados como esenciales y otros elementos biológicos de los hidrolizados de caseína.

La digestión péptica de la caseína podría eventualmente sustituirse, aunque disminuyendo la selectividad del medio de cultivo, utilizando peptona en proporción aproximada de 0,5 por 100.

B) Extracto de levadura.

Se prepara de la forma siguiente: disolviendo 100 grs. de levadura prensada de panadero en 200 grs. de agua acidulada con 0,25 por 100 de ácido acético, dejando hervir treinta minutos en recipiente tapado, dejando sedimentar y filtrando por papel de filtro doble. Neutralícese con carbonato de sosa hasta un pH de 6,7, embotéllese en frasquitos de 30 c. c. y esterilícese, si es posible, por tindalización, o sea cuatro veces en días seguidos a 100°, 10 m. Un frasquito de esos es la cantidad para emplear en un litro del medio de cultivo que se prepara.

C) Infusión de carne, que se prepara en la forma corriente.

D) Suero de leche.

Puede adquirirse de quesería, o bien se prepara tal como va expuesto en los tratados de bacteriología. El suero de leche, preparado en la forma que sea, debe calentarse a 120° y una acidez de 0,22 por 100 de ácido láctico para precipitar las lactoalbúminas precipitables y se guarda igualmente en botellas filtrado y esterilizado, salvo que se prepare en el momento de utilizarlo.

Mézclense A, B, C y D. Añádanse las restantes sustancias, regúlese a pH 6,7, añádase el agar necesario y el agua hasta un litro. Filtrese si es necesario y llénese en tubos o botellas para ser utilizado, ya en placas o ya en tubos.

Al utilizarse para aislar bacterias lácticas o para recuento de las mismas en las diluciones convenientes, las placas deben incubarse, si es posible, a temperaturas de 10, 20, 30, 37, 43 y 55° C, para obtener, aislar y contar las bacterias lácticas que desarrollan a estas diferentes temperaturas.

15. *Agar Rosell con azul de China.*

Al igual que el agar lactosado con azul de China Henneberg, se prepara este agar añadiendo, cuando está enfriado a 50°, cinco gotas por 100 de una solución saturada de azul de China preparada en agua estéril y esterilizada a 115°, 15 m. Las diferentes colonias y bacterias lácticas aparecen como puntitos de azul de diferentes intensidades y, si en vez de azul de China, se añade azul de bromotimol, las colonias de bacterias lácticas tomarán el color amarillento a pH de 6,2-6,3.

El medio acabado de exponer puede utilizarse como medio líquido sin el empleo del agar, como un medio selectivo en vez de leche para cultivo y conservación de bacterias lácticas. En este caso es conveniente añadir 1 por 100 de carbonato de cal, con lo que los cultivos se mantienen con mucho más largo tiempo, especialmente si se agita el cultivo cada dos o tres días de los primeros tiempos, para ir neutralizando o taponando el ácido láctico que se pueda ir formando si no se guardan los cultivos a temperatura de 2-5°6.

Este medio de cultivo líquido sustituye perfectamente la leche corriente-mente utilizada para los medios de cultivo corrientes de bacterias lácticas. Es especialmente recomendable esta sustitución en los frecuentes casos en que la leche obtenida da un gran porcentaje de leche mamítica, resultando los cultivos lácticos, especialmente los estreptococos, lácticos y cremorias o termófilos, fuertemente perjudicados por la leche mamítica.

16. *Leche como medio de cultivo.*

La leche es uno de los principales medios de cultivo utilizados en lactología. Su recolección y preparación han de ser muy cuidadosas; por ejemplo, se utiliza la leche de vacas fuera del período de celo o de cambio de alimentación.

Se puede emplear pura o desnatada, enriquecida o no, con o sin sustancias tampón, topes para el pH.

El enriquecimiento puede consistir en la adición de leche en polvo no azucarada, por ejemplo en 1 por 100 de leche evaporada (residuo seco de 100 centímetros cúbicos para un litro de leche), extracto de malta (del 2 a 3 por 100), extracto de levadura (del 2 al 3 por 100).

Como topes del pH se emplean el carbonato de cal al 0,5 por 100 o el fosfato disódico al 1 por 1.000.

En cualquier caso, la tindalización se ha de ajustar a las siguientes normas:

1.º Se ha de calentar un minuto a 100° C.

2.º Transcurridas diez horas, y manteniendo la leche a la temperatura ambiente, se esteriliza un minuto a 90° C.

3.º Al cabo de veinticuatro horas se repite la tindalización y se reitera cuantas veces haga falta, generalmente 5-6 y se comprueba la esterilización poniendo a incubar dos días algunos tubos a 24 y 37°

Por otra parte, la leche se puede colorear con tornasol, con rojo de bromocresol o con azul de metileno. El primero de estos indicadores se prepara agregando a la leche, una vez esterilizada, el 7 por 100 de tornasol aséptico (7 por 100 de la solución de Kahlbaum o de tintura de tornasol), el segundo, del mismo modo, utilizando las soluciones de azul de metileno de concentración dispar, según el porcentaje pertinente, generalmente 1 : 200.000.

AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE LAS BACTERIAS DESDOBLADORAS DE LAS PECTINAS Y CELULOSAS DE LAS AMIOLÍTICAS

Este grupo de bacterias intestinales en el hombre y gástricas a la vez que intestinales en los rumiantes y herbívoros, que digieren la celulosa y pectina, para cuyos hidrocarburos no existen diastasas glandulares, es de gran importancia fisiológica. Sin estos microorganismos no podrían los animales, especialmente los rumiantes, alimentarse de paja y alimentos celulósicos. En el intestino humano, las bacterias peptínicas y celulósicas terminan asociadas a las amilolíticas o permiten la digestión y más o menos completa utilización de los restos de féculas envueltos en la celulosa y que escaparon por esta razón a la digestión salivar y pancreática.

Son muy numerosas las bacterias que pueden digerir la celulosa y pectina. Hay unas 35 variedades descritas, la mayoría habitantes de los suelos de cultivo y bosques, donde tienen la misión del desdoblamiento de los residuos vegetales. Las más frecuentes en el intestino humano y de los animales, son algunas de las siguientes:

Clostridium disolvens o *bacillus cellulosa* *dissolvens*, bacil. *Omelianski* o *cellulosa fermentans*, bac. *ElleMBERGERII*, *Clostr. Zuntzii*, *Clostr. Nothnageli*, bacil. *methanigenes*, *micrococcus ruminantium*, y entre los amilolíticos, especialmente, el *clostridium butyricum* o *granulobacter saccharobutyricus*, *mobilis* e *inmobilis* y varias bacterias yodófilas incluídas entre los que pueden transformar en azúcares absorbibles o fermentables las féculas no transformadas por las diastasas glandulares. Varias de estas bacterias, formadoras de pectasas, celulasas o amilasas, van unidas a diferentes otros nombres, y algunas de ellas están muy deficientemente estudiadas hastaahora desde el punto de vista taxonómico, por las dificultades de obtenerlas en cultivo puro.

Actúan generalmente en simbiosis o asociación de los tres grupos y muy a menudo en comunidad beneficiosa con las lácticas y el coli. Su actuación diastásica, al parecer por endocelulasas, en las celulolíticas, parece depender de la masa de bacterias, que forman como nidos en las partes celulósicas de los residuos alimenticios, en cuyas partes producen digestiones locales que perforan o roen, por así decir, los restos celulósicos en que anidan.

La presencia de azúcares o de lactosa especialmente, como de restos proteínicos, modifican en bastante grado el tipo de productos derivados de su actividad celulolítica, formando menos productos gaseosos y más azúcares en presencia de abundante flora láctica y más productos gaseosos en mayor abundancia de *escherichias* o coli y flora putrífica.

Su aislamiento y cultivo es algo largo. Debe partirse de los restos celulósicos que se recogen del contenido intestinal, o de las heces diluyendo éstas

en un plato con fondo en parte oscuro y parte claro, para realizar una especie de disección y con pinzas recogen los restos celulósicos, como pieles de legumbres, especialmente judías, guisantes, garbanzos, con cuya alimentación algo abundante se consigue enriquecer considerablemente la flora pectínica, celulósica y amilolítica. Igualmente restos de legumbres verdes (acelgas, coles, espinacas, habichuelas verdes, zanahorias especialmente crudas, rábanos, nabos), así como frutas, especialmente higos, melocotones, manzanas y otras y pan integral. Como estas bacterias pectinolíticas y celulolíticas, y las mismas amilolíticas, parecen estar adheridas a las partículas que digieren, o diríase que roen, pueden estas partículas lavarse suave y rápidamente en agua o mejor en el líquido de cultivo que damos más abajo. En esta forma se liberan algo de las bacterias acompañantes de las que se desea aislarlas, especialmente de las del grupo coli y putríficas.

El estudio de estas bacterias puede hacerse muy bien desde el punto de vista microscópico, observándolas sobre los restos celulósicos en que crecen, anidan y actúan. Casi todas ellas son esporuladas y de tipo clostridium principalmente y de diferentes tamaños y formas, clasificadas por Henneberg, que es el bacteriólogo que probablemente más largos estudios ha hecho sobre estas bacterias intestinales (como igualmente sobre las lácticas, del intestino del hombre y de los animales) en los grupos clostridium, giganteum, medium y pygmaeum. Son fáciles de diferenciar en los exámenes microscópicos, ya en los cultivos naturales obtenidos de las materias fecales especialmente algo diarreas y después de varios días de alimentación vegetariana abundante y en buena parte crudívora, o en cultivos artificiales que mencionamos a continuación.

Para observar bien estas bacterias en cultivos naturales, como para partir de un excelente ambiente para cultivo más fácil de las mismas, se puede recurrir al método que hemos empleado y visto emplear en los laboratorios del profesor Henneberg, consistente en aprovechar el momento en que una cabra envía a la boca, para rumiación, la comida herbácea, especialmente de hojas de arbusto, zanahorias, nabos, hierbas, apretándole el esófago antes que pueda deglutir lo rumiado, que se le extrae de la boca y se recoge en un recipiente líquido a propósito para ser estudiado al microscopio o utilizado como partida para cultivos. También puede partirse, para cultivos fáciles, de excremento de caballo o de vacas alimentadas principalmente con paja y heno o del humus de los residuos de bosques de árboles y arbustos y también de estercoleros de caballos y vacas.

MEDIO DE CULTIVO DE HENNEBERG

Número 1.—Solución acuosa de: 0,1 por 100 de sulfato amónico, 0,1 por 100 de fosfato dipotásico, 0,05 de sulfato magnésico, 0,01 de cloruro sódico,

0,01 de carbonato cálcico (0,5 como tampón o tope), 0,1 de carbonato sódico. A esta solución sintética se añade 2 por 100 de paja muy bien molida más 2 por 100 de agar. Se esteriliza en la forma corriente en balones o botellas de unos 100 c. c.

Número 2.—El mismo medio de cultivo número 1, acabado de mencionar, al cual se le añaden hojas de espinacas o ensalada desmenuzadas y de sus partes delgadas, o pedacitos de papel blanco de diario o de filtro delgado, o incluso aserrín, todo finamente molido.

Los cultivos pueden verificarse en placas de Petri como cultivos aerobios, en botellas, en Erlenmeyers, o incluso en tubos de ensayo como cultivo líquido o flúido con 0,5 por 100 de agar en capa elevada para cultivos a menor tensión de oxígeno o anareóbicos. Para inoculación, se emplean las partículas celulósicas de los especimen o materiales de estudio mencionados, y no el líquido del lavado de las mismas, ya que las bacterias en cuestión, como hemos dicho, están adheridas a las partículas celulósicas que atacan. No conviene inocular con excesiva cantidad de material, para evitar introducir demasiada cantidad de otras bacterias no deseables, especialmente coli, proteus, subtilis, micoides y bacterias de putrefacción que pudieran fácilmente desarrollarse en este medio de cultivo. Los cultivos inoculados se ponen a incubación a temperaturas de 30 y 40° C. Las hojas verdes delgaditas se ven atacadas más prontamente, y a los tres o cuatro días puede observarse ya su disolución que se nota por la coloración verde que toma el cultivo a causa de la clorofila que queda liberada. A la observación microscópica, pueden notarse ya los nidos de los clostridios y la disolución de las células de la epidermis y parenquima de las hojas, quedando libres los espirales de los vasos y mostrando las perforaciones irregulares de la digestión. Otras partes celulósicas y partículas de patatas, que pueden haberse introducido, se muestran disueltas entre ocho y treinta días; y otras partículas como pedazos de papel o aserrín, pueden tardar hasta sesenta días en disolverse.

Como se forman productos de fermentación variados, según las bacterias (ácido butírico, acético, láctico, alcohol butírico, amoníaco, etc.) aparte de los gases que pueden formarse, es conveniente o útil, al cabo de unos días de fermentación decantar la mayor parte de la parte líquida y añadir un nuevo medio de cultivo.

Con la repetición de inoculaciones de los cultivos de esta forma, en parte seleccionados, puede conseguirse una mayor purificación de los cultivos, y aun con algunas dificultades, obtener cultivos de bacterias celulósicas, pectinolíticas y amilolíticas. En las figuras o dibujos al prisma reproducidos de Henneberg, pueden apreciarse los principales aspectos.

LOS MICROCULTIVOS DE HENNEBERG EN FORMA DE TRAZOS DE PLUMILLA PARA LAS INVESTIGACIONES MICROBIANAS

El *microcultivo*, en lugar del método clásico de cultivo en gota pendiente, lo empleó primero, para fines de control industrial microbiológico, en el año 1893, el profesor Lindner, micólogo del Instituto berlinés de Fermentaciones Industriales, de quien tuve el privilegio de ser discípulo. Este método fué descrito minuciosamente por Lindner, en su folleto «Comprobación del rendimiento en las fermentaciones, por el examen microscópico» (publicado por Paul Parey, Berlín). Henneberg, su sucesor, el gran microbiólogo de las industrias de fermentaciones, amplió la segunda edición del «Manual de la Bacteriología de la Fermentación» y mejoró notablemente este procedimiento que nosotros hemos tenido amplia ocasión de utilizar en sus mismos laboratorios.

Sobre un portaobjetos excavado, se monta, con cierre hermético al aire, mediante vaselina extendida con un pincel alrededor de la concavidad, un cubreobjetos pasado por la llama y enfriado y en cuya cara inferior, con una plumilla de dibujo, sosteniendo por los cantos debidamente, se han trazado varias veces (por ejemplo, de 2 a 5) de tracios o puntos con medio de cultivo investigado o sembrado, algo así como gotas pendientes alargadas. Por lo común se disponen *varias series* de microcultivos para emplear *diversos grados de dilución* del material problema. La dilución ha de ser muy grande cuando se pretende obtener un cultivo puro (*cultivo con un solo elemento celular*) en alguna de las gotitas del microcultivo, ya sea una célula de levadura o de otro germen. Dicha dilución no precisa ser tan grande, si tan sólo se investiga el modo de desarrollo o la identificación preliminar de la especie, del microorganismo presente o predominante, y la dilución será menor para *comprobar y aislar las especies microbianas presentes*. Si el producto problema contiene numerosísimos gérmenes, en la inmensa mayoría de los casos el microcultivo ya proporciona una noción conjunta suficiente en la primera serie de tracios de la plumilla o gotas pendientes alargadas.

El mejor procedimiento para obtener las *diluciones* consiste en poner en un frasco muy pequeño, conteniendo un medio de cultivo esterilizado, apropiado para el microorganismo presente o que se supone existente, mosto de cerveza, leche, agua de levadura, caldos, etc., y los medios de cultivo indicados para cada caso, una pequeña cantidad de cultivo líquido o de la masa microbiana problema (por ejemplo de contenido gástrico o intestinal de diferentes sectores, o de heces, saliva o cualquier otro producto a estudiar: agua, leche, cerveza, productos de fermentación, mantequilla, queso, tierra, etc.), agitando muy bien para homogeneizar la mezcla. Después se moja la plumilla de

dibujo, sujeta o enmangada en una varilla de cristal, previamente mojada en alcohol y flameada, y se practica la primera serie de tracios, y así sucesivamente. La plumilla mojada en el medio de cultivo líquido esterilizado se puede sembrar directamente con el asa o aguja de platino.

El objetivo de los microcultivos consiste en obtener microscópica o macroscópicamente, y observar, en una cantidad mínima de líquido, durante uno, dos o varios días o bien semanas, respectivamente, el desarrollo de las bacterias, levaduras, mohos, etc., al principio presentes en las diversas diluciones. Este objetivo es trascendental para la obtención de cultivos unicelulares, es decir, cultivos puros, con absoluta seguridad, especialmente fácil en levaduras y mohos, lo propio que para el estudio de los cultivos puros, comprobación de los medios de cultivo líquidos en lo referente a su contenido microbiano, número y especies de los gérmenes presentes, idoneidad para determinadas especies microbianas, influencia desarrollada por las adiciones, los distintos grados de la temperatura y los diversos alimentos, vitaminas, aminoácidos, etc.

El microcultivo permite observar y, por así decir, con la visión microscópica, no sólo el tipo y morfología del microorganismo, sino sobre todo en los preparados que al principio sólo poseen pocos microorganismos y se puede seguir la manera de proliferación y división, los caracteres normales de su desarrollo (microcolonias, gemmación, cadenas, esporulación, fisión, involución, autólisis, etc.), todo lo cual a menudo tiene mucha importancia para la identificación de las especies y estudio de su vida.

El procedimiento del microcultivo representa además de un método de siembra en cantidades pequeñísimas, un análisis biótico cuantitativo y cualitativo rápido, a la par que económico, pues ahorra tiempo y espacio y material consumido, y muchas veces sustituye la siembra en placas de Petri, etc. Es un procedimiento muy cómodo que permite, por ejemplo, durante los viajes de inspección, disponer en poco tiempo numerosísimos cultivos, los cuales se colocan en estuches especiales que se embalan en las cajas apropiadas para su remisión al laboratorio. No hace falta un laboratorio para la preparación de estos microcultivos; huelga el transporte de un microscopio, etc., en viajes de inspección.

El método del microcultivo conserva el cuadro microbiano original, mientras que el porte o el envío del producto problema líquido, sobre todo si no se refrigera con hielo, puede sufrir modificaciones microbianas por la proliferación o represión de ciertas especies microbianas con el consiguiente cambio fundamental del cuadro microbiano.

Procede recalcar, además, el valor del microcultivo para la *obtención de fotografías*. En el borde de las gotitas los gérmenes están en una capa delgada y exentos del movimiento browniano trastornador, por lo cual con facilidad se obtienen excelentes imágenes fotográficas de la disposición natural en las

microcolonias. Como, para este fin, las gotas muy aplanadas son las más apropiadas, precisa desengrasar más que de ordinario el cubreobjetos, para que se extiendan por la totalidad de la superficie del mismo, formando finísima colonia (*cultivos adheridos*) los gérmenes que de esta manera son forzados a desarrollarse adosados en un solo plano. Tales cultivos son los más apropiados para la finalidad precitada. Los microcultivos pueden hacerse a base de todos los medios de cultivo, caldos, leche, agar, gelatina, etc.

A continuación exponemos un resumen de los datos más importantes que pueden obtenerse mediante los microcultivos, tanto de material del contenido gastrointestinal, como de cualquier otro material de estudio: agua, leche, pus, etcétera:

1.º *Presencia de microorganismos.*

Por medio de los microcultivos se puede averiguar si el material en estudio es estéril o contiene bacterias, levaduras o mohos vivos. Si la primera serie de tracios de plumilla desarrolla microorganismos, mientras que falta tal desarrollo en la segunda y tercera serie de tracios más diluídos, puede deducirse que el producto problema contiene escasa cantidad de microorganismos, y con adecuada técnica puede llegarse a una apreciación aproximada de la cantidad de microorganismos, además de la clase de los mismos. Si el desarrollo microbiano todavía es abundante en la tercera o cuarta dilución de la serie de tracios, es señal de que el producto problema contiene abundantes microorganismos. En muchos casos, conviene practicar las diluciones en distintos frasquitos o tubos de ensayo o de los empleados para trabajos serológicos, al décimo, al centésimo, milésimo o cienmilésimo, para obtener datos precisos sobre la cantidad de microbios presentes. Las diluciones se realizan con preferencia mediante caldos de los medios que se desea emplear: mosto de cerveza, agua de peptona, etc., en dos o tres preparaciones simultáneas.

2.º *Presencia de varias especies microbianas.*

Con el microcultivo se comprueba fácilmente la pureza de los cultivos, por ejemplo, se averigua con suma facilidad si un cultivo puro cualquiera, muestra una contaminación. La presencia de microorganismos extraños en la tercera, cuarta o quinta serie de diluciones, revela que la contaminación es ya intensa.

