

VOLUMEN 7

JULIO-SEPTIEMBRE 1954

NUM. 3

# *Microbiología Española*

*Publicada por  
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
MADRID

## OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

**ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISILOGIA VEGETAL.**—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

**ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».**—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuidas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

**ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».**—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

**COLLECTANEA BOTANICA.**—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona. Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

**FARMACOGNOSIA.**—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

**GENETICA IBERICA.**—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.



## SUMARIO

Página

### CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

- Cultivo: «in vitro» de simbioses intracelulares de insectos,  
por Julio Pérez Silva ..... 187

### INFORMACION

- Actas de la Sociedad ..... 255

SE SUPLICA EL CAMBIO  
ON PRIE L'ECHANGE  
AUSTAUSCH ERWUNSCHT  
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA  
DEBE DIRIGIRSE A  
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA  
SERRANO, 113 ó 152 - MADRID - (ESPAÑA)

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

VOLUMEN 7

JULIO-SEPTIEMBRE 1954

NUM. 3

# *Microbiología Española*

*publicada por  
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología  
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
MADRID

## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director  
del Instituto "Jaime Ferrán" de Micro-  
biología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de  
la Sociedad de Microbiólogos Españo-  
les.

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

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

## CULTIVO «IN VITRO» DE SIMBIOTES INTRACELULARES DE INSECTOS

por  
Julio Pérez Silva.

### PARTE PRIMERA

#### BOSQUEJO HISTORICO

Es de suponer que desde que se hicieron las primeras disecciones en insectos repararan los zoólogos en el tejido o sistema que hoy conocemos con el nombre de cuerpo graso, puesto que en la inmensa mayoría de los casos ocupa gran parte del abdomen, formando una especie de red que envuelve a los demás órganos abdominales y rellena huecos entre éstos.

No es extraño tampoco que observaran, cuando se empezaron a utilizar lentes en los estudios de anatomía interna de insectos los órganos más o menos esféricos que se encuentran en el abdomen de muchos insectos y que fueron denominados por Sulc en 1910 (51) con el nombre de micetomas. Este investigador observó además que dichos órganos estaban constituidos por unas células especiales cuyo protoplasma contenía unos microorganismos levaduriformes y que, por esta razón, llamó micetocitos.

Ahora bien; estos micetocitos ya habían sido observados por Blochmann en 1887 (25, 29, 31), trabajando con *Periplaneta orientalis*, pero aquí no se encontraban reunidos formando un micetoma localizado, sino que los micetocitos se encontraban entre las células grasas del cuerpo graso y dispuestos en hileras. En otros insectos como *Pirrococcus apterus*, *Coccinella septempunctata*, *Zonabris 6-*

punctata, según nuestras observaciones, los micetocitos están en el cuerpo graso, no de una manera ordenada, sino que se encuentran diseminados entre los adipocitos.

Hechas estas consideraciones, nosotros, al iniciar este bosquejo histórico de los estudios sobre simbiosis intracelular, creemos necesario incluir además de los trabajos que versan sobre el micetoma considerado como órgano localizado, todos aquellos que tratan de los micetocitos del cuerpo graso porque, al fin y al cabo, el conjunto de todos éstos constituye un verdadero micetoma.

Las descripciones que del cuerpo graso se han hecho, aunque se refieren a diferentes especies de insectos, todas tienen puntos comunes, es decir, que este tejido o sistema varía muy poco de unos insectos a otros; de este modo ha sido fácil reunir las distintas descripciones en una sola sin necesidad de establecer excepciones ni abusar del término «generalmente».

Las descripciones que hemos encontrado en la bibliografía son las siguientes:

Packard (32), dice que consiste en un acúmulo de grandes células llenas de pequeñas gotitas de grasa, añade que puede ser de varias formas y que cubre o envuelve porciones de las vísceras, además hay una capa de este tejido debajo de la cutícula. Lo relaciona con las tráqueas diciendo que las terminaciones traqueales están casi siempre envueltas por cuerpo graso.

Establece diferencias entre el cuerpo graso de las larvas y el de los adultos diciendo que en aquéllos es más abundante que en éstos, especialmente en los Lepidópteros. Le atribuye una función de reserva que se consume durante la metamorfosis y en la formación de óvulos y espermatozoides.

Este autor, Packard, según nuestras observaciones, dió unas características morfológicas bastante exactas; sin embargo, como hemos visto, no menciona para nada las células cargadas de corpúsculos que ya Blochmann había descubierto en 1887 en el cuerpo graso de *Periplaneta orientalis*. Sin duda Packard no conocía los trabajos de Blochmann.

Ya en la obra de Parker and Haswell (1949) «A text-book of Zoology», en la página 494 de la sexta edición, se mencionan unos minúsculos gránulos en el protoplasma de las células del cuerpo graso. Transcribimos la descripción: «consiste en una masa de células poligonales que limitan

externamente al hemocele. Cuando jóvenes las células son nucleadas y poseen un cuerpo protoplasmático. En estado más avanzado se llena el protoplasma de un fluido cargado de minúsculos gránulos, y a veces almacena también cristales de sales del ácido úrico. Después estos cristales son absorbidos.