3.º *Simbiosis, metabiosis y antagonismo.*

En las mezclas microbianas se puede comprobar qué especies se exaltan mutuamente al desarrollo, cuáles proliferan conjuntamente sin menoscabarse y cuáles se inhiben entre sí. Por ejemplo, las levaduras toleran bien la presencia de las bacterias lactacidógenas genuinas y se benefician mutuamente. Asimismo los mohos conviven muy bien con las bacterias acéticas, en cambio son antagonicas las levaduras y diversas bacterias coagulantes de la leche, en especial las levaduras fermentantes de lactosa y las bacterias acéticas. Las bacterias lactacidógenas, muy acidificantes, en general inhiben por completo la proliferación de los bacilos, coli, fluorescentes y afines, como puede probarse, en el desarrollo de las siembras puras en gotitas de microcultivos testigos.

4.º *Presencia de una determinada especie microbiana.*

Si se conoce el aspecto y comportamiento de las especies de microorganismos en estudio, se identifican con facilidad en los microcultivos. A menudo, con este solo recurso se determina la especie del microbio presente. Se reconoce sin más, por ejemplo, en muestras de leche, el *Streptococcus lactis*, *cremoris*, *thermophilus*, *mastitidis*, etc., pero, como es natural, en casos dudosos, también se ha de tener en cuenta las temperaturas de cultivo y otras circunstancias.

5.º *Medios nutricios.*

En el microcultivo, lo mismo que en los cultivos en mayor volumen de medio de cultivo líquido, tiene gran importancia la elección del medio nutritivo, así como la temperatura de incubación. Anteriormente, hemos citado algunos de los medios más indicados para varias determinaciones y aislamiento de gérmenes de la flora intestinal, pudiéndose emplear igualmente cualquier otro medio de cultivo líquido o sólido.

6.º *Desarrollo aerobio y anaerobio.*

Como quiera que para los pocos gérmenes que, relativamente contienen las gotitas del microcultivo es mucho el aire presente en la celdilla del portaobjetos excavado, tan sólo prosperan los microorganismos aerobios. Por si se precisa una dosis de aire todavía mayor, como ocurre para la esporogénesis normal de los mohos, hongos que consumen mucho oxígeno, sólo se rodea de

vaselina a tres de los lados del cubreobjetos, y para prevenir la desecación se introduce el conjunto en una pequeña cámara húmeda, por ejemplo en una placa de Petri, con algodón mojado. Esta placa de Petri se ocluye con plastilina. Antes de su examen microscópico se han de obturar por completo todos los lados del cubreobjetos con vaselina.

Para el microcultivo de gérmenes anaerobios se dispone en el fondo de la celdilla del portaobjetos excavado, una gotita de mosto de cerveza u otro medio de cultivo o de agar nutritivo corriente, con microorganismos ávidos de oxígeno, como los mohos o el *Bact. prodigiosum* o *subtilis*, con lo cual dicha excavación pronto queda del todo exenta de oxígeno. De esta manera he-mo conseguido cosechas frondosas de los gérmenes de las fermentaciones anaerobias, butírica o propiónica, o puede disponerse algo de pirogalol o hidrato potásico corriente para absorber el oxígeno o cultivarse en cámara de vacío.

7.º Proliferación rápida o lenta.

Cuando el desarrollo es muy rápido, siendo favorables las circunstancias (temperatura, nutrición, siembra de escaso número de gérmenes, reacción adecuada), transcurridas las veinticuatro horas, las gotitas o trazos del microcultivo están repletas de los microorganismos de proliferación rápida: coli, proteus, etc., mientras que otros gérmenes, como las bacterias lactacidógenas, en dicho plazo sólo han proliferado muy poco. En los cultivos adecuados, los gérmenes que proliferan con rapidez, con facilidad reprimen a los de lento desarrollo, y utilizando además los factores nutritivos más adecuados para los microorganismos que se desea enriquecer, así como temperaturas favorables para unos y desfavorables para otros y, eventualmente, factores bacteriostáticos, pueden fácilmente en pocos pases de un microcultivo a otro aislarse las especies que se buscan, si están presentes.

8.º Desarrollo de colonias y demás conjuntos microbianos.

Muchas especies, por ejemplo el *Streptobacterium*, streptococcus, micoides, subtilis, proteus, microdermas, etc., constituyen cadenas, es decir, cuando sus elementos se dividen, continúan reunidos en series más o menos largas, pudiendo formar colonias y conglomerados de las más variadas formas. Por el contrario, otras especies, al dividirse, separan sus elementos, como ocurre en muchas ramas del *streptococcus fecalis* o *lactis* (diplococos), de suerte que sólo están reunidos los gérmenes en plena división. En este caso la distribución por el medio de cultivo es en forma difusa u homogénea. El adosamiento ínti-

mo por las superficies laterales de los gérmenes, revela que es viscosa su pared, constituyéndose las denominadas *pilas de monedas*: grupos proteo y fluorescente, etc. Si estos conjuntos microbianos se observan por su diminuto extremo, tienen el aspecto de cocos dispuestos con regularidad. Si el moco es muy viscoso (*lactis aerogenes*), se forman microcolonias muy tupidas, las cuales, no obstante contener muchos elementos microbianos, vistas con suficiente aumento, a menudo todavía muestran sus gérmenes su contorno diplocócico primitivo. Si los gérmenes dispuestos en forma pulverulenta proliferan en la superficie superior o inferior de las gotitas del microcultivo, ofrecen el aspecto de revestimiento uniforme de una pared. En tal caso se ha constituido un velo, pero, como es natural, precisa que el microorganismo sea aerobio, por ejemplo, las bacterias acéticas y los mohos. De ellos es característico que los mohos, etcétera son muy refringentes por estar, en general, rodeados de una capa de aire. Muchas especies de los *aerinomices*, además de la monilia, *sachsia*, todos los mohos, al desarrollarse sobresalen de modo típico del borde de las gotitas del microcultivo.

9.º *Capacidad mucípara.*

Los gérmenes que no producen moco, están en contacto, es decir, se adosan íntimamente. Estas especies microbianas en el centro de las gotitas del microcultivo muestran acusado movimiento browniano. Si el poder mucíparo es escaso, los gérmenes están poco separados entre sí, y si la producción de moco es abundante, dicha separación es grande, en grado mayor o menor. Si el moco es laxo se aprecia un movimiento browniano moderado, pero si el moco es coherente, dicho movimiento cesa por completo. Se ha comprobado que la capacidad mucípara a menudo difiere mucho con la misma especie bacteriana y líquido de cultivo. En los cultivos mixtos se comprueba con suma facilidad que las bacterias mucíparas mantienen separados a los gérmenes concurrentes gracias a su secreción mucosa.

10. *Movimiento browniano.*

Cuanto menores son los gérmenes, tanto más activo es su movimiento browniano, o sea, atracción y repulsión en uno u otro sentido, movimiento que sólo falta, como puede comprenderse, en el borde de las gotitas del microcultivo. Si las paredes microbianas son viscosas o si los organismos son mucíparos, asimismo a menudo falta el movimiento browniano. Por otra parte, en las superficies superior e inferior de dichas gotitas, puede faltar el movimiento browniano de los microorganismos.

11. *Movilidad.*

Si los gérmenes presentes en gotitas de cultivo son móviles, queda excluída su pertenencia a las bacterias lactacidógenas, *al Bact. aerogenes* y a numerosas especies de cocos, mientras que, por el contrario, son móviles, por ejemplo, *el Bact. coli, subtilis, mycoides y megatherium* y otros. La movilidad puede ser lenta (*megatherium*), muy rápida (*proteus fluorescens*), giratoria o recta, todo lo cual depende de la disposición de los flagelos. Los gérmenes flagelados ávidos de oxígeno se coleccionan muy pronto en el borde y superficie de las gotitas de los microcultivos. Muchas especies de microorganismos pululan alrededor de particulitas de albúmina, glóbulos de grasa o de elementos de levaduras, mohos y de algas. Las especies susceptibles a la acidez rehuyen a las colonias de los gérmenes acidógenos. Se comprende, sin más, la ventaja que disfrutaban los microorganismos flagelados sobre este particular.

12. *Tamaño de los gérmenes.*

Cuanto menores sean, tanto más se aproximan al tenue borde de la gotita del microcultivo, mientras que los microorganismos grandes permanecen fijos en la delgada capa de gotitas del microcultivo y se prestan mucho a su medición, dibujo y fotografía.

13. *Mutabilidad.*

En una misma gotita o trazo del microcultivo, muchas de las especies desarrolladas en cultivo puro, muestran microcolonias muy dispares, pudiendo diferir tanto por el tamaño y forma como por el contenido celular, esporogenia y por la producción de moco, pudiendo depender estas mutaciones de toda suerte de circunstancias, por ejemplo, de la cantidad de microorganismos sembrados, la índole del medio de cultivo y de la temperatura y predisposición del germen.

14. *Microorganismos hipertróficos y gérmenes esferoides.*

Muchas especies bacterianas, por ejemplo las lácticas *bulgaricum*, las bacterias acéticas, muestran a menudo con gran regularidad elementos muy alargados (incluso los gérmenes del grupo *coli*) o hinchados, y los gérmenes esferoides son de observación frecuente en los microorganismos de microcultivos esporulados. En ocasiones hay colonias constituídas exclusivamente por elementos microbianos anormales (herencia, involución).

15. *Poder esporógeno.*

Por lo común, los gérmenes esporulados, pronto o tarde desarrollan esporas en las gotitas de los microcultivos, a condición de que las circunstancias sean propicias (30 a 40° C, medio de cultivo líquido apropiado, escasez de medios nutritivos, etc.). La esporogénesis a menudo se observa primero en las inmediaciones del borde de las gotitas de cultivo. Muchas veces se comprueba que los gérmenes móviles se inmovilizan tras de la esporogénesis, además se observa bien la forma, tamaño y topografía de las esporas, el plazo que transcurre hasta que se liberan éstas, es decir, la desaparición del elemento celular madre, y, por último, la índole de la germinación. En los cultivos puros se puede comprobar la mutabilidad eventual de estos caracteres. La presencia de gérmenes esporulados se descubre fácilmente, calentando diez minutos a 80° C la mezcla del medio de cultivo y el inóculo, antes de practicar los trazos. Muere la forma vegetativa y sólo puede proliferar el esporo.

16. *Refringencia.*

Muchas especies microbianas poseen un marcado poder de refringencia, y por ella pueden sacarse varias conclusiones, incluso a veces su carácter de ser gram negativas o positivas.

17. *Volutina y granulaciones metacromáticas.*

Este producto de reserva se suele reconocer con facilidad, por constituir gránulos algo menos refringentes que la grasa. Es abundante en bacterias lácticas, especialmente *Bact. bulgaricum*, acidófilo y otros. Su presencia puede confirmarse por el color rojo que confiere la adición de azul de Loeffler a las gotitas desecadas y fijadas del microcultivo.

18. *Grasa.*

En presencia de azúcar o de grasa, los microcultivos de muchas especies bacterianas muestran precozmente mucha grasa en su seno, rasgo muy típico del grupo *mycoïdes* y *megatherium*, lo propio que todos los gérmenes que encienden las grasas. Se confirma este carácter poniendo una gotita de solución de ácido ósmico en la celdilla del portaobjetos excavado del microcultivo o agregando solución de Sudán III al medio de cultivo.

19. *Acidificación.*

La acidificación se reconoce con facilidad en las gotitas de leche por la floculación de la caseína, cesando el movimiento browniano de los corpuscúlitos de caseína y de las bacterias. Los microorganismos que disuelven la albúmina, no rara vez producen una aureola clara a expensas de la caseína coagulada que las rodea. En microcultivos de leche tornasolada, producen: coagulación, reducción, coloración roja del tornasol, según la acidez y tipo de bacterias y leche o caldos con azul de bromotimol o púrpura de bromocresol, dan las coloraciones correspondientes al modificarse el pH.

20. *Proteolisis.*

Muchas especies microbianas aclaran con rapidez a las gotitas de los microcultivos dotados de caseína, lo cual se reconoce en las gotitas de leche por la desaparición completa de los tenues coagúlitos de caseína. La albúmina de las células de levadura autolizadas agregadas se disuelven en presencia de los microorganismos proteolíticos (proteus, mohos), persistiendo tan sólo las membranas celulares. Muchos gérmenes lipolíticos (presentes en las grasas rancias y productos afines) también disuelven con tanta rapidez a la envoltura albuminoidea como al contenido de los glóbulos de la manteca de la leche. (Véase el apartado 21.)

21. *Lipólisis.*

El desdoblamiento de la grasa se puede demostrar muy fácilmente en los microcultivos a base de leche pura. Conviene emplear leche pura diluída al 1 : 2 con agua o caldo lactosado esterilizado y algo de grasa. Los gérmenes con gran poder lipolítico, ya han desintegrado los glóbulos de la manteca de la leche a las veinticuatro horas; los microorganismos con escaso poder desdoblador de las grasas tardan unos días o semanas. A menudo se registran grandes diferencias en el aspecto de los glóbulos de manteca más o menos desintegrados que forman cristales pequeños o grandes. Algunas veces, en vez de los glóbulos de manteca, se encuentran cristales aciculares muy largos (ácidos grasos superiores), otros sobreviene una disolución uniforme y lenta. El revestimiento albuminoideo de los glóbulos de manteca, en determinadas circunstancias, persiste mucho tiempo (véase el apartado 20). Todo ello depende de la especie del microorganismo, y con seguridad, en parte también de la clase de gotitas de grasas. Con toda certeza se puede demostrar que unos glóbulos de manteca tienen el revestimiento arrugado, a veces incluso su conte-

nido está tabicado. Si las bacterias segregan colorantes liposolubles, se tiñen los glóbulos de manteca, por ejemplo de rojo, por la acción del *Bat. prodigiosum*, de azul por efecto del *syncyaneum*. Para la mayoría de los microorganismos con gran poder lipolítico, es muy típica la degeneración adiposa precoz de las células, por ejemplo, por ciertas levaduras: *Dematium*, *Monilia*, *Penicillium*, etc. (Véase el apartado 18.) Los glóbulos de manteca de la leche, con suma frecuencia confluyen o bien se reúnen y deshacen. Esto último parece depender, sobre todo, de la presencia de gérmenes alcalinizantes. Si hay gérmenes productores de moco, cesa el movimiento browiano de los glóbulos de manteca más pequeños.

A este propósito, procede recordar que también se puede demostrar con facilidad el poder lipolítico de los gérmenes, lo propio que la presencia de microorganismos lipolíticos o ácido proteolíticos, por medio de placas de Petri con agar, azul China y grasa. Una pequeña cantidad de mantequilla se funde y mezcla con el germen o materia problema y con el agua de agar con azul de China, y se vierte en la placa de Petri. Los microorganismos lipolíticos desarrollan colonias azules o producen manchas azules. En muchos casos, la producción alcalina hace que desaparecen al color azul.

22. *Amilolisis.*

Los microcultivos con almidón revelan el poder amilolítico de los gérmenes, porque, poniendo una gotita de solución de yodo en la cavidad del portaobjetos excavado, una vez que se han desarrollado los microorganismos, el medio de cultivo líquido ya no se tiñe de azul porque el almidón se ha convertido en azúcar. Asimismo, agregando gránulos de almidón obtenidos asépticamente del interior de la patata, en muchos casos se logra demostrar la corrosión producida en los mismos por el poder amilolítico.

23. *Disolución de las membranas celulares.*

En los cultivos de gérmenes esporógenos siempre se comprueba que la membrana de la célula madre se disuelve con mayor o menor rapidez. En presencia del *Bact. vulgare (proteus)* o de mohos, la membrana celular de las células de levadura aportadas desaparece pronto y por completo.

24. *Muerte de los microorganismos.*

Los elementos de ciertas especies de microorganismos mueren muy pronto en relación con el medio de cultivo líquido, la acidificación, temperatura ele-

vada, cantidad de gérmenes sembrados, el hambre y por la presencia de otros microorganismos. El aspecto de los microorganismos casi o totalmente muertos se puede comparar con el de los elementos vivos, depositando en la cavidad del portaobjetos excavado un asa pequeña de cloroformo, folmaldehído, solución de yodo, etc. De esta manera se demuestra además con facilidad la toxicidad de muchas sustancias.

25. *Autolisis.*

Es frecuente el hallazgo de gérmenes vacíos junto a otros llenos. Cuanto más abundan las enzimas proteolíticas en los microorganismos, con tanta mayor rapidez se vaciarán, más o menos por completo, los elementos microbianos muertos.

26. *Bacteriófagos.*

No rara vez se disuelven por completo a los pocos días las bacterias de los microcultivos, a menudo en determinadas colonias de las mismas que se vuelven transparentes y con inoculación de diluciones hechas con los cultivos y medios para bacteriófagos y sus filtrados, pueden repetirse las experiencias.

De cuanto precede se deduce que el método de los microcultivos, para los estudios de morfología en vivo, y de la fisiología de los microorganismos es, creemos, imprescindible y aplicable no sólo en los análisis microbiológicos industriales, donde nació, como tantos métodos de investigación microbiológica poco o nada conocidos por la microbiología médica, sino en muchos campos de ésta, especialmente en el estudio de la flora del canal digestivo.

MICROORGANISMOS QUE PUEDEN SER HALLADOS EN EL CANAL DIGESTIVO HUMANO O ANIMAL

BACTERIAS LÁCTICAS VERDADERAS:

(Producen fermentación láctica de todos los derivados de la leche, y en parte actúan sobre sus proteínas y sobre la glucosa y la maltosa del canal digestivo.)

Streptococcus lactis, cremoris, thermophilus, faecium, fecalis, etc.

Tetracoccus o micrococcus lactis:

(Producen acción ácidoproteolítica.)

Thermobacterium, plocamobacterium o lactobacillus:

Thermob. lactis.

- » bulgaricum.
- » yoghourti.
- » helveticum (casei).

Therb. intestinale (acidophilus).

- » thermophilus.

Betabacterium (Heterofermentativos):

Betb. breve (Bact. casei).

- » longum (Bact. casei).
- » caucasicum (kefir).
- » bifidum.

Microbacterium.

Microbact.: Lactis (resiste 85° C - Colonias «pint-point»).

- » flavum.
- » mesentericum (resiste a los 70° C).
- » Liquefaciens.

OTROS MICROORGANISMOS:

*Espirilos.**Saccharomices.**Torulas.**Mycoderma.**Mycoderma moniliforme.**Mycotorula.**Oidium lactis.**Oidium casei.*

MICROORGANISMOS GASOGENICOS.

Esch.: coli.

Aerob.: aerogenes.

Bacil.: buthyricus.

- » amylobacter.
- » butylicus.
- » perfringens.

Clostr.: Welchii.

- » putridus.
- » bifermentans.
- » polymixa.

Saccharomyces.
Torulas torulopsis, etc.

PRODUCTORES DE PROTEOLISIS Y ALCALÍGENOS:

Aerobios.

Bacterias fæcales alcaligenes.

Bacillus subtilis.

- » proteus.
- » mesentericus.
- » cereus.
- » micoides.
- » megaterium.
- » *macerans.*
- » peptógenes.
- » novus.
- » proteoliticum.
- » fluorescens.
- » alcaligenes fæcalis.

Anaerobios.

Clostridium foetidum.

Clostridium foetidum.

Bac. putridus.

Bac. punctatum.

Clost. botulinum.

LIPOLÍTICOS.

B. fluorescens.

B. putridum.

B. punctatus.

B. vulgare.

B. mycoides.

B. lipolyticum.

B. prodigiosum.

B. mesentericus.

B. subtilis.

B. piocaneum.

B. lactis viscosum.

Corynebacterium.

Oospora.

Torulopsis.

Fusarium.

PRODUCTORES DE LAB: QUIMOSINA Y COAGULADO DULCE.

Micrococcus.
Corynebacterium.
E. coli.
A. aerogenes y otros.
Actinomyces.

MICROORGANISMOS CROMOGÉNICOS.

Bact. prodigiosum (serratia marcesen).
» eritrogenes.
» rodensis.
Micr. roseus.
» auranticus.
» auranticus.
» flavus.
Sarcina rosea.
Torula rubra.
Oospora aurantium.
Bact. syncianum.
Bact. syncyanum.
Psd. fluorescens (verde).
Corynebact. bruneum.
Aspergillus niger.

MICROORGANISMOS MUCIDÓGENOS.

Micrococcus lactis viscosus.
» mucofaciens.
» betacoccus o Leuconostoc mesenteroides.
Bact. lactis longi.
» » viscosum.
» » aerogenes viscosi.
» » alcaligenes.

GRUPOS DE MICROORGANISMOS ALCOHOLOGENICOS, ACETOGENICOS,
BUTILOGENICOS, FORMADORES DE ALDEHIDOS, FERMENTACIONES
CARBONICAS Y OTRAS

MICROORGANISMOS TERMO-RESISTENTES.

Micr. lactis acidi (resiste 80-90°).

MICROORGANISMOS PSICROFILOS. (Crecen a temperaturas entre 0-5° C)

Ps. fluorescens.

Bact. punctatum.

Bact. herbicola aureum.

MICROORGANISMOS PATOGENICOS TRANSFORMADORES DE LA CETULOSA
Y DE LA PECTINA.

Clostr. Ellembergeri.

» Zuntzii.

» metanigenes.

» pectinovorum.

EXAMEN DE LOS CULTIVOS Y SU ESTUDIO FILOLOGICO

EXAMEN MACRO Y MICROSCÓPICO DE LOS CULTIVOS.

en medios líquidos

en medios sólidos

EXAMEN BIOQUÍMICO FUNCIONAL DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE:

Producción del pigmento.

*Desintegración de las proteínas y de sus productos, de los compuestos
nitrogenados inorgánicos y de los glucósidos por:*

Reacción de biuret.

Titulación por el formol de las proteínas.

Indagación de la presencia de los ácidos aminados, proteasas y peptonas.

Investigación de la presencia del amoníaco.

Investigación del fenol.

Hidrolisis del hipurato sódico.

Desarrollo e investigación del hidrógeno sulfurado.

Investigación de las hemolisinas.

Reducción de nitratos.

Pruebas de fermentación de glúcidos y alcoholes.

MEDIOS DE CULTIVO PARA LOS DIFERENTES GRUPOS DE MICRO-ORGANISMOS CUYO ESTUDIO O AISLAMIENTO PUEDE INTERESAR

PARA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO MICROBIANO GLOBAL APROXIMADO:

Agar o caldos nutritivos de varios tipos, e incubando a diferentes temperaturas en condiciones aeróbias y anaeróbias. Agar universal a base de caldo peptonizado, suero, caseína trípica y mosto de cerveza a pH de 4,5 a 7,5 y cultivado a diferentes temperaturas.

PARA BACTERIAS LÁCTICAS O LACTOACIDÓGENAS:

Leche natural desnatada tinalizada, más extracto de levaduras.

Suero lácteo con proteínas y desproteínizado con peptona o extracto de levaduras.

Suero con mosto de cerveza y levadura autolizada y zumo de tomate, mosto de cerveza con suero triptinado.

Agar sobre base de los caldos nutritivos usuales o de lactosa simple.

Como indicadores: Púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, etc.

Agar Rosell selectivo a base de suero lácteo y caseína tripsinados más hidrolizados y autolizados de levadura, conteniendo los aminoácidos y vitaminas que requieren las bacterias lácticas, en dichos componentes.

Agar lactosa azul de China.

MEDIOS DE CULTIVO PARA INVESTIGAR LOS GÉRMESES DE LAS TRIBUS «ESCHERICHIA» Y «SALMONELLA». Entre otros:

Medio de lactosa bilis y rojo de de genciana.

» » » » y verde brillante.

» » » » y verde malaquita.

» » » » y de Mac Conkey.

» » » » y con formiato sódico.

» » » » y de Kauffman.

Agar Endo.

Agar con eosina y azul de metileno.

Agar de Gassner.

Agar tripaflavina.

Otros medios selectivos varios para el «Escherichia coli».

Medios para el recuento y aislar gérmenes proteolíticos, lipolíticos, propiónicos, aerobios, anaerobios, gasogénicos, productores de lab, de fermentacio-

nes varias, etc., para hongos: levaduras, monilias, torulas, oidios, hifomicetos, etc.

MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS Y HONGOS:

Medio de cultivo de Raulin.

» » » » mosto de cerveza.

Agua de levadura.

Cocimiento de levadura.

Medio de cultivo de agua de patata.

» » » » Sabouraud.

» » » » Gorodkowa.

» » » » patata y zanahoria con láminas de agar.

» » » » Santon.

Agar para determinar la elección de productos químicos.

Medio de cultivo de Rao y Subrahmanyán.

» » » » Czapek.

Agar sintético dextrosado y sacarosado.

Agar Jensen.

Medio de cultivo de zanahorias.

INFLUENCIA DE LA PENICILINA EN LA ACCION DE LA RIBONUCLEASA

B. Regueiro Varela

Gran interés ofrece el estudio de las nucleoproteínas y de sus componentes, los ácidos nucleicos, en el metabolismo de los seres vivos. A pesar de esto, poco es todavía lo estudiado con referencia a su influencia en la vida bacteriana.

Es sabido que las bacterias tienen gran cantidad de ácidos nucleicos; así Belozerski (1947) encuentra que en el *Staphilococcus albus* constituye el 17,4 por 100 del peso del germen desecado, en el *Pseudomonas pyocianea* es el 21,6 por 100 y en el *Escherichia coli* es de 22,43 por 100 a las cinco horas y de 9,66 por 100 a las cuarenta y ocho horas.

Había demostrado Spiegelman (1946) que las células que no sintetizan proteínas en su metabolismo, no transfieren fosfato de su porción nucleoproteica, es decir, que la síntesis de proteínas en la célula va paralela a la transferencia de fosfatos de las nucleoproteínas, demostrando además que, agentes que inhiben la formación de enzimas y proteínas, impiden a su vez todo cambio del fósforo de las nucleoproteínas.

Es interesante, pues, conocer la acción que ciertos cuerpos tienen sobre los enzimas, conociendo que muchos de ellos derivan de los ácidos nucleicos; asimismo, y por esta razón, interesa conocer también la acción que ejercen dichos cuerpos sobre el ácido nucleico. De éstos, el más estudiado es ácido ribonucleico (ARN).

Panijel (1948) observó que la tirotricina actúa sobre el aparato de síntesis del ARN en los gérmenes Gram positivos y Cohen (1946) ve que la estreptomycinina se une al ARN, formando compuestos polimerizados.

En relación con la penicilina, ya Chain y Duthie (1945) creían que su acción se debía a interferir una función metabólica de las primeras fases de crecimiento de los gérmenes.

Kun (1948) observa que la penicilina bruta contiene un factor que inhibe la glicosis «in vitro» y Krampitz con Werkman (1947) observan un factor

que inhibe la dismutación del ácido pirúvico. Estos mismos autores observan que la penicilina interfiere la dismutación del ARN, suponiendo que esto impide la asimilación de ribosa por la bacteria.

El ARN es roto por un enzima específico, la «ribonucleasa», la cual fué cristalizada por Kunitz (1940) a partir del páncreas, asignándole un peso molecular de 15.000.

Muchos autores han estudiado la acción de este enzima sobre el ARN y medido ésta, así Allen y Eilen (1941) ven que esta acción aumenta la acidez de una solución Buffer de ARN y RNNa.

Dubos y Thompson (1938) estudian la digestión del ARN por el enzima, precipitando el ácido no digerido por ClH N/5 y determinando el fósforo del líquido que corresponde al ARN digerido. En este líquido, según Loring y Carpenter (1943), se encuentran mononucleótidos, pero no el fósforo libre.

McFadyen (1943) precipita el ARN no digerido por una solución de sal de uranio en ácido tricloracético, y Woodward (1944), estudiando estas dos clases de precipitaciones, ve que el clorhídrico precipita más que la sal de uranio, sugiriendo que el fósforo no precipitado por ClH, sería de tetranucleótidos y mononucleótidos mientras que el de sal de uranio sería sólo de mononucleótidos.

Bain y Rusch (1944) determinan la acción de la ribonucleasa por un método manométrico en el que al liberarse los grupos ácidos del ARN, éstos se unen a un buffer de carbonato que libera a su vez anhídrido carbónico, que se mide en el aparato de Warburg.

Siguiendo lo expuesto, algunos autores estudiaron la acción de la penicilina sobre la actividad de la ribonucleasa y los resultados se muestran contradictorios, pues Massart, Peeters y Vanhoucke (1947) dicen que aquélla inhibe su acción sobre el ARN, empleando en su experimento elevadas concentraciones de antibiótico; por el contrario, Gros, Ryback, Macheboeuf y Rambeck (1948), usando métodos más específicos, no encontraron tal acción a concentraciones de 330-5.940 unidades por 0,05 mgr. de enzima.

Henry y Stacey (1943) y Bartholomew con Umbreit (1944) han observado que la propiedad de colorearse los gérmenes Gram positivos se debía al ribonucleato de magnesio unido a una proteína. Asimismo, Tulasne y Vendrely (1947) dicen que en los cultivos viejos la ribonucleasa ha destruido el ARN de las bacterias, habiendo suprimido por esto su afinidad por los colorantes básicos. Al mismo tiempo, Frieden y Frazier (1974) observan que la penicilina actúa más sobre los gérmenes Gram positivos, y sugerían el comprobar su acción sobre la ribonucleasa y ver la influencia del magnesio en este fenómeno.

Basados en todos estos trabajos hemos empezado por ver la acción que podría tener la penicilina G y la penicilina cruda sobre la ribonucleasa cristalina de páncreas actuando sobre la sal magnésica del ARN.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES.—La *penicilina* empleada es una sal amónica con más del 90 por 100 de penicilina G y con 1650 U. O./mgr., la cruda es una penicilina con 500 U. O./mgr.; de ambas se preparan soluciones apropiadas.

Se emplea un *ribonucleato de magnesio*, de la casa «Schwartz», del que se hace una solución de 5 mgr. por c. c. en agua destilada a pH 6,2. Aparte de lo dicho en la parte teórica, es mejor emplear una sal del ARN, porque éstas generalmente, según dice Zitle (1945), no contienen casi mononucleótidos, que pueden interferir la acción del enzima.

El enzima *ribonucleasa* es uno preparado por Kunitz, cedido por el doctor Potter, a quien agradecemos su generosidad.

ENSAYOS.—Los ensayos se hacen colocando cantidades de enzima con penicilina e incubando por veinte minutos a temperatura ambiente, a continuación se añade el ribonucleato de magnesio (RNMg) y se coloca en un baño a 37° durante un cierto tiempo; a continuación se hace una precipitación con el mismo volumen de ácido clorhídrico N/5, dejándole treinta minutos en nevera, o con reactivo de uranio (1,25 grs. de acetato de uranio en 100 c. c. de ácido tricloroacético al 10 por 100) y abandona treinta minutos a 35°.

Se centrifuga, y en el líquido se hacen determinaciones de fósforo total, fósforo inorgánico, nitrógeno amonio y nitrógeno total.

Fósforo total.—Después de previa digestión con sulfúrico y selenito de cobre, se añade una cantidad de molibdato y de reactivo Na-1-naftol-2 amino-4-sulfonato con hiposulfito y sulfito sódico, y entonces se observa al colorímetro de Evelyn, comparando con un «standard» y control.

Fósforo inorgánico.—Lo mismo, sin previa digestión.

Nitrógeno total.—Previa digestión, como en el caso del fósforo total, se añade reactivo de Nessler y NaOH 2N y observa al colorímetro Evelyn con «standard» y control.

Nitrógeno amonio.—Lo mismo, pero sin digestión previa.

Previos análisis del ribonucleato de magnesio, nos dan los siguientes resultados:

	N. amonio	N. total	P. inorg.	P. total
RNMg	0,4	16	0,4	10
RNMg (pp. por ClH)	0,2	8	—	4,6
RNMg (pp. por uranio)	1,5	3,2	—	1,3

mg. %

Estos resultados están de acuerdo con los resultados teóricos.

Acerca del tiempo de digestión obtenemos, de acuerdo con Greenstein, Carter y Chalkley (1947), que éste es, aproximadamente, de una hora, después de la cual no hay digestión apreciable; el pH tampoco influye entre 6,8 a 7,8. Nosotros hacemos el ensayo por digestión durante dos horas a 37° y pH óptimo.

Verificamos ahora un ensayo para ver las cantidades óptimas de enzima a emplear, con los siguientes resultados:

	NH ₂	N.	P. inorg.	P.	NH ₂	N.	P. inorg.	P.
5 mgr. RNMg a 5 c. c. con agua dest.....	0,6	8,4	—	2	0,4	7,6	—	4,8
5 » » con 0,005 mgr. enzima	0,4	10,5	—	6	—	12	—	8,8
5 » » » 0,01 » »	0,4	8,8	—	6	—	12	—	8,4
5 » » » 0,015 » »	1,2	10	—	6,4	0,6	12	—	7,6
5 » » » 0,02 » »	1,6	10,6	—	6,4	1,2	12	—	8
	pp. por Uranio				pp. por ClH			

mg. %.

Obtenemos que para 5 mgr. de RNMg la cantidad óptima de enzima es de 0,02 mgrs. Conocidas, pues, todas las óptimas condiciones de la prueba verificamos los siguientes ensayos.

EXPERIENCIAS CON PENICILINA CRUDA.—Se verifican algunas experiencias para ver la influencia de esta penicilina y, si esto se debe al contenido en penicilina de la muestra o a otras sustancias que contiene. Para esto se hace una primera prueba en que se hace una precipitación por clorhídrico y una incubación de la penicilina con el enzima, o con el RNMg; asimismo se prueba con penicilina cruda que se ha calentado a 100° para destruir la actividad de penicilina; los resultados son:

	5 mg. RNMg.	5 mg. RNMg. 0,02 mg. enzima.	5 mg. RNMg. 0,02 mg. enzima. 500 U. O.	5 mg. RNMg. 0,02 mg. enzima. 500 U. O. (100°)
Incubación con enzima	4,8	7,4	5,6	5,6
Incubación con RNMg	4,8	7,6	6,2	5,6

mg. P. %.

En la prueba de precipitación por sal de uranio se obtienen los resultados siguientes:

	NH ₂	N.	P. inorg.	P.
5 mgr. RNMg	1	2,6	0,2	1
5 » con 1.000 unidades	5,4	10	1	2,6
5 » con 2.000 unidades	7,6	12,6	1,2	2,2
5 » con 0,02 mgr. enzima	1,4	9,4	2,2	5,6
5 » con 0,02 y 1.000 unidades	4,8	11	6,4	3
5 » con 0,02 y 2.000 unidades	7,4	13	8,2	3

mgr. %

En la prueba precipitando con clorhídrico, se obtiene lo siguiente:

	NH ₂	N.	P. inorg.	P.
5 mgr. RNMg	0,2	6,6	—	5,4
5 » con 0,01 mgr. enzima	—	10,8	—	9,2
5 » con 0,01 y 500 unidades (1 mg.)	1,8	11,6	—	6,4
5 » con 0,01 y 300 unidades (0,6)	0,8	13,2	—	7,8
5 » con 0,01 y 100 unidades (0,2)	0,4	10,8	—	9,2

mgr. %

EXPERIENCIAS CON PENICILINA G.—En previos experimentos se ve que no hay variación según se incube con el enzima o con el ribonucleato.

Otra prueba que se hace es ver la variación de pH y penicilina durante la digestión para ver si la acción es sensiblemente igual; para esto se incuban dos matraces:

A : 50 mgr. RNMg, 0,2 mgr. enzima y a 50 c. c. agua.

B : 50 mgr. RNMg, 0,2 mgr. enzima y 100.000 U.. O. penicilina G.

Se ponen en las mismas condiciones que experiencias anteriores y determina el pH y penicilina a intervalos de tiempo, dando: :

A: →	5,9	6	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
pH:								
B: →	5,5	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
A: →	—	—	—	—	—	—	—	—
Penicilina U.O./c.c.								
B: →	1.280	1.280	1.280	1.280	1.160	1.160	1.120	1.120
	—	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2

horas

En las determinaciones de esta prueba resultan los siguientes números:

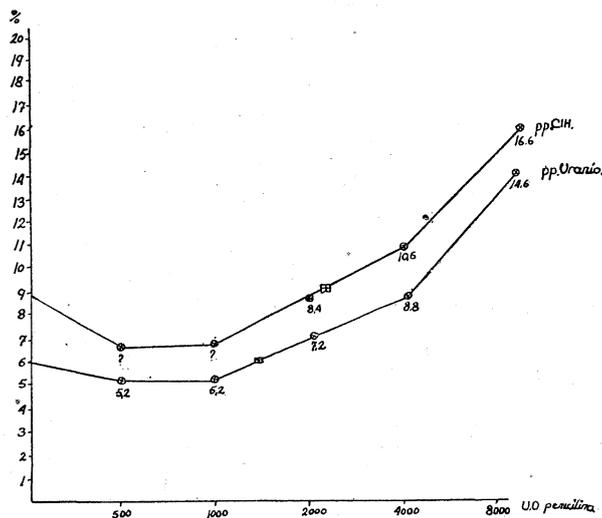
	NH ₂	N.	P. inorg.	P.
5 Mgr. RNMg	1	2,6	0,2	1
5 » 1.000 U. de G.	2,2	4,8	0,6	1
5 » 2.000 U. de G.	3,4	6	0,2	1,2
5 » 0,02 mgr. enzima	1,4	9,4	2,2	5,6
5 » 0,02 mgr. 1.000 U.	2	12,4	2	6,8
5 » 0,02 mgr. 2.000 U.	3,4	—	2,4	10,8

mgr. %

Otros resultados comparativos obtenidos son los siguientes:

	pp. por Uranio			pp. ClH.		pp. Acético	
	N.	P.	PP. (mgr.)	N.	P.	N.	P.
8,8 mgr. RNMg	1,6	0,8	14,8	5,2	9,4	28,5	9
8,8 » 0,03 mgr. enzima	8,4	5,8	9,6	7,6	14,8	44	13
8,8 » 0,03 mgr. 1.000 U.	9,4	6,2	10,5	6,8	14,8	48	11,5
8,8 » 0,03 mgr. 2.000 U.	11,2	6,2	11,6	5,6	18,4	60	14
8,8 » 0,03 mgr. 500 U. cruda.	4,2	1,2	17,6	6,4	10,8	37	10

El efecto por cantidades crecientes de penicilina G es el que dan las curvas siguientes, verificadas en las mismas condiciones que experiencias anteriores:



Las cantidades de fósforo para el RNMg (5 mgr.) es en el caso de pp. por uranio 1,4 mgr. por 100, y en el caso del clorhídrico, de 7,6 mgr. por 100.

Las cantidades colocadas para la curva son: 5 mgr. RNMg con 0,02 mgr. de enzima ribonucleasa y cantidades variables de penicilina.

CONCLUSIONES

1.^a En las condiciones que se verifican los ensayos, la proporción óptima que encontramos de ribonucleasa a ribonucleato de magnesio es de 1 a 250.

2.^a Durante el período de digestión, solamente hay una pérdida de 12,5 por 100 de penicilina y no varía el pH.

3.^a La penicilina bruta tiene una acción inhibitoria de la ribonucleasa, esta acción se demuestra que no es debida a la penicilina que contiene, y desaparece por bajo de 0,2 mgr. por 0,01 de enzima y 5 de substrato.

4.^a La penicilina G tiene una ligera acción estimulante de la ribonucleasa.

5.^a La acción de la penicilina G comienza a ser estimulante desde las 1.000 U. O. por 0,02 mgr. de enzima y 5 mgr. de substrato; antes de dicha cantidad es ligeramente inhibitoria.

BIBLIOGRAFIA

- BELOZERSKI.—*Cold Spring Harbor Symposium*, XII, 1 (1947).
SPIEGELMAN.—*Cold Spring Harbor Symposium*, XI, 256 (1946).
PANIGEL.—*Comptes Rendus Acad. Sciences*. 226, 2023 (1948).
COHEN.—*J. Biol. Chem.* 166, 933 (1946).
KUN.—*Science*. 108, 117 (1948).
KRAMPITZ, WERKMAN.—*Arch. Biochem.* 12, 57 (1947).
CHAIN, DUTHIE.—*Lancet*. 248, 652 (1945).
KUNITZ.—*J. Gen. Physiol.* 24, 15 (1940).
ALLEN, EILEN.—*J. Biol. Chem.* 137, 757 (1941).
DUBOS, THOMPSON.—*J. Biol. Chem.* 124, 501 (1938).
LORING, CARPENTER.—*J. Biol. Chem.* 150, 381 (1943).
GREENSTEIN, CARTER, CHALKEY.—*Cold Spring Harbor Symposium*. XII, 64 (1947).
BAIN, RUSCH.—*J. Biol. Chem.* 153, 659 (1944).
McFADYEN.—*J. Biol. Chem.* 107, 297 (1934).
WOODWARD.—*J. Biol. Chem.* 156, 143 (1944).
MASSART, PREETERS, VANHOUCKE.—*Experientia*, III, 494 (1947).
GROS, RYBACK, MACHBOEUF, RAMBECK.—*C. R. Acad. Sc.* 226, 1550 (1948).
TULASNE, VENDRELY.—*Nature*. 160, 225 (1947).
FRIEDEN, FRAZIER.—*Arch. Biochem.* 15, 265 (1947).
HENRY, STACEY.—*Nature*. 151, 671 (1943).
BARTHOLOMEW, UMBREIT.—*J. Bacteriol.* 48, 567 (1944).
ZITTE.—*J. B. C.* 160, 520 (1945).

LAS BACTERIAS SIMBIOTICAS DEL NITROGENO BAJO EL MICROSCOPIO ELECTRONICO

G. Palacios-de-Borao, S. J.

Considerando el campo de la Microbiología tal como se nos presenta a la luz de las investigaciones realizadas en estos últimos años en Microbioquímica y en la técnica de la Microscopía Electrónica, nos atreveríamos a decir que habremos de realizar sin demora en la coyuntura de tiempo, aunque también sin apresuramientos en el método, una revisión total de muy importantes postulados de la ciencia biológica (1).

En ese orden de estudios vamos ahora a dar un avance muy fragmentario, de uno de los diversos problemas que habremos de estudiar en nuestro curso sobre *La vida bajo la observación electronoscópica*, trayendo aquí nuestras recientes investigaciones sobre bacterias del nitrógeno.

Desde que hace quince años comenzamos a ocuparnos de las bacterias simbióticas en nuestra cátedra de Bacteriología de la Universidad de Bombay y en el Laboratorio de Microbiología de St. Xavier's College de la misma Universidad, hemos podido observar el interés práctico creciente que han despertado estas bacterias y apreciar los interesantísimos y complicados problemas que con su pleomorfismo y peculiar fisiología presentan; tales, por otra parte, que desde hace unos años parecían haber agotado las técnicas disponibles. Acerca de dichos temas hemos podido realizar, desde primeros de 1947, utilísimas investigaciones con el microscopio electrónico en el Rockefeller Institute for Medical Research, New York, a cuya Dirección expresamos nuestro reconoci-

(1) La contextura filosófica de la ciencia de la vida (en la que los estrictamente biólogos se ocupan sólo de manera indirecta y supositiva) sufrirá probablemente poco en el proceso; pero a nuestro entender no quedarán intactas una porción de ideas con fundamento experimental, a las que nos hemos ido encariñando imperceptiblemente por encima de su carácter, muy respetable por lo demás, de teorías clásicas. Los conceptos de la morfología y funciones del núcleo de las bacterias, la química de las reacciones de inmunidad, la noción del cristal y sus relaciones con formas elementales de materia viva, los genes, las mitocondrias, sirvan de ejemplo, por no citar otros. Aun reconociéndoles la preferencia no aludiremos ahora a ellos, pues serán interpolados en nuestro trabajo próximo sobre *La teoría biológica de la dispersión de latencia*.

miento, y de modo especial al doctor K. R. Porter, del mismo Instituto, por su constante y valiosa cooperación.

* * *

El trabajo fué realizado en un modelo EMU de la R. C. A.; con aumentos moderados, generalmente a unos 60 kv. Las preparaciones que presentamos fueron montadas en película de 1 por 100 de Formvar (un formalpolivinilo que prepara la Shawinigan-Products Corporation, Empire State Building, Nueva York), con fijación por secado y uso de reactivos.

El inevitable estudio previo de la sistemática de este grupo siempre ha presentado especiales dificultades. Conn H. J., según O. N. Allen, en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, divide el género *Rhizobium* en las siguientes especies:

Rh. Leguminosarum (Lathyrus, Pisum, Vicia y Lens); *Rh. phaseoli* (Phaseolus); *Rh. trifolii* (Trifolium); *Rh. lupini* (Lupinus, Ornithopus); *Rh. japonicum* (Soja); *Rh. meliloti* (Melilotus, Medicago, y Trigonella).

Pero quedan fuera el grupo *Vigna* y muchas otras especies que señalan Fred y Waksman. Por lo demás, P. W. Wilsom, desde un punto de vista más bioquímico, no deja de reconocer que queda este punto pendiente de solución.

Tendrán que continuar estos estudios para consolidar dentro de grupos que presenten características aceptables de morfología, fisiología e inoculación cruzada, los diversos organismos hallados en plantas no comprendidas en los géneros dichos.

Los nódulos en las plantas leguminosas, *Trifolium*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Melilotus*, *Robinia*, etc., fueron buscados y recogidos en terrenos de parque situados en la North Shore (Roslyn), Long Island y en Irvington, ambos del Estado de Nueva York, en períodos de primavera, verano y otoño.

En las micrografías electrónicas que publicamos se descubre un buen número de aspectos nuevos; algunos sospechables, otros más bien inesperados; ciertamente muy por encima de lo que era posible deducir hasta ahora con el uso de la microscopía óptica.

1. Hablando en general sobre las abundantes preparaciones hechas, de las que aquí damos una muestra, en el mismo nódulo es posible observar formas de diversos aspectos, bacilares y bacteroides, que, dado el polimorfismo de las bacterias nodulares, no es fácil separar en diversas especies hasta que no puedan realizarse más detenidos estudios.

A este respecto indicaremos de paso, que ya Beijerinck recogió cuidadosamente abundantes diseños de las varias formas de bacterias simbióticas del nitrógeno.

Con todo, aun en trabajos recientes, pueden verse alusiones a la presencia

de «cocos», refiriéndose en lo que en nuestras micrografías mostramos claramente ser vacuolas uniformemente presentes (figuras 1 y 2) o discos o gránulos o estructuras del contenido celular.

Bewley y Hutchinson señalaron en los cultivos la presencia de sucesivos aspectos que extractamos así: *a)* Formas pre-pululantes, no motiles; *b)* Cocos grandes no motiles; *c)* Formas motiles pululantes elipsoidales; *d)* Formas bacilares menos motiles; *e)* Formas vacuoladas, con cromatina dividida en bandas, por falta de carbohidratos o por solución de suelo neutral. Nosotros pudimos comprobar a su tiempo esos procesos; pero no tan definitivos y esquemáticos. En cuanto a la influencia de sustancias químicas en la obtención de diversas formas aberrantes, se ha experimentado ampliamente por nosotros y otros autores con resultados que hoy día pueden considerarse como bien establecidos. Sin embargo, aun hoy la cuestión del significado de esa variable morfología está por resolver.

2. Respecto a la agrupación y crecimiento, existen formas ramificadas de *Rhizobium*, juntamente con las otras simples o encadenadas, en el nódulo vivo. Hay casos de manifiesta tendencia a la ramificación con brazos perpendiculares al tronco original, en el que la escisión aparece retardada y la célula continúa creciendo en diversas unidades separables.

3. Las formas obtenidas en cultivos provenientes de nódulos de diverso origen presentan muy manifiesta uniformidad; lo cual, frente a las dos observaciones anteriores, nos muestra la diferencia ambiental, por así decirlo, que existe en el nódulo mismo y la peculiar sensibilidad a ella de las bacterias simbióticas.

4. Es posible observar en nuestras preparaciones, por vez primera, diversas estructuras y constitutivos celulares que, aparte del significado directo que presentan en el estudio del *Rhizobium*, pueden ilustrar considerablemente la citología de la célula bacteriana en general y el problema de estructuras nucleares en particular.

Cuando se inició este trabajo y comenzamos a poder observar las diferenciaciones del contenido celular, hablábamos de todo lo que presentaba características de núcleo con cierta difidencia. Ahora, después de las razonables consideraciones y referencias de Knaysi, las observaciones de Robinow y los últimos resultados de Hillier, Mudd y A. G. Smith, parece que el lector hallará en este trabajo, según indicamos en las micrografías, material de manifiesto interés en la valoración o confirmación de diversos hallazgos y teorías que sólo de pasada aquí se tocan, y que ya desde ahora brindamos como un camino prometedor a la investigación de los microbiólogos expertos en microscopía electrónica.

5. Las formas abombadas o bacterioides, son de aspecto muy variado: en forma de botella o en forma de cabeza de hueso; con manifiestas yemas y

mamelones que, indudablemente, representan estadios de un proceso reproductivo.

6. En las formas bacilares, a que nos hemos referido, aparecen lo que llamaremos *corpúsculos bipolares*. Es ésta una estructura que hasta ahora no pudo observarse y que se presenta con manifiesta constancia. Nos parece ser el resultado de una condensación muy activa del contenido celular, posiblemente de tipo nuclear. Aunque se distribuya en la división de la célula, y aun la presida, no ha sido vista en nuestras preparaciones con suficiente claridad en estados que sugieran esa división.

Su densidad a la penetración electrónica es extraordinaria, y es lo que nos movió a llamar, para nuestro uso en el Laboratorio, *Bacillus punctatus* a los que poseían esta formación granular. Con el tratamiento de vapores de tetraóxido de osmio, conseguimos hacerla resaltar maravillosamente en forma perfectamente discreta y regular y fuertemente refringente, tal vez por la acción fijadora o más bien por la acción hialinizante del ósmico sobre el citoplasma. Estos corpúsculos los observamos repetidamente en las formas principalmente alargadas de los nódulos de *Trifolium pratense*, *Phaseolus*, *Robinia*, etc., y ésto, tanto en la célula original como en la cultivada sobre agar sin nitrógeno.

Sabiendo el estricto procedimiento de lavado exterior con bicloruro mercurico antes del cultivo y las diversas minuciosas precauciones contra contaminación que seguimos en esta ocasión, y son las mismas que describimos cuando aislamos en el nódulo de *Cajanus indicus* nuestro *B. concomitans*, la operación del cultivo confirma el carácter simbiótico.

Aunque concedimos siempre a estas operaciones de asepsia más importancia y cautela de la que corrientemente se practicaba, reconocemos que aún no tanta como ahora les da Burcik en su reciente discusión de las deducciones de H. Schanderl. Por lo menos, a ese tenor nuestras precauciones ya no parecerán exageradas, y, desde luego, las consideramos necesarias y suficientes para nuestro fin actual, hasta que llevemos adelante una total revisión de formas halladas.

El tamaño original del bacilo es menor que los demás tipos de bacterias nodulares; pero por subcultivo logramos formas de evolución mayores, que asumen la forma de botella y las vacuolizaciones típicas. Con frecuencia se los ve asociados a restos de descomposición de las otras bacterias (véase fig. 6, abajo izquierda). Es preciso un estudio más detenido de esta forma o bacilo.

7. El contenido celular se presenta como sustancia de gran poder dispersivo al electrón y, en general, llenando la totalidad del contorno sin mucha apariencia de membrana en las preparaciones; membrana que, por otra parte, da muestras de existencia en algunos casos y se hace más manifiesta en las «células fantasma» (véase fig. 13).

8. Las «células fantasma» (o «ghost cells», como las llamábamos en el

laboratorio) señalan abiertamente la diferenciación de un contenido y de una envoltura. Al desaparecer o desintegrarse el contenido por la acción de procesos degenerativos, enzimas o reactivos, queda la envoltura suelta y visible, generalmente con algún material. En algunos casos se ve dentro de la envoltura un conglomerado regular y denso, perfectamente discreto, de materia análoga a la que en la célula normal constituye el citoplasma.

9. Pendiente el uso de la interesante técnica de Baker y Pease con que intentar un corte de la célula, fué precisamente una rotura accidental de la película de soporte lo que nos permitió, observando el hueco de rotura, intentar deducir la naturaleza y carácter de una parte del contenido celular. La masa que se ofrece generalmente en otras preparaciones con aspecto oscuro, con más o menos densidad en partes, poseería de hecho ciertas porciones interiores de mayor consistencia que el resto. Puede verse, en efecto, que la materia negra en el borde de rotura no sigue toda ella la forma circular que pediría la tensión superficial, sino que, en parte adherida al borde, se proyecta en la luz del orificio. Si fuera posible producir a voluntad estas roturas, que suelen recibirse muchas veces como contrariedad, podría ser ésta una «técnica de plegamiento», interesante. Preparamos a lo largo de un trabajo diversas series. Una de ellas relacionada con el contenido de H_2O en el nódulo. Una comprendía la desecación del nódulo al aire por siete días, y otra que comprendía la inmersión y mantenimiento en condiciones de anegamiento (en agua) por siete días; a las micrografías de esta última serie pertenece la figura 17.

10. Para poder observar el contenido celular en células de textura más delicada y bajo uniformidad y control, preparamos un simple medio de cultivo libre de nitrógeno, en que pudieran crecer selectivamente las bacterias nitro fijadoras (Agar, 20 grs.; Agua ordinaria, 1.000 c. c.; Sacarosa, 10 grs.; KH_2PO_4 , 1,0 grs.; $MgSO_4$, 0,5 grs.; pH 6-7). En este medio y tras obtener las formas que deseábamos, procedimos a extremar las condiciones y preparamos subcultivos de larga duración a temperatura de Laboratorio, evitando desecación, o regulando duración con cámara fría, por siete a veintiún días. Así obtuvimos células individuales que mostraban un contenido celular en forma que pudiera sugerir la proyección plana de un contenido espiral o de discos transversales.

En otros casos se ven muy claras condensaciones bipolares, y en otros, dos como núcleos próximos que pudieran derivarse de uno central (figura 21). Corrientemente se presentan las células uniformemente vacuolizadas, sin que, por otra parte, haya señal, como indicábamos, de retracción del contenido que sugiera desecación o pusiera de manifiesto estructura de la membrana. Los aspectos como de cápsula en algunos casos, los consideramos puramente accidentales.

Hay casos bien manifiestos de un ordenamiento de concreciones dobles,

triples, del contenido celular, que parecen indicar un paso previo a la división según se hace notar en la explicación de las micrografías (fig. 7).

En este informe previo de nuestro trabajo no tratamos de aquilatar finas estructuras o mediciones. Hacemos referencia de paso a diversos métodos de reproducción; sin embargo, queremos dejar todo lo relacionado con las funciones de estas células para cuando su morfología quede bien estudiada.

S U M M A R Y

An advance account is given of work carried out with the Electron Microscope on Symbiotic Nitrogen Bacteria. Many micrographs were obtained of micro-organisms found in *Trifolium*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Melilotus*, *Robinia*, etc. In the light of those micrographs, of which several are published in the paper, reference is made therein to internal structure and differentiation of the cell contents, to indications of nuclear morphology and function; also to polar granules, to smaller dotted bacilli, and to several bacterial forms or appearances of the same form. A further systematic study will follow.

BIBLIOGRAFIA

- BERGEY'S.—*Manual of Determinative Bacteriology* (6.^a ed.) by R. S. Breed, E. G. D. Murray, A. Parker Hitchens. Baltimore, William & Wilkins Co., 1948.
- BAKER, R. F. y PEASE, D. C.—*Improved sectioning technique for Electron Microscopy*. *Jour. of Applied Physics* 20 (1949), 480.
- BURCICK, E.—*Eine Kritik der Symbiosetheorie von H. Schanderl auf Grund neuer eigener Untersuchungen*. *Arch. für Mikrob.* 14 (1949), 309.
- FRED, E. B., BALDWIN, I. L. y MCCOY, E.—*Root Nodule bacteria and leguminous plants*. Madison, Univ. of Wisconsin Press, 1932.
- HILLIER, J., MUDD, G. y SMITH, A. G.—*Jour. of Bact.* 57 (1949) 319.
- KNAYSI, G.—*Jour. of Bact.* 43 (1942) 365.
- KNAYSI y BAKER.—*Jour. of Bact.* 53 (1947) 539.
- PALACIOS, G. y BARY, ABDUL.—*The Physiology of Indian Nodule Bacteria*. *Proc. Indian Acad. of Sci.* 3 (1936) 362 sgs.
- PALACIOS, G. y BARI, ABDUL.—*A new microorganism, B. concomitans, in the nodules of Cajanus indicus*. (*Ibid.*)
- PEASE, D. C. y BAKER, R. F.—*Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 67 (1948) 470.
- ROBINOW, C. F.—Addendum to R. J. Dubos, *The Bacterial Cell*, Cambridge Mass. Harvard Univ. Press., 1945.
- WAKSMAN, S. A.—*Principles of Soil Microbiology*, Baltimore, W. and Wilkins Co., 1927.
- WILSON, P. W.—*The Biochemistry of symbiotic N-fixation*. Madison, Univ. of Wisconsin Press, 1940.

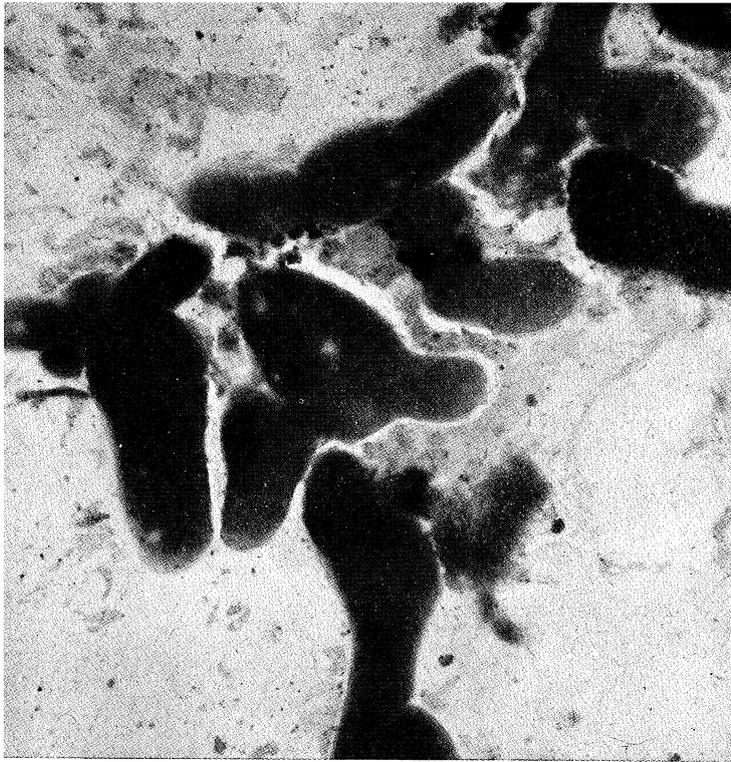


FIG. 1.

Rhizobium en *Trifolium pratense*; preparación directa, fijada por secado en solución fisiológica y montada desde agua. Formas mamelona-
das y en botella con
gemmación manifies-
ta. Aumento, 12.000
diámetros.

(original reducido)

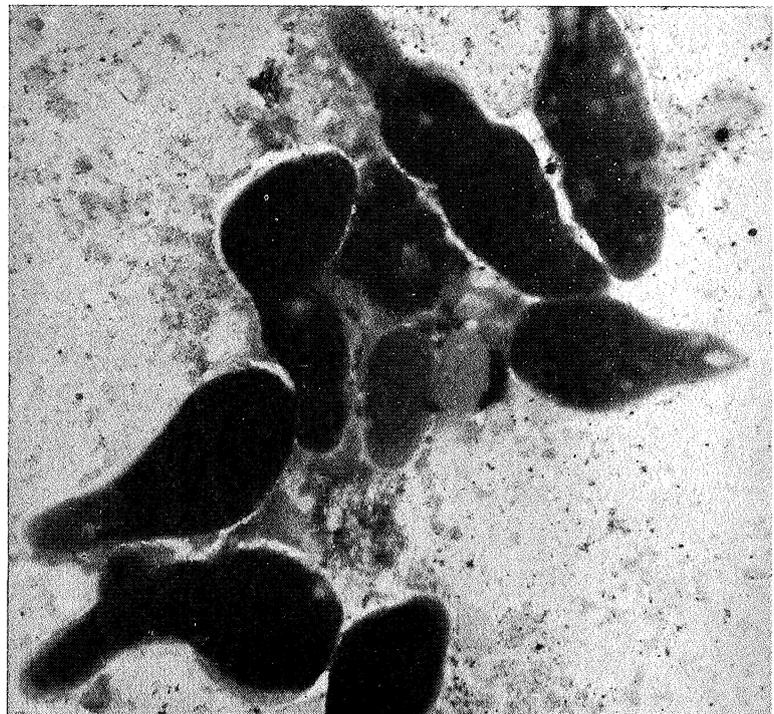


FIG. 2.

Material y técnica
como la anterior.
Contenido celular
denso, bastante uni-
forme. Nótese en ca-
da una, por lo me-
nos, una vacuola.
Aumento, 12.000 diá-
metros.

(o. r.)

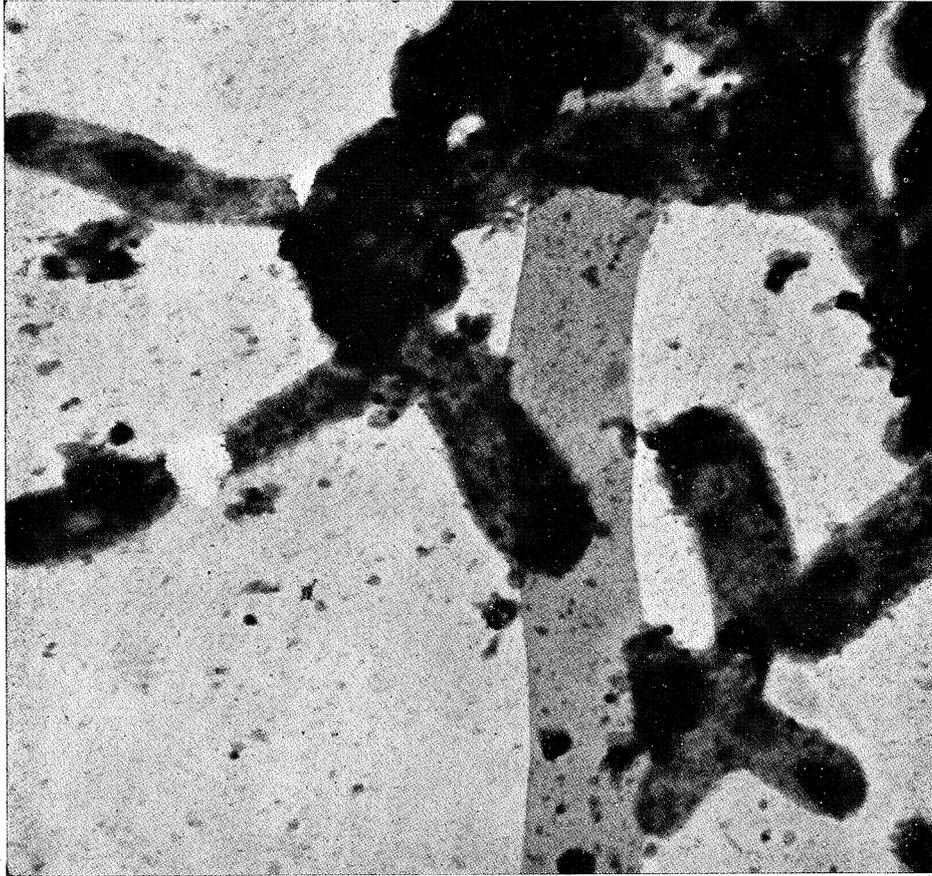


FIG. 3.

Rhizobium en *Melilotus*. Fuerte tratamiento con tetraóxido de osmio (veinticuatro horas). En la parte inferior derecha, evidencia de auténtica ramificación. En ninguna unidad separada o separable falta una manifiesta condensación del contenido. $\times 12.000$.

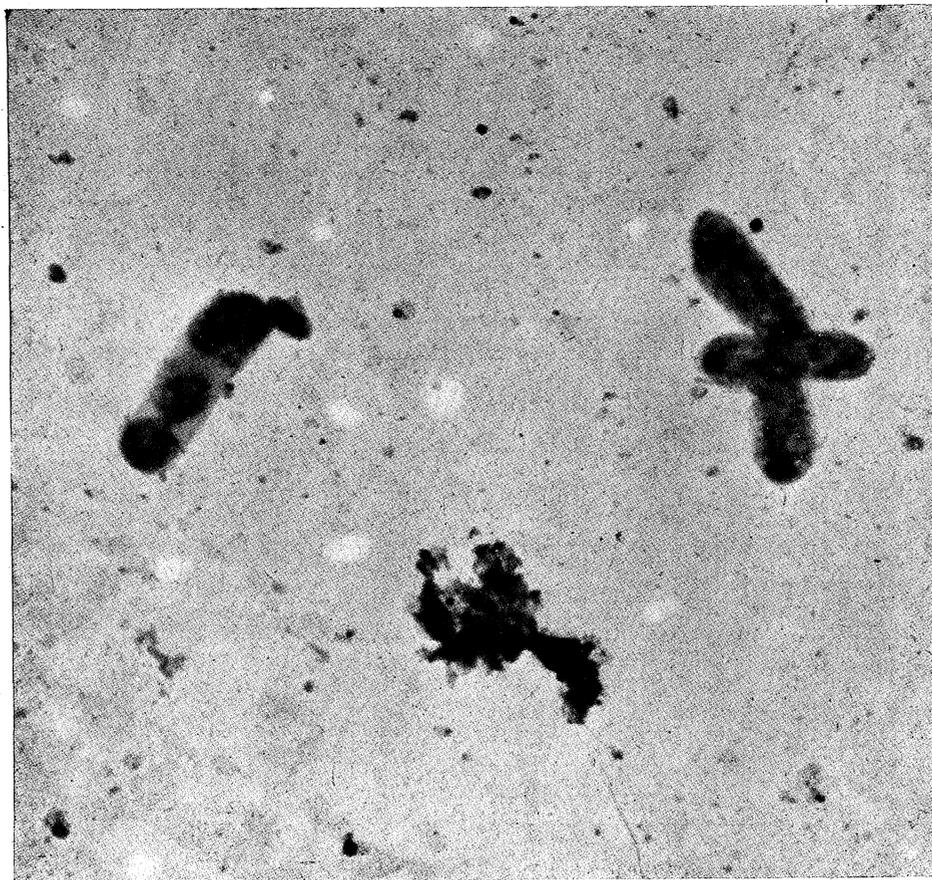


FIG. 4.

Rhizobium en *Melitotus*. Sin otra fijación que el secado. Una célula, a la izquierda, con tres condensaciones. A la derecha, en la forma de T, aparece continuidad de materia; el travesaño oblicuo de la cruz, parece ser sólo contiguo y ligeramente superpuesto. $\times 12.300$.



FIG. 5.
Rhizobium en *Meli-Lotus* en forma de cabeza de hueso. Contenido de aspecto estromatoso, prácticamente continuo. Fijación por secado. $\times 12.000$.
 (o. r.)

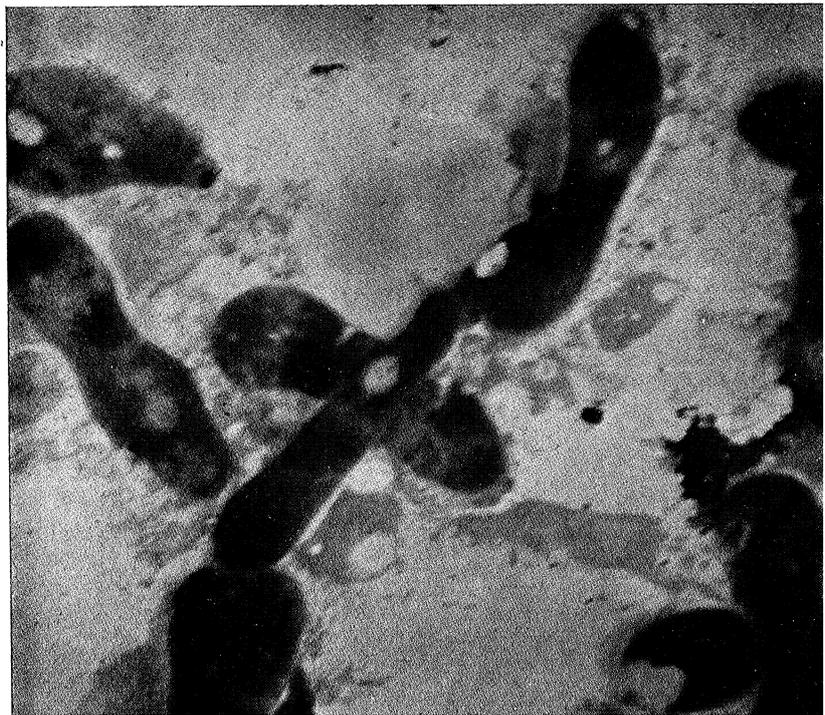


FIG. 6.
Rhizobium en *Meli-Lotus*. Células superpuestas y contiguas, con condensaciones y vacuolas. Se nota aquí también algo de predominio de una vacuola. Por secado en solución salina. $\times 12.000$.
 (o. r.)

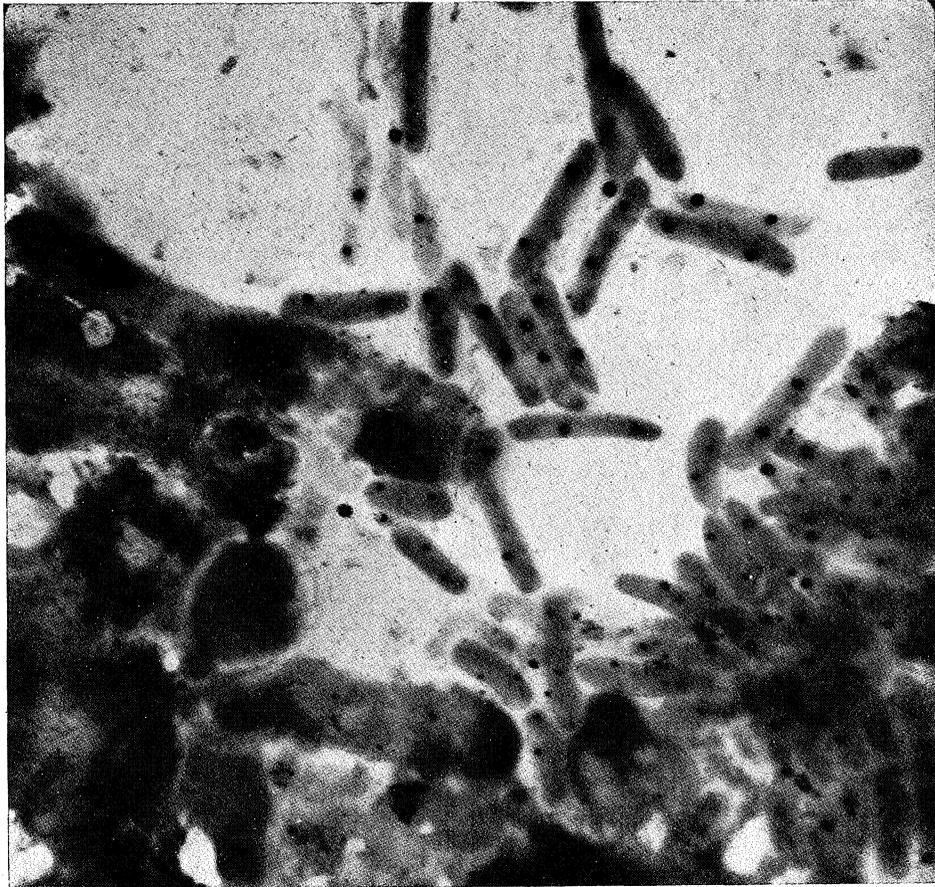


FIG. 7.

Bacteria en el óvulo de *Meli-Lotus*. Esta notable fotografía reproduce con toda claridad el bacilo que en nuestros experimentos llamamos *punctatus*, por la intensa diferenciación de los corpúsculos bipolares. Son especialmente visibles con el tetraóxido de osmio. La primera vez los descubrimos débilmente visibles, y para comprobar usamos luego el reactivo. Aunque en su mayoría son de colocación bipolar, existen formas aisladas del mismo aspecto; y a veces, como en la microfotografía inferior derecha aparecen dos juntos, como si acabaran de separarse. Hacia el centro mismo y centro-derecha, muestran los bacilos señales de división. Fijación por secado en solución salina. $\times 12.300$.



FIG. 8.

Rhizobium en nódulos de *Trifolium pratense*, secados al aire por una semana, para observar el efecto de la deshidratación, que aquí ha dejado descubierta la zona de la membrana, que se ve cruzada por fajas radiales. $\times 12.000$.

(o. r.)



FIG. 9.

Rhizobium en nódulo de *Phaseolus*. Ejemplo notable de forma ramificada frecuente en estos microorganismos; aunque la microfotografía muestra también las formas contiguas. Secadas en solución fisiológica y montadas desde agua. $\times 12.000$.

(o. r.)



FIG. 10.

Bacterias en nódulo de *Phaseolus*. El contenido celular posee una forma espiral o crenada, o presenta la tendencia de contraerse repetidamente en aspectos de esa forma. Preparación tratada con vapores de tetraóxido de osmio. $\times 13.000$.

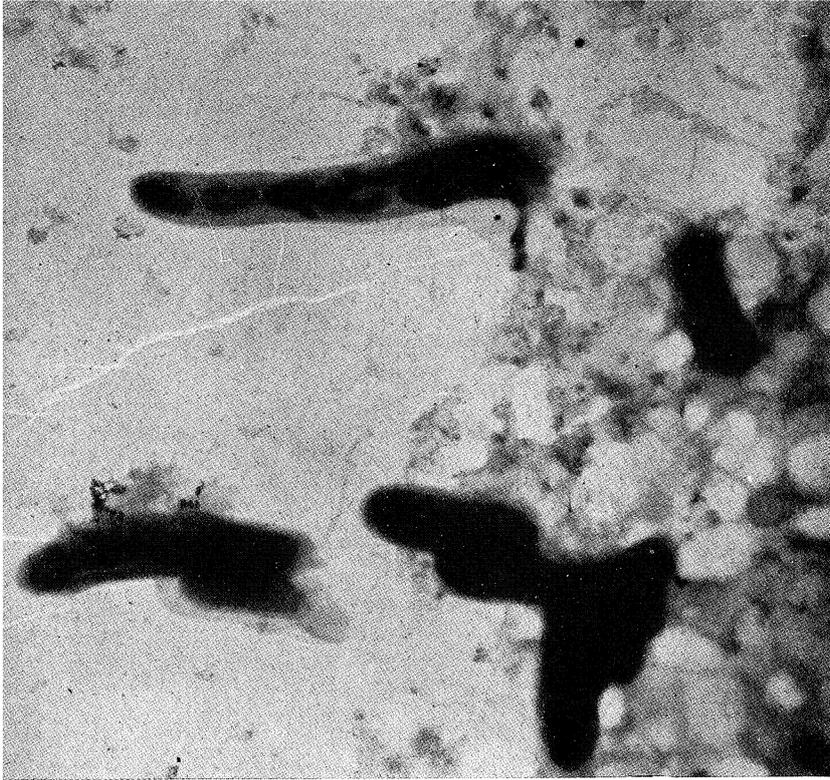


FIG. 11.
Bacterias del nódulo de *Phaseolus*. Las células, por cualquier causa, han perdido algo del poder de dispersión de los electrones; muestran estructuras de diferente densidad relativa. Secadas en soluciones fisiológicas, montadas desde agua. $\times 12.000$.

(o. r.)

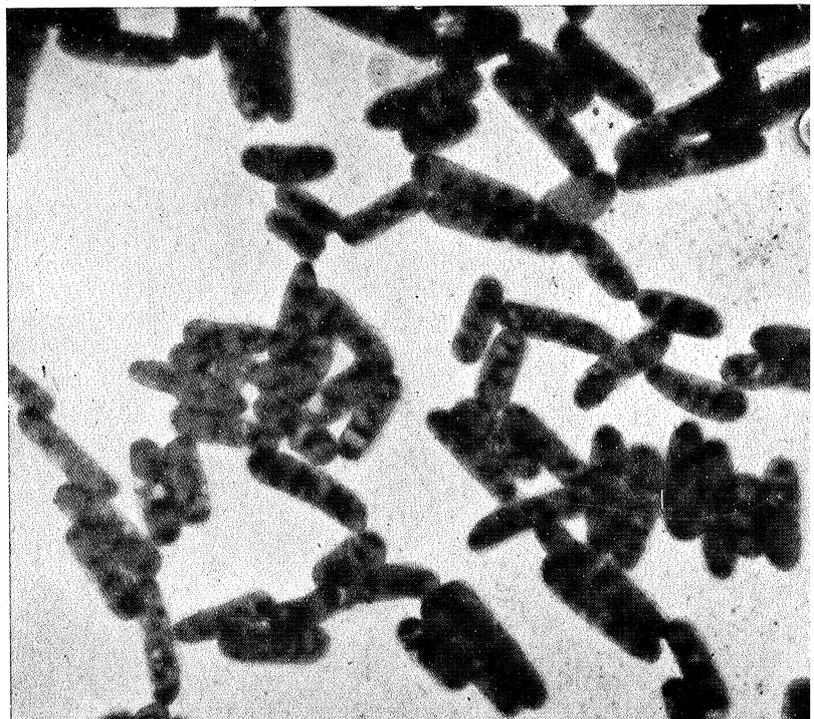


FIG. 12.
Bacterias de nódulo de *Phaseolus*. Cultivadas en agar sin nitrógeno por siete días. (Nódulo exteriormente esterilizado con bicloruro mercúrico.) El contenido celular presenta ordenamiento de estructura previo a división. Las tenues indicaciones de corpúsculos polares se pierden casi en la reproducción. $\times 12.000$.

(o. r.)

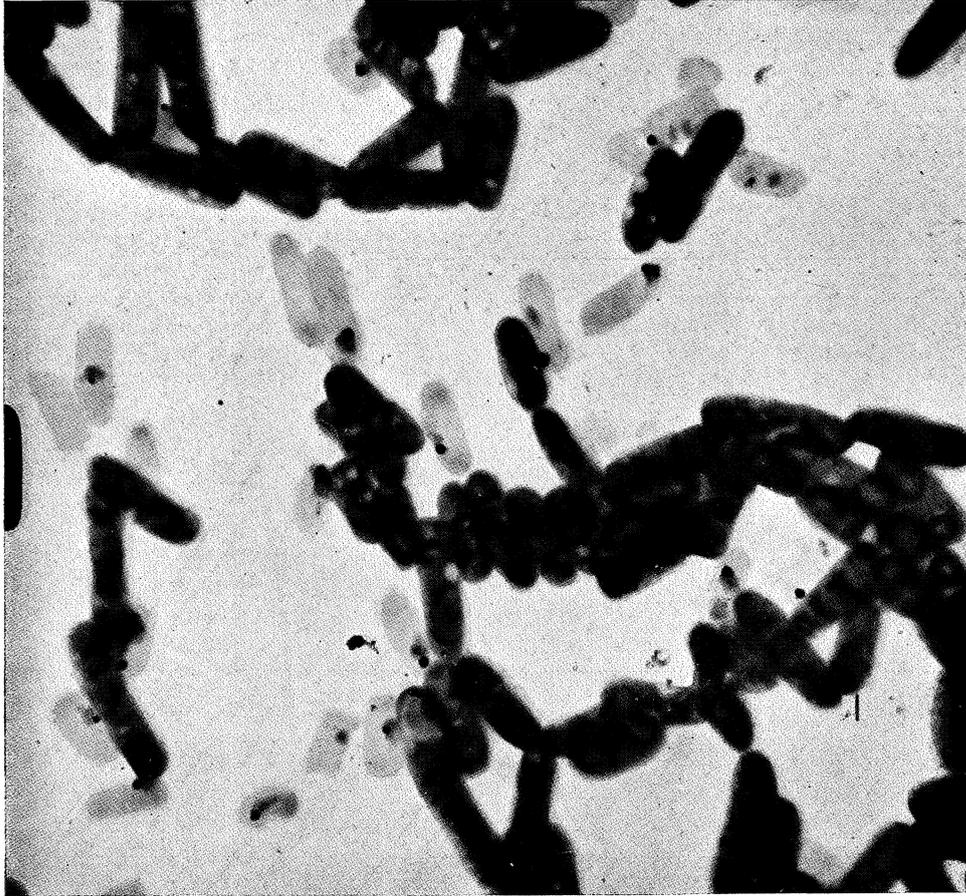


FIG. 13.

Bacterias de *Phaseolus* cultivadas siete días en agar, sin N. A la derecha—centro y superior—izquierda se ve el contenido celular redondeado de forma discreta y pronto a la división. Se ve también un cierto número de células «fantasma» que, o han perdido el citoplasmo o ha perdido éste el poder de dispersión. En casi todas se ven, con todo, restos de alguna porción densa. Parecen en realidad envolturas vacías.
× 12.300.

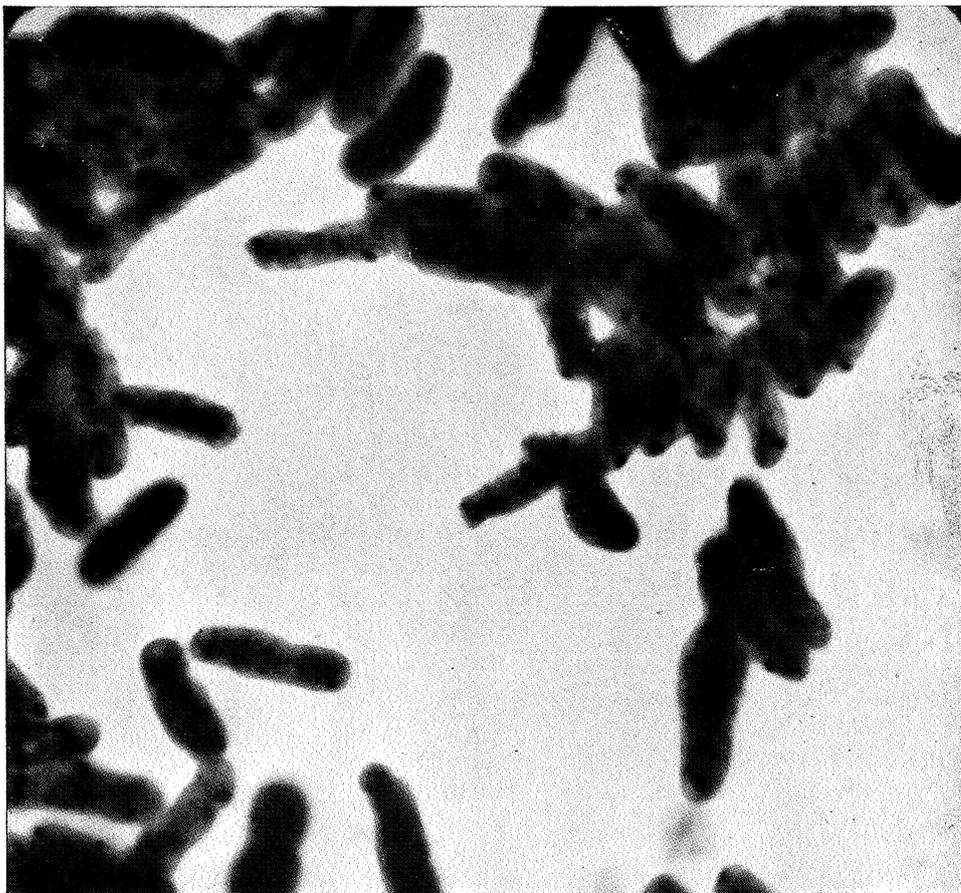


FIG. 14.

Cultivo de bacterias de *Phaseolus*, como antes, tratadas con vapores de tetraóxido de osmio. Aparecen (más claras en el original) indicaciones de corpúsculos polares y contenido estromatoso. $\times 12.300$.



FIG. 15.

Rhizobium de *Pisum sativum* (nódulo fresco y superficial), indicaciones de membrana, bacteroides en forma de cabeza de hueso y con mucha gemación. Contenido celular homogéneo y muy refringente. $\times 8.200$.

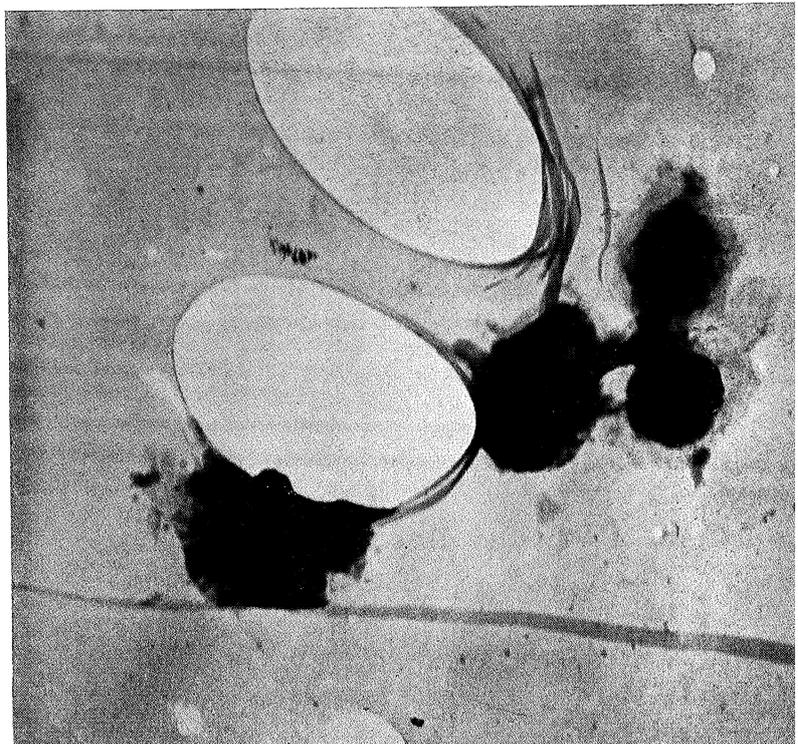


FIG. 16.
Rhizobium de Pisum sativum (del mismo origen que el anterior). Formas ramificadas. $\times 8.000$.

(o. r.)

FIG. 17.
 Células de nódulo de *Trifolium pratense*. La observación detenida de la rotura accidental de la membrana de soporte que pudo captarse en la placa nos proveyó de una técnica de plegamiento, que nos permite deducir la consistencia más compacta de una parte del contenido celular, algo más refringente que el resto. Es como si se hubiese doblado la célula sobre sí misma. (Véase párrafo 9.) Nódulos anegados en agua durante una semana.
 $\times 12.000$.

(o. r.)



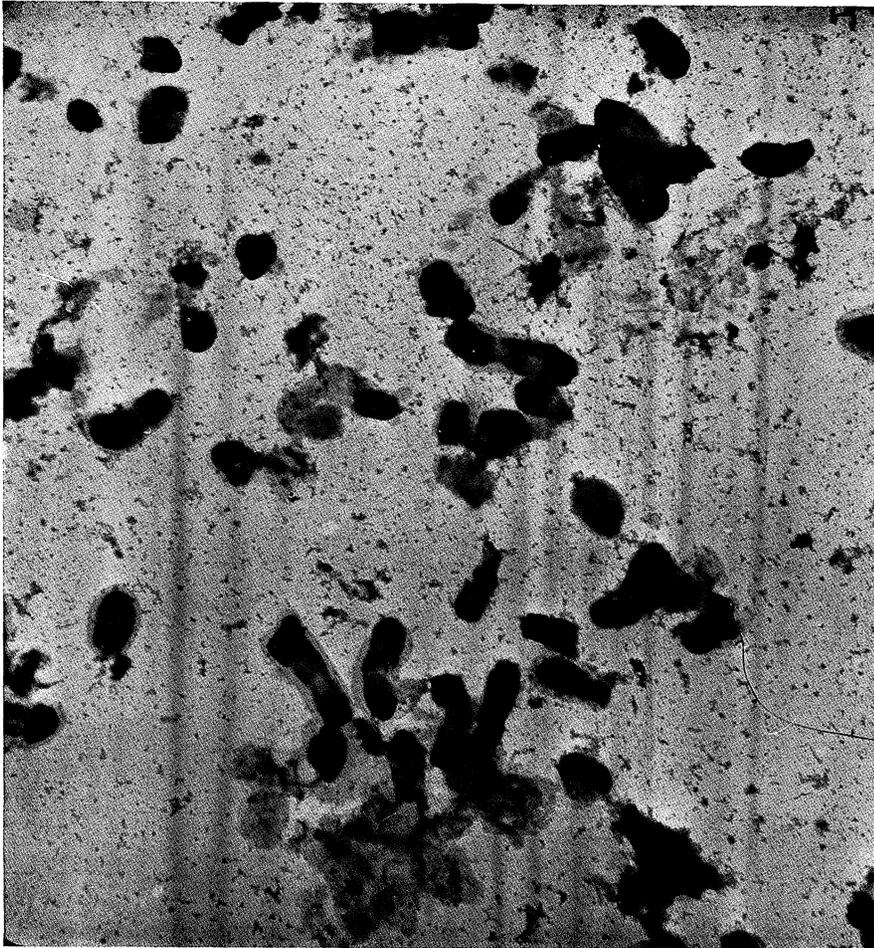


FIG. 18.

Bacterias del nódulo de *Robinia pseudoacacia*; condensación del contenido celular en los extremos, con centro hialino. $\times 8.200$.

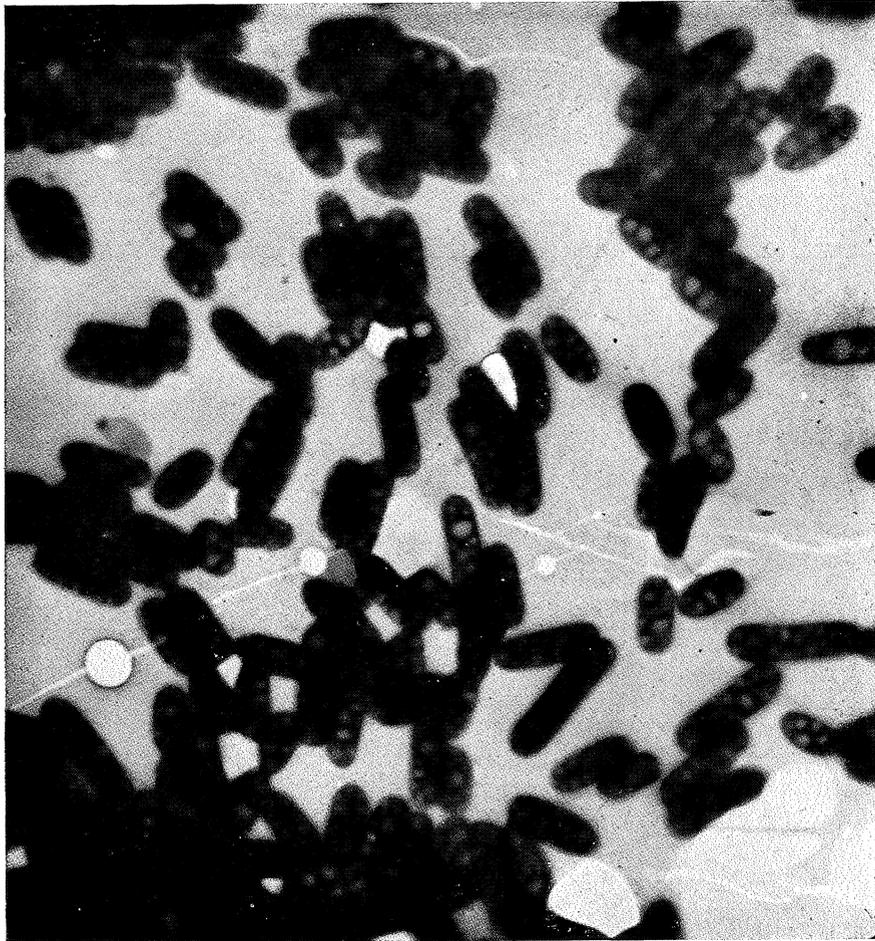


FIG. 19.

Células de nódulo de *Phaseolus* en subcultivo a diecisiete días. Presentan aspectos vacuolares de gran regularidad; sin señal, con todo, de retracción del contenido celular que llega hasta los bordes. $\times 8.200$.

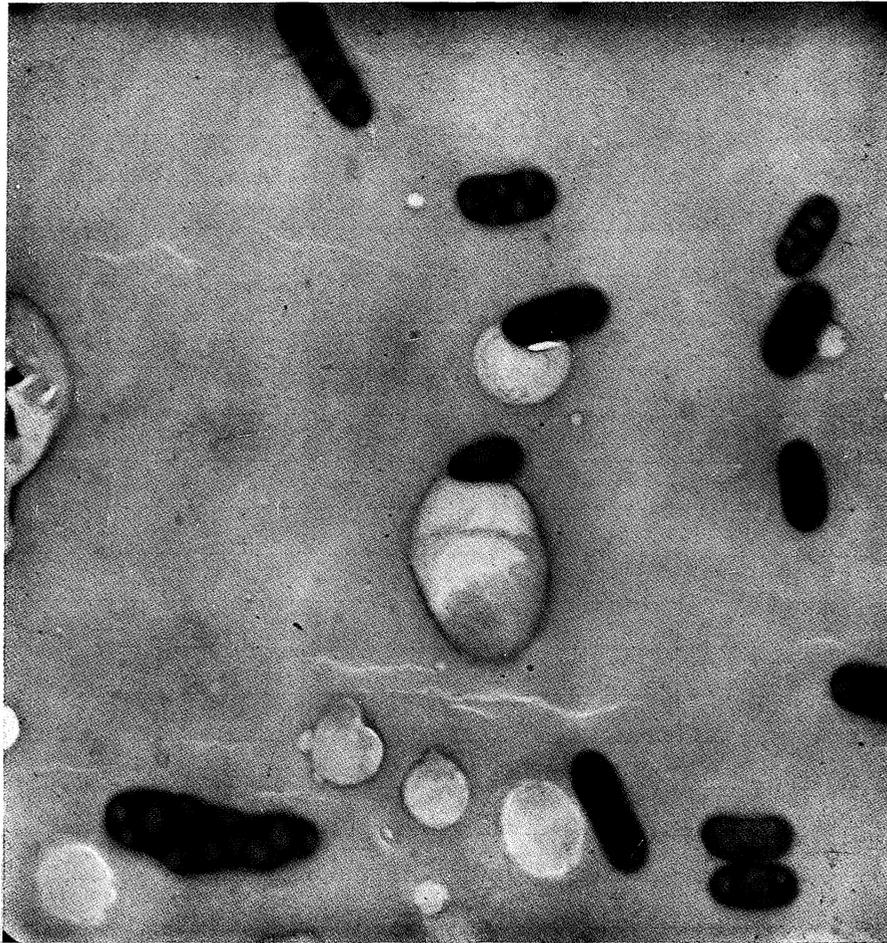


FIG. 20.

Subcultivo como en la figura 19. Izquierda-inferior, célula abombada, tendiendo a la forma de botella de tipo bacteroide. Arriba, el contenido celular aparece condensado, como aparecería la proyección de una estructura espiral, y también aquí llega a los bordes. $\times 8.000$.



FIG. 21.

Células de nódulo de *Phaseolus*. Subcultivo. En el centro, célula con contenido dividido en zonas. Esta interesante preparación muestra muy variadas formas transicionales: condensaciones polares, corpúsculos de aspecto nuclear (centro-derecha) y una célula cerca de dicho punto, mostrando dos núcleos juntos o estructuras con apariencia de tales. $\times 8.200$.

INFORMACION

VISITA DEL PROFESOR HAUDUROY



Invitado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Sociedad de Microbiólogos Españoles, visitó nuestro país, en la segunda quincena de noviembre del pasado año, el profesor Hauduroy, Director del Instituto de Bacteriología, Higiene y Parasitología, de Lausanne.

A su llegada a Barcelona, fué recibido por el profesor Oliver Suñé, Secretario de la Sección local de Microbiólogos. En dicha ciudad pronunció dos conferencias: una en la Universidad, en que se ocupó de los ultravirus, y otra en la Real Academia de Medicina, en la que desarrolló el tema «Recientes adquisiciones sobre el bacilo tuberculoso». Asimismo, durante su estancia en Barcelona, presidió una reunión científica de la Sección citada.

Ya en Madrid, donde la recepción corrió a cargo del Secretario General de la Sociedad, profesor Vilas, visitó acompañado del mismo y en días sucesivos, los diversos Institutos del Consejo, laboratorios de la Universidad y diferentes centros técnicos del Estado.

El día 24, en el Aula Magna del edificio central del Consejo, pronunció una conferencia acerca de «Organización de la Central de colecciones de cultivos microbianos tipo, de Lausanne». En ella el profesor Hauduroy, como Director del Organismo citado, creado por el Gobierno de Suiza y subvencionado por la UNESCO, y cuya misión es facilitar gratuitamente la labor de los cultivadores de la Bacteriología en sus diferentes ramas, expuso los diversos trabajos en curso y proyectos a realizar; el intercambio de datos por medio del gran fichero de la Organización, la resolución de consultas y problemas prácticos, el funcionamiento del Comité de nomenclatura, y los estudios para conseguir la unificación de técnicas, fueron temas tratados por el conferenciante con elegancia y claridad. Finalmente, invitó a los microbiólogos españoles a participar en las tareas de la Central de Lausanne y agradeció las atenciones recibidas por parte de la Sociedad y del Consejo.

En el curso de conversaciones particulares con el Presidente y Miembros directivos de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, se convino que ésta confeccionaría las listas de estirpes de microbios, virus, etc., pertenecientes a sus miembros, listas que serían puestas a disposición del Centro de Lausanne para facilitar sus fines propios, quedando a su vez las colecciones del Centro a la disposición de los estudiosos de nuestro país.

El Profesor Hauduroy ha dejado en el curso de su visita un grato recuerdo personal entre todos cuantos tuvieron el placer de conversar con él, habiendo sido captada plenamente por los especialistas españoles la fuerte personalidad científica del ilustre bacteriólogo francés.

V CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

El Comité Ejecutivo de este Congreso, que se celebrará del 17 al 24 de agosto del año próximo, en Río de Janeiro, está formado por los doctores Olympio da Fonseca, Filho (Presidente), Henrique Aragao, H. C. de Souza-Araujo, Genesio Pacheco, Joaquim Travassos y Cassio Miranda.

El programa acordado se desarrollará conforme a las diez secciones siguientes:

Sección 1.ª: *Microbiología general*.—Química y fisiología de los microorganismos; Variación y mutación; Antibióticos; Microorganismos libres.

Ya en Madrid, donde la recepción corrió a cargo del Secretario General de la Sociedad, profesor Vilas, visitó acompañado del mismo y en días sucesivos, los diversos Institutos del Consejo, laboratorios de la Universidad y diferentes centros técnicos del Estado.

El día 24, en el Aula Magna del edificio central del Consejo, pronunció una conferencia acerca de «Organización de la Central de colecciones de cultivos microbianos tipo, de Lausanne». En ella el profesor Hauduroy, como Director del Organismo citado, creado por el Gobierno de Suiza y subvencionado por la UNESCO, y cuya misión es facilitar gratuitamente la labor de los cultivadores de la Bacteriología en sus diferentes ramas, expuso los diversos trabajos en curso y proyectos a realizar; el intercambio de datos por medio del gran fichero de la Organización, la resolución de consultas y problemas prácticos, el funcionamiento del Comité de nomenclatura, y los estudios para conseguir la unificación de técnicas, fueron temas tratados por el conferenciante con elegancia y claridad. Finalmente, invitó a los microbiólogos españoles a participar en las tareas de la Central de Lausanne y agradeció las atenciones recibidas por parte de la Sociedad y del Consejo.

En el curso de conversaciones particulares con el Presidente y Miembros directivos de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, se convino que ésta confeccionaría las listas de estirpes de microbios, virus, etc., pertenecientes a sus miembros, listas que serían puestas a disposición del Centro de Lausanne para facilitar sus fines propios, quedando a su vez las colecciones del Centro a la disposición de los estudiosos de nuestro país.

El Profesor Hauduroy ha dejado en el curso de su visita un grato recuerdo personal entre todos cuantos tuvieron el placer de conversar con él, habiendo sido captada plenamente por los especialistas españoles la fuerte personalidad científica del ilustre bacteriólogo francés.

V CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA

El Comité Ejecutivo de este Congreso, que se celebrará del 17 al 24 de agosto del año próximo, en Río de Janeiro, está formado por los doctores Olympio da Fonseca, Filho (Presidente), Henrique Aragao, H. C. de Souza-Araujo, Genesio Pacheco, Joaquim Travassos y Cassio Miranda.

El programa acordado se desarrollará conforme a las diez secciones siguientes:

Sección 1.ª: *Microbiología general*.—Química y fisiología de los microorganismos; Variación y mutación; Antibióticos; Microorganismos libres.

Sección 2.^a: *Bacteriología médica y veterinaria*.—Bacterias piógenas, mastitis; Tuberculosis, B. C. G.; Lepra; Brucelosis; Salmonelosis; Anaerobios patógenos; Espiroquetas: sífilis y pinta.

Sección 3.^a: *Virus y enfermedades virocósicas*.—Virosis neurótropas; Influenza y otras infecciones virósicas del tracto respiratorio; Fiebre amarilla; Fiebre aftosa; Virus vegetales; Bacteriófago.

Sección 4.^a: *Rickettsias y rickettiosis*.—Enfermedades del grupo del tifus exantemático y del de las otras fiebres exantemáticas; Otras rickettiosis; Vectores de las enfermedades rickettsiales; Vacunación.

Sección 5.^a: *Micología médica y veterinaria*.—Micosis pulmonares; Granulomas blastomicósicos; Alergia de las infecciones micósicas.

Sección 6.^a: *Protozoología médica y veterinaria*.—Tripanosomiasis y enfermedad de Chagas; Amebiasis; Leishmaniosis; Infecciones plasmódicas: ciclo exo-eritrocítico; Piroplasmosis.

Sección 7.^a: *Enfermedades bacterianas de las plantas*.—Tumores bacterianos; Simbiontes y parásitos de las raíces; Microorganismos que atacan la madera; Enfermedades de las plantas cultivadas en los trópicos.

Sección 8.^a: *Microbiología del agua y del suelo*.

Subsección a: *Microbiología del agua*.—Grupo coli-aerógenos; Purificación del agua.

Subsección b: *Microbiología del suelo*.—Microorganismos del suelo; Fijación del nitrógeno; Factores que influyen sobre la flora microscópica del suelo.

Sección 9.^a: *Microbiología industrial*.—Envenenamiento de alimentos de origen bacteriano; Microbiología lechera; Descomposición de la celulosa; Papel de los microorganismos en la nutrición del hombre y de los animales; Producción de sustancias químicas por fermentación.

Sección 10: *Inmunidad y resistencia*.—Alergia. Mecanismo de la infección y de la inmunidad; Resistencia inespecífica; Estudios físicos y químicos sobre antígenos y anticuerpos; Reacciones antígeno-anticuerpo.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

SECCION DE MADRID

ACTA DE LA SESION CELEBRADA EL DIA 13 DE ENERO DE 1948.

En Medinaceli 4, y bajo la presidencia de don Juan Marcilla, se celebró el día 13 de enero la sesión científica correspondiente a dicho mes.

Abierta la sesión el Secretario leyó el Acta anterior que fué aprobada.

A continuación los señores Cremades y Maurín presentados por don Juan Marcilla leyeron un trabajo sobre «Determinación del ácido fosfórico asimilable por las plantas, mediante el método de *Aspergillus*», trabajo ejecutado por dichos señores bajo la dirección del señor Marcilla.

Fué puesto de manifiesto el sentimiento que ha causado en la Sociedad de Microbiólogos Españoles el fallecimiento del Dr. Rodríguez Illera, Socio de la misma.

Y no habiendo más asuntos de que tratar, fué levantada la sesión. Lo que certifico en Madrid, a trece de enero de mil novecientos cuarenta y ocho.—*El Secretario.*

ACTA DE LA SESION CELEBRADA EL DIA 2 DE FEBRERO DE 1948

Bajo la presidencia de don Juan Marcilla, se celebró la reunión científica mensual de la Sociedad, en Medinaceli 4.

Leída por el Secretario el Acta de la reunión anterior, fué aprobada.

El Socio don Rafael Ibáñez leyó una conferencia sobre «Preservación de microorganismos». A continuación el R. P. J. Puiggrós, S. J., dió cuenta de la constitución de la Delegación de Barcelona, en cuyo gobierno será ayudado por don J. Oliver Suñé y don José M.^a Rosell. Ha quedado instalada en el edificio de la Biblioteca Central, calle del Carmen número 47, Barcelona.

Y no habiendo más asuntos de que tratar fué levantada la sesión. De lo cual levanto Acta y como Secretario lo certifico en Madrid, a tres de febrero de mil novecientos cuarenta y ocho.—*El Secretario.*

ACTA DE LA SESION CELEBRADA EL DIA 1 DE MARZO DE 1948

En Medinaceli, 4, y a las siete y media de la tarde del día 1 de marzo, celebró su reunión científica mensual la Sociedad de Microbiólogos Españoles. Presidió don Juan Marcilla.

Leída por el Secretario al Acta anterior fué aprobada. Seguidamente el Socio don Benito Regueiro Varela, leyó una revisión sobre «Antígenos de gérmenes Gram-negativos».

A continuación, el señor Presidente dió cuenta de una carta del señor Nájera en la que dimite su cargo en la Junta por ausentarse a Tucumán. Se acordó que continúe en la Junta hasta que sea el período normal de renovación.

Y no habiendo más asuntos que tratar, fué levantada la sesión. Lo que certifico en Madrid, a tres de marzo de mil novecientos cuarenta y ocho.—*El Secretario.*

ACTA DE LA SESION CELEBRADA EL DIA 5 DE ABRIL DE 1948

A las siete y media de la tarde, y en Medinaceli, 4, celebró la reunión mensual ordinaria la Sociedad de Microbiólogos Españoles. Presidió don Ricardo Salaya.

Abierta la sesión, el Secretario leyó el Acta de la sesión anterior, que fué aprobada.

Seguidamente, el socio don Benito Regueiro leyó una comunicación sobre «Acción de las sulfamidas sobre la fermentación producida por levaduras».

Se admitieron como nuevos socios a los «Laboratorios Alter», a don Rafael Préstamo y a don Ricardo Sánchez Carrera, que fueron presentados por don Ricardo Salaya y el Secretario que suscribe.

No habiendo más asuntos que tratar se levantó la sesión, de lo cual levanto Acta y, como Secretario, lo certifico en Madrid, a seis de abril de mil novecientos cuarenta y ocho.

BIBLIOGRAFIA

Continuamos la publicación sistemática, por orden cronológico de los títulos de los trabajos que han aparecido en los últimos años en las principales revistas microbiológicas. Ello permite una fácil orientación dentro del panorama internacional de la especialidad.

Las iniciales que van al final de cada cita corresponden al Centro en que se encuentra la publicación en ellas indicada, y cuya interpretación se da siempre al comienzo de las listas. Si aquéllas pertenecieran a bibliotecas personales de los señores socios, se indicará siempre, al final de la cita y entre paréntesis, el nombre, apellidos y dirección del propietario de la publicación. Si existiera en varias bibliotecas la misma publicación, se indicarán todas, y sólo en el caso de ser excesivamente numerosas las referencias se hará selección de las mismas.

- L. M. M.—Laboratorio Municipal de Madrid.
- E. I. A.—Escuela de Ingenieros Agrónomos.
- I. M. G. A.—Instituto de Microbiología General y Aplicada.
- E. Q. A.—Estación de Química Agrícola.
- I. E.—Instituto de Edafología.
- I. C.—Instituto Cajal.
- E. F. A. M.—Estación de Fitopatología Agrícola de Madrid.

Mediante convenio con el servicio de Microfilm del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la Sociedad puede facilitar a los señores socios reproducciones de los artículos que deseen, para lo cual bastará escribir al Secretario de la Sociedad, Serrano, 113, Madrid, precisando el número en negritas que encabeza el artículo cuya copia se solicita.

Los precios y condiciones se detallan al final de esta Sección.

INDICE DE ARTICULOS DE REVISTAS

372

MUNDT (J. O.) AND FABIAN (F. W.).—*The Bacterial Oxidation of Corn Oil.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 1, vol. 48 núm. 1 july, 1944. I. E.

373

SPIEGELBERG (C. H.).—*Sugar and Salt Tolerance of Clostridium pasteurianum and Some Related Anaerobes.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 13, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

374

HARDEN SVEC (MURIEL) AND McCOY (ELIZABETH).—*A Chemical and Immunological Study of the Capsular Polysaccharide of Clostridium perfringens.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 31, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

375

CARLE (B. N.), DEWHIRST (W. H.) Jr., BRAUN (W.) AND EATON (M. D.).—*Experiments on the Transmission of an Icterogenic Agent in Yellow Fever Vaccine to Horses and Swine.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 45, vol. 48, núm. 1 july 1944 I. E.

376

CAMPBELL (J. J. R.) AND GUNSALUS (I. C.).—*Citric Acid Fermentation by Streptococci and Lactobacilli.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 71, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

377

MAIN (EDNA, R.) AND LOCKE (ARTHUR).—*Carbonic Anhydrase. III. Effect on Growth of the Type I Pneumococcus, in Vitro.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 77, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

378

YEGIAN (DIRAN) AND PORTER (KEITH R.).—*Some Artifacts Encountered in Stained Preparations of Tubercle Bacilli. I. Non-Acid-fast Forms Arising from Mechanical Treatment.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 83, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

379

MAYER (RUDOLF L.).—*The Influence of Sulfanilamide upon the Yellow Pigment Formed by Mycobacterium tuberculosis from p-Aminobenzoic Acid.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 93, vol. 48, núm. 1 july 1944. I. E.

380

FOSTER (JACKSON W.).—*Microbiological Aspects of Riboflavin. III. Oxidation Studies with Pseudomonas riboflavina.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 97, vol. 48, número 1 july, 1944. I. E.

381

CHAPMAN (GEORGE H.).—*The Isolation of Streptococci from Mixed Cultures.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 113, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

382

GRIFFIN (A. M.) AND ROBINS (MARY LOUISE).—*The Flagellation of Listeria monocytogenes.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 114, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

383

PERLMAN (DAVID).—*Fermentation by Streptothricin-resistant Cultures of Aerobacillus polymixa*.—*Journal of Bacteriology* pág. 116, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

384

WRIGHT (LEMUEL D.) AND SKEGGS (HELEN R.).—*The Growth Factor Requirements of Certain Streptococci*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 117, vol. 48, núm. 1 july, 1944. I. E.

385

DIENES (L.) AND SMITH (WILLIAM E.).—*The Significance of Pleomorphism in Bacteroides Strains*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 125, vol. 48, núm. 2 august, 1944. I. E.

386

FELSENFELD (OSCAR).—*The Lecithinase Activity of Vibrio comma and the El Tor Vibrio*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 155, vol. 48, núm. 2 august, 1944. I. E.

387

NAGHSKI (JOSEPH), WHITE (JONATAN W.) Jr. AND HOOVER (SAM R.).—*Aerobic Decomposition of Guayule Shrub (Parthenium argentatum Gray)*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 159, vol. 48 núm. 2 august, 1944. I. E.

388

SCHADE (ARTHUR L.) AND CAROLINE (LEONA).—*The Preparation of a Polyvalent Dysentery Bacteriophage in a Dry and Stable Form. II. Factors Affecting the Stabilization of Dysentery Bacteriophage during Lyophilization*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 179, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

389

BELLAMY (W. D.) AND GUNSALUS (I. C.).—*Tyrosine Decarboxylation by Streptococci: Growth Requirements for Active Cell Production*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 191, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

390

STOKES (J. L.).—*Substitution of Thymine for «Folic Acid» in the Nutrition of Lactic Acid Bacteria*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 201, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

391

SANBORN (J. N.).—*Slime-producing Coliform and Coliform-like Bacteria*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 211, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

392

HAAS (H. F.) AND BUSHNELL (L. D.).—*The Production of Carotenoid Pigments from Mineral Oil by Bacteria*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 219, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

393

REED (G. B.), ORR (J. H.) AND REED (R. W.).—*In vitro Action of Sulfonamides on Clostridia. Sulfonamide Inhibitors*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 233, vol. 48, número 2 august 1944. I. E.

394

SCHADE (ARTHUR) AND CAROLINE (LEONA).—*The Preparation of a Polyvalent Dysentery Bacteriophage in a Dry and Stable Form. III. Stability of the Dried Bacteriophage Towards Heat, Humidity, Age and Acidity*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 243, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

395

NETER (Erwin) AND WILL (DESSIE W.).—*Effects of Penicillin on Streptococcal Fibrinolysis*.—*Journal of Bacteriology*, pág. 253, vol. 48, núm. 2 august 1944. I. E.

- 396**
EVANS (ALICE C.).—*Studies on Hemolytic Streptococci. VII. Distinguishing Characters of the Lactosenegative Species of Lancefield's Groups A and C.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 263, vol. 48, núm. 3 september 1944. I. E.
- 397**
EVANS (ALICE C.).—*Studies on Hemolytic Streptococci. VIII. Streptococcus equisimilis.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 267, vol. 48, núm. 3 september 1944. I. E.
- 398**
GAINEY (P. L.).—*Measuring the Growth of Azotobacter.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 285, vol. 48, núm. 3 september 1944. I. E.
- 399**
BROOKS (R. F.) AND HUCKER (G. J.).—*A Study of Certain Members of the Genus Corynebacterium.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 295, vol. 48, núm. 3 september 1944. I. E.
- 400**
DUBIN (I. N.) AND SHARP (D. G.).—*Comparison of the Morfology of Bacillus megatherium with Light and Electron Microscopy.* *Journal of Bacteriology*. Pág. 313 vol. 48, núm. 3 September 1944. I.E.
- 401**
HERRICK (ARTHUR J.) AND KEMPF (J. EMERSON).—*A study of the Fungistatic and Fungicidal Properties and of the Toxicity for Mice of Sodium Azide.* *Journal of Bacteriology*. Pág. 331, vol. 48, núm. 3 September 1944. I.E.
- 402**
MAYER (RUDOLF L.).—*A Yellow Pigment Formed from p-Aminobenzoic Acid by Mycobacterium tuberculosis var. hominis.*—*Journal of Bacteriology*. Pág. 337, vol. 48, núm. 3, September 1944. I. E.
- 403**
PETRIK (FRANK G.).—*Atypical Acid-fast Microorganisms.*—*Journal of Bacteriology*. Pág 347, vol. 48, núm. 3 September 1944. I. E.
- 404**
BORMAN (EARLE K.), STUART (C. A.) AND WHEELER (KENNETH M.).—*Taxonomy of the Family Enterobacteriaceae.*—*Journal of Bacteriology*. Pág. 351, vol. 48, núm. 3, September 1944. I. E.
- 405**
PEARSON (HAROLD E.).—*Distribution of Influenza Virus Type A in Infected Eggs and the Survival of Virus under Certain Conditions of Storage.* *Journal of Bacteriology*. Pág. 369, vol. 48, núm. 3, September 1944. I. E.
- 406**
BURKHOLDER (PAUL R.), McVEIGH (ILDA) AND MOYER (DOROTHY).—*Studies on Some Growth Factors of Yeasts.* *Journal of Bacteriology*. Pág. 385, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.
- 407**
LEE (S.W.), FOLEY (E. J.) AND EPSTEIN (JEANNE A.).—*Mode of Action of Penicillin Activity-Staphilococcus aureus FDA.*—*Journal of Bacteriology*. Pág. 393, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.
- 408**
ROEPKE (RAYMOND R.), LIBBY (RAYMOND L.) AND SMALL (MARGARET H.).—*Mutation or Variation of Escherichia coli with Respect to Growth Requirements.* *Journal of Bacteriology* Pág. 401, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.

409

WICKERHAM (LYNFERD J.), LOCKWOOD (LEWIS B.), PETTIJOHN (O. GLENN) AND WARD (GEORGE E.).—*Starch Hydrolysis and Fermentation by the Yeast Endomycopsis fibuliger.*—*Journal of Bacteriology.* Pág. 413, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.

410

WEBB (HENRY B.), IRISH (OLIVER J.) AND LYDAY (VICTOR I.).—*Effect of Seitz Filtration upon pH.* *Journal of Bacteriology.* Pág. 429, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.

411

FISCHER (E.), HOFFMANN (Q.), PRADO (E.) AND BONE (R.).—*On the Mechanism of Bacteriostasis with Triphenylmethane Dyes.* *Journal of Bacteriology.* Pág. 439, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.

412

HOLLAENDER (ALEXANDER) AND OLIPHANT (JOHN W.).—*The Inactivating Effect of Monochromatic Ultraviolet Radiation on Influenza Virus.* *Journal of Bacteriology.* Pág. 447, vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.

413

GUNSALUS (I. C.) AND CAMPBELL (J. J. R.).—*Diversion of the Lactic Acid Fermentation with Oxidized Substrate.*—*Journal of Bacteriology.* Pág. 455, vol. 48, October 1944. I. E.

414

KOPROWSKI (HILARY) AND LENNETTE (EDWIN H.).—*Pathogenesis of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus Infections in the Developing Chick Embryo.*—*Journal of Bacteriology.* Pág. 463, Vol. 48, núm. 4, October 1944. I. E.

415

NELSON (F. E.).—*Factor Which Influence the Growth of Heat-treated Bacteria. II. Further Studies on Media.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 473, vol. 48, núm. 4 october 1944. I. E.

416

POWELSON (DOROTHY M.) AND McCARTER (JANET R.).—*Serum Albumin as a Food for Human Tubercle Bacilli.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 479, vol. 48, número 4 october 1944. I. E.

417

ZANYIN GAW (H.).—*Isolation and Study of Cultures of Chinese Vetch Nodule Bacteria.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 483, vol. 48, núm. 4 october 1944. I. E.

418

DEVIGNAT (R.).—*A Micro-Glucide Dish.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 491, vol. 48, núm. 4 october 1944. I. E.

419

KATZNELSON (H.).—*Differentiation of Bacillus Polymyxa and Bacillus macerans on the Basis of Vitamin Requirements.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 495, vol. 48, núm. 4 october 1944. I. E.

420

SEVAG (M. G.) AND GREEN (MORRIS N.).—*The Role of Carbohydrates in the Development of Pigment by Staphylococcus aureus.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 496, vol. 48, núm. 4 october 1944. I. E.

421

STUART (C. A.) AND RUSTIGIAN (ROBERT).—*Sucrose Fermentation by Shigella alkalescens.*—*Journal of Bacteriology,* pág. 497, vol. 48, núm. 4 october 1944. I. E.

- 422**
STUART (C. A.) AND RUSTIGIAN (ROBERT).—*Strains of Salmonella cholerae-suis Producing Acetylmethylcarbinol.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 498, vol. 48, número 4 october 1944. I. E.
- 423**
HUNGATE (R. E.).—*Studies on Cellulose Fermentation. I. The Culture and Physiology of an Anaerobic Cellulose-digesting Bacterium.*—*Journal of Bacteriology*, página 499, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 424**
GREISEN (ELIZABETH C.) AND GUNSALUS (I. C.).—*An Alcohol Oxidation System in Streptococci Wich Functions without Hydrogen Peroxide Accumulation.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 515, vol. 48, núm. 5 september 1944. I. E.
- 425**
WAKSMAN (SELMAN A.) AND BUGIE (ELIZABETH).—*Chaetomin, a New Antibiotic Substance Produced by Chaetomium cochliodes. I. Formation and Properties.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 527, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 426**
GEIGER (WALTON B.), CONN (JEAN E.) AND WAKSMAN (SELMAN A.).—*Chaetomin, a New Antibiotic Substance Produced by Chaetomium cochliodes. II. Isolation and Concentration.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 531, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 427**
FRAMPTON (VERNON L.) AND HILDEBRAND (E. M.).—*Electrokinetic Studies on Erwinia amylovora and Phytomonas stewartii in Relation to Virulence.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 537, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 428**
DREA (W. F.).—*Antibacterial Effects of Various Organic Substances upon the H37 Strain of Human Tubercle Bacilli in a Simple Synthetic Medium.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 547, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 429**
CHAPMAN (GEORGE H.).—*The Reliability of Bromthymol-Blue Lactose Agar and Bacto Phenol-Red Mannitol Agar for the Isolation of Pathogenic Staphylococci.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 555, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 430**
PEDERSON (CARL S.) AND BAGG (JOSEPHINE V.).—*The Cause of Variation in the Relationship between Titratable Acidity and Hydrogen Ion Concentration among Lactic Acid Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 559, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 431**
BARTHOLOMEW (J. W.) AND UMBREIT (W. V.).—*Ribonucleic Acid and the Gram Stain.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 567, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 432**
JORDAN (R. C.) AND JACOBS (S. E.) (With the technical assistance of A. L. Sims).—*The Growth of Bacteria with a Constant Food Supply. I. Preliminary Observations on Bacterium coli.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 579, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.
- 433**
ROSEMBLATT (PHILIP), ALTURE-WERBER (ERNA), KASHDAN (FLORENCE) AND LOEWE (LEO).—*A Method for the Determination of Penicillin Levels in Body Fluids.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 599, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.

434

KIRBY (WILLIAM M. M.) AND RANTZ (LOWELL A.).—*Methods of Measuring Penicillin Concentrations in Body Fluids.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 603, vol. 48, número 5 noviembre 1944. I. E.

435

BURROUGHS (A. L.) AND HOLDENRIED (ROBERT).—*Recovery of Relapsing Fever Spirochetes from Ornithodoros turicata. (Duges), 1876, in California.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 609, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.

436

HAJNA (A. A.).—*Use of a «U» Tube for the Isolation of Monophasic Varieties from Diphasic Salmonella Cultures.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 609, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.

437

GUNSALUS (I. C.), NIVEN (C. F.) Jr., AND SHERMAN (J. M.).—*The Identification of «Streptococcus Lactis R» as a Strain of Streptococcus faecalis.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 611, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.

438

LAMBERTI (THOMAS), HUBBARD (ROGER S.) AND NETER (ERWIN).—*Effects of Sulfonamides and Azochloramid on Hemolytic Streptococci in Artificial Wounds of Rabbits.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 612, vol. 48, núm. 5 november 1944. I. E.

439

SEVAG (M. G.) AND GREEN (MORRIS N.).—*The Mechanism of Resistance to Sulfonamides. I. Factors Controlling the Formation of Arylamine from Tryptophane by Staphylococcus aureus.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 615, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.

440

SEVAG (M. G.) AND GREEN (MORRIS N.).—*The Mechanism of Resistance to Sulfonamides. II. Absence of Correlation between Resistance and the Formation of Arylamine by Staphylococcus aureus. Noninterference with the Utilization of Glucose as a Critical Factor in the Development of Resistance to Sulfonamides.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 623, vol. 48, núm. 6 december 1944.

441

SEVAG (M. G.) AND GREEN (MORRIS N.).—*The Mechanism of Resistance to Sulfonamides. III. Pantothenic Acid and Tryptophane Metabolism: The Role of Pantothenic Acid in the Synthesis of Tryptophane by Staphylococcus aureus and the Effect of Vitamins on Tryptophane in Exercising Antagonism to Sulfonamides.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 631, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.

442

RAPER (KENNETH B.), ALEXANDER (DOROTHY F.) AND COGHILL (ROBERT D.).—*Penicillin. II. Natural Variation and Penicillin Production in Penicillium notatum and Allied Species.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 639, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.

443

KLECZKOWSKI (A.) AND THORNTON (H. G.).—*A. Serological Study of Root Nodule Bacteria from Pea and Clover Inoculation Groups.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 661, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.

444

KLECZKOWSKA (J.), NUTMAN (P. S.) AND BOND (G.).—*Note on the Ability of Certain Strains of Rhizobium from Peas and Clover to Infect Each Other's Host Plants.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 673, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.

- 445**
SEVAG (M. G.) AND ROSS (O. A.).—*Studies on the Mechanism of the Inhibitory Action of Zephiran on Yeast Cells.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 677, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.
- 446**
GOETCHIUS (G. R.) AND LAWRENCE (C. A.).—*Te In Vitro Effects of N-Substituted p-Aminobenzoic Acid Derivatives upon Sulfonamides.*—*Journal of Bacteriology*, página 683, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.
- 447**
HARRIS (JOHN O.) AND GAINNEY (P. L.).—*Respiration of Resting Azotobacter Cells as Affected by the Respiratory Menstruum.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 689, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.
- 448**
HOFER (ALVIN W.).—*Flagellation of Azotobacter.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 697, vol. 48, núm. 6 december 1944.
- 449**
EWING (WILLIAM H.).—*Rapid Serological Typing of Shigellae: A Preliminary Note.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 703, vol. 48, núm. 6 december 1944. I. E.
- 450**
A. IMSENECKI.—*On the Structure of Anaerobic Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 1, vol. 49, núm. 1 january 1945. I. E.
- 451**
WOODRUFF (H. BOYD) AND FOSTER (JACKSON W.).—*Microbiological Aspects of Penicillin. VII Bacterial Penicillinase.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 7, vol. 49, número 1 january 1945. I. E.
- 452**
FOSTER (JACKSON W.) AND KAROV (EDWARD O.).—*Microbiological Aspects of Penicillin. VIII. Penicillin from Different Fungi.*—*Journal of Bacteriology*, página 19, vol. 49, núm. 1 january 1945. I. E.
- 453**
SARETT (HERBERT P.) AND CHELDELIN (VERNON H.).—*The Utilization of-Alanine and Pantothenic Acid by Yeasts.*—*Jornal of Bacteriology*, pág. 31, vol. 49, número 1 january 1945. I. E.
- 454**
CHELDELIN (VERNON H.), HOAG (EDWARD H.) AND SARETT (HERBERT P.).—*The Pantothenic Acid Requirements of Lactic Acid Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 41, vol. 49, núm. 1 january 1945. * I. E.
- 455**
LAWRENCE (C. A.).—*Effects of Enzyme Preparations upon Penicillin. I. A. Method for Testing Penicillin for Sterility.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 47, vol. 49, número 1 january 1945. I. E.
- 456**
LAWRENCE (C. A.).—*Effects of Enzyme Preparations upon Panicillin. II. Agents Responsible for Penicillin Inactivation.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 57, vol. 49, número 1 january 1945. I. E.
- 457**
SEVAG (M. G.), SHELBURNE (MYRTLE) AND MUDD (STUART).—*Studies on the Action of Sulfonamides on the Respiration and Growth of Bacteria. A. Factors Controlling the Inhibition by Sulfonamides of Carboxylases. I. Antagonism Between Cocarboxylase and Sulfathiazole.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 65, vol. 49, núm. 1 january 1945. I. E.

458

- SEVAG (M. G.), HENRY (JANE) AND RICHARDSON (RUTH A.).—*Studies on the Action of Sulfonamides on the Respiration and Growth of Bacteria. A. Factors Controlling the Inhibition by Sulfonamides of Carboxylases. II. Antagonism Between Aminobenzoic Acid and Sulfathiazole.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 71, vol. 49, número 1 January 1945. I. E.

459

- SEVAG (M. G.), RICHARDSON (RUTH A.) AND HENRY (JANE).—*Studies on the Action of Sulfonamides on the Respiration and Growth of Bacteria. A. Factors Controlling the Inhibition by Sulfonamides of Carboxylases. III. Antagonism Between Neopeptone and Serum Proteins, and Sulfonamides.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 79, vol. 49, núm. 1 January 1945. I. E.

460

- BENEDICT (ROBERT G.), SCHMITD (WILLIAM H.), COGHILL (ROBERT D.) AND OLESON (A. PAUL).—*Penicillin. III. The Stability of Penicillin in Aqueous Solution.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 85, vol. 49, núm. 1 January 1945. I. E.

461

- WORLEY (GORDON) Jr., AND YOUNG (GERALD).—*The Glanders Organism with Reference to Its Cell Inclusions.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 97, vol. 49, número 1 January 1945. I. E.

462

- BEADLE (G. W.), MITCHELL (H.) AND BONNER (DAVID).—*Improvements in the Cylinder-Plate Method for Penicillin Assay.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 101, volumen 49, núm. 1 January 1945. I. E.

463

- NIVEN (C. F.) Jr., EVANS (J. B.) AND WHITE (J. C.).—*Oxidation of Butyric Acid by Streptococci.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 105, vol. 49, núm. 1 January 1945. I. E.

464

- HOFFSTADT (RACHEL E.).—*Use of Horse Meat Infusions in Culture Mediums.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 106, vol. 49, núm. 1 January 1945. I. E.

465

- GARNJOBST (LAURA).—*Cytophaga columnaris (Davis) in Pure Culture: A. Myxobacterium Pathogenic to Fish.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 113, vol. 49, número 2 February 1945. I. E.

466

- SEVAG (M. G.), HENRY (JANE) AND RICHARDSON (RUTH A.).—*Studies on the Action of Sulfonamides on the Respiration and Growth of Bacteria. B. Factors Influencing the Correlation of the Inhibition of Respiration with the Inhibition of Growth of Escherichia coli, Pneumococcus, Type 1, and Staphylococcus aureus. I. The Interference of the Evolution of Hydrogen with the Measurement of the Inhibition of Oxygen Consumption in Escherichia coli.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 129, vol. 49, núm. 2 February 1945. I. E.

467

- SEVAG (M. G.), RICHARDSON (RUTH A.) AND HENRY (JANE).—*Studies on the Action of Sulfonamides on the Respiration and Growth of Bacteria. B. Factors Influencing the Correlation of the Inhibition of Respiration with the Inhibition of Growth of Escherichia coli, Pneumococcus, Type 1, and Staphylococcus aureus. II. Effect of Serum on the Inhibition of Respiration and Growth of Pneumococcus, Type 1, and Staphylococcus aureus by Sulfonamides and p-Aminobenzoic Acid.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 139, vol. 49, núm. 2 February 1945. I. E.

- 468**
LAWRENCE (C. A.).—In Vitro Studies on the Antibacterial Action of para-Aminomethylbenzenesulfonamide Derivatives.—*Journal of Bacteriology*, pág. 149, vol. 49, número 2 february 1945. I. E.
- 469**
HOLTMAN (D. FRANK).—Corynebacterium equi in Chronic Pneumonia of the Calf. *Journal of Bacteriology*, pág. 159, vol. 49, núm. 2 february 1945.
- 470**
JENNINGS (ROBERT K.).—Starch Digestion by Vibrio cholerae in Strongly Aerated Media.—*Journal of Bacteriology*, pág. 163, vol. 49, núm. 2 february 1945. I. E.
- 471**
PERLMAN (DAVID).—Some Effects of Metallic Ions on the Metabolism of Aerobacter aerogenes.—*Journal of Bacteriology*, pág. 167, vol. 49, núm. 2 february 1945. I. E.
- 472**
WHELTON (RITA) AND DOUDOROFF (MICHAEL).—Assimilation of Glucose and Related Compounds by Growing Cultures of Pseudomonas saccharophila.—*Journal of Bacteriology*, pág. 177, vol. 49, núm. 2 february 1945. I. E.
- 473**
COLEMAN (MADELINE F.) AND REID (J. J.).—A Serological Study of Strains of Alcaligenes radiobacter and Phytomonas tumefaciens in the «M» and «S» Phases.—*Journal of Bacteriology*, pág. 187, vol. 49, núm. 2 february 1945. I. E.
- 474**
SCHWEINBURG (FRITZ B.) AND YETWIN (I. JACQUES).—Sulfamethazine: in Vitro Action on Enteric Pathogens as Compared with Sulfadiazine and Sulfamerazine.—*Journal of Bacteriology*, pág. 193, vol. 49, núm. 2 february 1945. I. E.
- 475**
HESELBROCK (W.) AND FOHAY (LEE).—The Morphology of Bacterium tularense.—*Journal of Bacteriology*, pág. 209, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 476**
FOSHAY (LEE) AND HESELBROCK (W.).—Some Observations on the Filtrability of Bacterium tularense.—*Journal of Bacteriology*, pág. 233, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 477**
MORTON (HARRY E.) AND PEREZ-OTERO (J. ENRIQUE).—The Increase of Bacteriophage in Vivo During Experimental Infections with Shigella paradysenteriae, Flexner, in Mice.—*Journal of Bacteriology*, pág. 237, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 478**
MORTON (HARRY E.) AND ENGLELY (FRANK B.) Jr.—The Protective Action of Dysentery Bacteriophage in Experimental Infections in Mice.—*Journal of Bacteriology*, pág. 245, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 479**
SPIEGELMAN (S.) AND LINDEGREN (C. C.).—The Relation of Sporulation and the Range of Variation of the Haplophase to Populational Adaptation.—*Journal of Bacteriology*, pág. 257, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 480**
PERLMAN (DAVID) AND McCOY (ELIZABETH).—Some Effects on Induced Streptothricin Resistance on Lactobocillus casei.—*Journal of Bacteriology*, pág. 271, volumen 49, núm. 3 march 1945. I. E.

- 481**
HOOPERHEIDE (J. C.).—*The Germicidal Properties of Certain Quarternary Ammonium Salts with Special Reference to Cetyl-Trimethyl-Amonium Bromide.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 277, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 482**
LEONIAN (LEON H.) AND GREENE LILLY (VIRGIL).—*Conversion of Desthiobiotin into Biotin or Biotinlike Substances by Some Microorganisms.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 291, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 483**
MARKS (H. C.), WYSS (ORVILLE) AND STRANDSKOV (FREDE B.).—*Studies on the Mode of Action of Compounds Containing Available Chlorine.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 299, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 484**
GAREY (C. J.), RITTSCHOF (L. A.), STONE (LEONARD) AND S. BORUFF (C. S.).—*A Study of Cultural Methods for the Quantitative Determination of Bacterial Populations of Distillery Mash.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 307, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 485**
HOLMES (LIDA F.) AND WILSON (MARY E.).—*A Micrococcus Producing a Mulberry-colored Pigment.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 311, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 486**
SCHUHARDT (V. T.) AND O'BRYAN (BILLIE E.).—*Effect of Intracranial Penicillin Therapy on Brain Involvement in Experimental Relapsing Fever.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 312, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 487**
HOLTMAN (D. FRANCK).—*Increasing Penicillin Yields with Corn Oil.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 313, vol. 49, núm. 3 march 1945. I. E.
- 488**
MACKINNON (JUAN E.) AND ARTAGAVEYTIA-ALLENDE (RICARDO C.).—*The So-Called Genus Candida Berkhout, 1923.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 317, volumen, 49, núm. 4 april 1945. I. E.
- 489**
CURRAN (HAROLD R.) AND EVANS (FRED R.).—*Heat Activation Inducing Germination in the Spores of Thermotolerant and Thermophilic Aerobic Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 335, vol. 49, núm. 4 april 1945. I. E.
- 490**
GUNSALUS (I. C.) AND UMBREIT (W. W.).—*The Oxidation of Glycerol by Streptococcus faecalis.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 347, vol. 49, núm. 4 april 1945. I. E.
- 491**
CONN (H. J.), BOTTCHEER (ELIZABETH J.) AND RANDALL (CHALLISS).—*The Value of Bacteriophage in Classifying Certain Soil Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, página 359, vol. 49, núm. 4 april 1945. I. E.
- 492**
KNAYSI (GEORGES).—*On the Microscopic Methods of Measuring the Dimensions of the Bacterial Cell.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 375, vol. 49, núm. 4 april 1945. I. E.
- 493**
SEVERENS (J. M.) AND TANNER (F. W.).—*The Inheritance of Environmentally Induced Characters in Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 383, vol. 49, núm. 4 april 1945. I. E.

- 494**
REEVES (MAX D.) AND SCHMIDT (WILLIAM H.).—*Penicillin. IV. A. Device for Placing Cylinders on Assay Plates.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 395, vol. 49, número 4 abril 1945. I. E.
- 495**
ADAMS (MARK H.) AND ROE (AMY S.).—*A Partially Defined Medium for Cultivation of Pneumococcus.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 401, vol. 49, núm. 4 abril 1945. I. E.
- 496**
SCHMIDT (WILLIAM S.), WARD (GEORGE E.) AND COGHILL (ROBERT D.).—*Penicillin. VI. Effect of Dissociation Phases of Bacillus subtilis on Penicillin Assay.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 411, vol. 49, núm. 4 abril 1945. I. E.
- 497**
RUSTIGIAN (ROBERT) AND STUART (C. A.).—*The Biochemical and Serological Relationships of the Organisms of the Genus Proteus.*—*Journal of Bacteriology*, página 419, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 498**
STUART (C. A.), VAN STRATUM (ELIZABETH) AND RUSTIGIAN (ROBERT).—*Further Studies on Urease Production by Proteus and Related Organisms.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 437, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 499**
GRAY (WILLIAM D.).—*The Sugar Tolerance of Four Strains of Distillers' Yeast.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 445, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 500**
BERGEIM (OLAF), KLEINBERG (JAKOB) AND KIRCH (E. R.).—*Oxidation-Reduction Potentials of the Contents of the Gastrointestinal Tract.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 453, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 501**
TOBIE (WALTER C.).—*A Prospected Biochemical Basis for the Genus Pseudomonas.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 459, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 502**
WOLF (PAUL A.).—*A Medium Containing an Acid Casein Hydrolyzate for Use in Testing Disinfectants.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 463, vol. 49, núm. 5 may 1945.
- 503**
KNAYSI (GEORGES).—*A Study on Some Environmental Factors Which Control Endospore Formation by a Strain of Bacillus mycoides.*—*Journal of Bacteriology*, página 473, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 504**
STOKES (J. L.) AND LARSEN (ALMA).—*Amino Acid Requirements of Acetobacter suboxydans.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 495, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 505**
REED (G. B.).—*Clostridium parasporogenes, an Invalid Species.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 503, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 506**
FLORMAN (ALFRED L.) AND WEISS (ALICE B.).—*Storage of Influenza Virus for Use in Typing Clinical Cases.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 507, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 507**
RANDALL (CHARLES C.) AND BRUNER (DORSEY W.).—*A new Type Salmonella.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 511, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.

- 508**
DEACON (WILBUR E.).—*A Note on the Tribe Mimeae (De Bord).*—*Journal of Bacteriology*, pág. 511, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 509**
EDWARDS (P. R.).—*A Paracolonic Bacillus Isolated from Colitis in an Infant.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 513, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 510**
WILCOX (KINGSTON S.), EDWARDS (P. R.) AND COATES (MARGARET).—*A New Salmonella Type: Salmonella papuana.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 514, vol. 49, número 5 may 1945. I. E.
- 511**
PICKETT (M. J.), HOEPRICH (P. D.) AND GERMAIN (R. O.).—*Purification of High Titer Tetanus Toxin.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 515, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 512**
HAJNA (A. A.).—*Triple-Sugar Iron Agar Medium for the Identification on the Intestinal Group of Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 516, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 513**
HAJNA (A. A.) AND PERRY (C. A.).—*Salmonella Types Isolated in Maryland Between 1936 and 1943.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 518, vol. 49, núm. 5 may 1945. I. E.
- 514**
MUDD (STUART).—*Can Chemotherapy Be Extended to Include the Intracellular Disease Agents?*—*Journal of Bacteriology*, pág. 527, vol. 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 515**
IMSENECKI (A.) AND SOLNZEVA (L.).—*The Growth of Aerobic Thermophilic Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 539, vol. 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 516**
VARRÉN (GEORGE H.).—*The Antigenic Structure and Specificity of Luminous Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 547, vol. 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 517**
NAGHSKI (JOSEPH), WHITE (JONATAN W.) Jr., HOOVER (SAM R. AND WIL-LAMAN (J. J.).—*Anaerobic Fermentation of Cryptostegia Leaves for Recovery of Rubber.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 563, vol. 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 518**
GOETCHIUS (G. R.) AND LAWRENCE (C. A.).—*Series of New Sulfonamides Which Are Unaffected by p-Aminobenzoic Acid.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 575, volumen 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 519**
REILLY (H. CHRISTINE), SCHATZ (ALBERT) AND WAKSMAN (SELMAN A.).—*Actin-fungal Properties of Antibiotic Substances.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 585, volumen 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 520**
KALNITSKY (GEORGE), UTTER (M. F.) AND WERKMAN (C. H.).—*Active Enzyme Preparations from Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 595, vol. 49, núm. 6 june 1945. I. E.
- 521**
MAC NEAL (WARD J.) AND BLEVINS (ANNE).—*Bacteriological Studies in Endocarditis.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 603, vol. 49, núm. 6 june 1945. I. E.

522

SANDERS (DOROTHY W.), WEATHERWAX (PAUL) AND McCLUNG (L. S.).—*Antibacterial Substances from Plants Collected in Indiana.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 611, vol. 49, núm. 6 June 1945. I. E.

523

KNAYSI (GEORGES).—*Investigation of the Existence and Nature of Reserve Material in the Endospore of a Strain of Bacillus mycoides by an Indirect Method.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 617, vol. 49, núm. 6 June 1945. I. E.

524

THOMAS (A. R.) Jr., AND LEVINE (MAX).—*Some Effects of Penicillin on Intestinal Bacteria.*—*Journal of Bacteriology*, pág. 623, vol. 49, núm. 6 June 1945. I. E.

525

WYNNE (E. S.) AND WILLIAMS (O. B.).—*Growth of Eberthella typhosa and Aerobacter aerogenes in Association in Tetrathionate Broth.*—*Journal of Bacteriology*, página 629, vol. 49, núm. 6 June 1945. I. E.

526

FASTIER (L. B.).—*A Bacteriophagelike Principle for Pseudomonas pyocyanea (Pseudomonas aeruginosa).*—*Journal of Bacteriology*, pág. 633, vol. 49, núm. 6 June 1945. I. E.

Fotocopias en Microfilm (Unidad = fotograma formato Leica, 24 × 36 mm.)

a) En rollo de cinta continua.

b) En filmofichas.

La modalidad «filmoficha» por la gran facilidad de ordenación, archivación, localización rápida de cintas y manejo de lectura, supera con mucho a la modalidad en rollo. Se llama «filmoficha» una tira de película de cinco fotogramas y medio (en otros sistemas seis), en que caben diez páginas de libro ordinario (libro abierto, o sea dos páginas cada foto). El medio fotograma que se añade (uno entero entero en otros sistemas) se destina a «referencia», es decir, título y signatura en la filmoteca y en el centro de origen. Las filmofichas, para ofrecer tales ventajas, van alojadas en unas carpetas «Filmoteca» especialmente dispuestas para contener diez de ellas (cien páginas o cincuenta folios) en lóculos perfectamente adaptados con sus referencias numéricas y espacio preciso para títulos, páginas y toda clase de indicaciones útiles.

Fotocopias en papel.

En positivo; a diversos tamaños; se sirve juntamente el negativo en película, sin aumento de precio, si se pide.

Precios:

En microfilm: 50 céntimos por fotograma. Mínimo pagable: 2,50 ptas. (una filmoficha).

Carpeta «Filmoteca»: 2 ptas. Para cien páginas.

En papel: tamaño 9 × 12 cms., 2 ptas.; 13 × 18 cms., 2,50 ptas.; 18 × 24 cms., 3 ó 4 pesetas según el papel. Tamaños mayores, precio a convenir en cada caso.

NORMAS PARA LOS COLABORADORES

a) Los originales, acompañados de un resumen en el idioma respectivo, deberán ir cuidadosamente escritos a máquina, a doble espacio, por una sola cara del papel (preferible holandesa o folio) y con márgenes suficientes, indicándose, en cada caso, el Centro donde ha sido realizado el trabajo.

b) Los escritos en español se publicarán con el resumen propio y la traducción de éste a, por lo menos, un idioma diferente, que elegirá la Revista cuando no lo indicara el colaborador; los trabajos extranjeros aparecerán traducidos, con el resumen de origen y otro en español. De las traducciones se encargará la Redacción de MICROBIOLOGÍA.

c) Como norma general, los originales se redactarán en forma concisa, sin perjuicio del necesario desarrollo de los temas, y se evitará la descripción de métodos ya establecidos indicando la referencia correspondiente. La literatura científica se reducirá a aquella que tenga relación directa con el tema tratado, salvo en las revisiones y estudios análogos, en que la parte bibliográfica podrá alcanzar la amplitud conveniente.

d) Los dibujos, en hoja aparte, irán a tinta china, agrupados de manera que exijan el menor número y extensión de fotograbados; letras y números, a lápiz, para ponerlos a escala. Cuadros, fotografías y dibujos llevarán al pie la oportuna leyenda y la indicación del lugar que deben ocupar en el texto.

e) Las citas bibliográficas, al final del original y numeradas alfabéticamente, se ajustarán al siguiente orden: apellidos del autor, nombre (inicial), año, título del trabajo (si se indica), nombre abreviado de la Revista (subrayado), tomo y páginas inicial y final del trabajo; en los libros se indicará: apellidos, inicial del nombre, año, título completo de la obra, tomo, páginas, inicial y final de la cita (o capítulo), edición (no citada, se sobreentiende es la primera), editorial y población.

Ejemplos:

JORDÁN DE URRÍES, M. 1947. La sexualidad en una raza española de *Sphacelotea sorghi* (Lk.) Clint. MICROB. ESPAÑ. I: 69-80.

MARCILLA, J. Tratado práctico de Viticultura y Enología españolas. II (Enología): 88-104. 2.^a ed. S.A.E.T.A. Madrid.

f) Efectuadas las oportunas correcciones, los colaboradores devolverán las pruebas en el plazo máximo de ocho días a partir de la fecha en que las recibieron.

g) De aquellos trabajos que tengan un solo autor, se entregarán a éste veinticinco ejemplares; si fuesen dos los autores, corresponderán quince a cada uno, y si son tres o más, diez. El autor que desee mayor número de ejemplares deberá hacerlo constar al devolver las pruebas, siendo de su cuenta el importe de los que excedan de la cantidad fijada.

h) La Revista no se hace solidaria de los conceptos expuestos en los trabajos publicados, la responsabilidad de los cuales corresponde a sus autores.