Aquí, según esta descripción, los gránulos no escapan a la observación; sin embargo, tampoco los relacionan con los microbios ya observados en las células del cuerpo graso. Este hecho también indica el desconocimiento de la literatura referente al cuerpo graso, pues ya habían publicado, además de Blochmann, Mercier (1906), Javelly (1914) y toda la serie de investigadores que no sólo habían descrito estos microorganismos endocelulares en diferentes insectos, sino que ya habían intentado su cultivo en medios artificiales.

También del micetoma propiamente dicho se han encontrado descripciones mucho antes de que Sûlc descubriera los simbioses en su interior. El descubrimiento de este órgano se debe a Hooke y a Swammerdam (22), este último autor hace en su «Bibel der Natur» una descripción del micetoma de *Pediculus capitis* acompañada de dibujos bastante exactos. La traducción de esta descripción es como sigue: «Por el lado ventral y un poco más anterior que el punto medio del abdomen, se ve un disco que Hooke supone que es el hígado. Pero yo, por mi parte, consideraría esta formación como tal glándula si tuviera más razones para ello. Su color no es siempre blanco, sino que muchas veces es amarillo limón. No se puede separar fácilmente del estómago, donde está adherido. Bajo la lupa se puede disociar fácilmente en muchos granulillos a modo de pequeñas glándulas no muy transparentes. Observándolas después de esta disociación se ven dentro tráqueas. Su forma varía de unos piojos a otros e incluso en el mismo individuo. Su tamaño también varía, pero siempre es redondo y se encuentra sobre el estómago.»

Después de Hooke y de Swammerdam han seguido una serie de autores que han trabajado en el micetoma del piojo, no sólo en el del hombre, sino además en el de los animales. Las descripciones modernas del micetoma de las especies del género *Pediculus* todas coinciden; vamos a transcribir la de Ries (38): «El disco estomacal del piojo humano consiste en un sincitio con 10-16 cámaras dispuestas radialmente, separadas las unas de las otras por delgados septos. En estas cavidades están los simbioses. Si observamos una larva recién nacida, podemos ver las cámaras

llenas de bacterias que tienen forma de salchicha y que están irregularmente dispuestas. Estas bacterias en los cortes histológicos se tiñen muy bien con los colorantes nucleares y sus granulaciones fuertemente cromáticas dan lugar a una estructura parecida a un panal.»

Koch (22) y Buxton (10) hacen descripciones del micetoma de *Pediculus capitis* que coinciden casi exactamente con la de Ries.

Puesto que difieren muy poco unas de otras, no vamos a transcribir aquí todas las descripciones que hemos encontrado en la literatura. Ya de lo que hemos expuesto podemos sacar la idea de que el órgano o tejido albergador de simbioses puede estar constituido por micetocitos reunidos o por micetocitos diseminados por el cuerpo graso del insecto.

Lo que ya no ha sido tan fácil es la interpretación del micetoma; al principio, en tiempos de Swammerdam, como ya hemos señalado, se le consideró como un hígado, como lo hizo Hooke, aunque Swammerdam siguiera llamándole «órgano enigmático». Más tarde, Berlese (4), en sus primeros trabajos, le dió el nombre de «órgano de función desconocida».

Ya desde mediados del siglo pasado, comenzó a designársele con términos más significativos. Así, por ejemplo, Huxley, en 1858 le llama «pseudovitelo» equiparándolo al vitelo de un huevo (51); en 1886, Metchnikoff le atribuye una función nutritiva y le dió el nombre de «secondary yolk» (51); otros, como Balbiani (1886), estudiando la biología de los Afidos, lo relacionan con la partenogénesis (51).

No faltan quienes, como Graber y Landois, lo relacionan con la respiración, considerándolo el primero como un «pulmón plurilobulado» y basándose el segundo en la íntima relación que existe entre el cuerpo graso y las tráqueas (32).

A medida que se fué empleando el microscopio en los trabajos de anatomía de insectos, las interpretaciones del micetoma fueron acercándose a la verdad, aunque todavía, en la actualidad, no se haya podido determinar su función de una manera categórica y evidente.

Desde que se empezó a ver concreciones de uratos y de ácido úrico en el interior de las células del cuerpo graso, éste fué considerado por muchos autores como un órgano excretor, relacionándolo con los tubos de Malpígio; entre estos autores están: Fabre (1862), Cuenot (1896), Heneguy (1904), Prenant (1904) y otros que no llegaron a ver nada más que inclusiones inertes.

Sin embargo, Blochmann (1887) (51), trabajando con *Peripla-*

*neta orientalis*, vió en determinadas células de su cuerpo grasos unos corpúsculos alargados que consideró como bacterias basándose en la morfología; quiso probarlo por medio del cultivo en medios artificiales, pero fracasó en su intento.

Este fracaso de Blochmann, según nuestra opinión, fué debido a que empleó los medios de cultivo más corrientes, en los cuales estos simbioses intracelulares no se desarrollan, puesto que requieren para ello medios más complejos.

A pesar de que Blochmann no consiguió el cultivo, su descubrimiento, según nosotros hemos deducido de la literatura, hace cambiar completamente la idea que del cuerpo graso se tenía: el cuerpo graso pasa a ser un órgano o sistema que alberga microorganismos. No obstante, como suele ocurrir en estos casos, surgen dos corrientes: los clásicos, inertes a todo cambio, que consideran los corpúsculos todo lo más como mitocondrias, y los múltiples autores posteriores a Blochmann, que no sólo encuentran bacterias, sino que además describen levaduras y rickettsias en determinados insectos.

Los partidarios de las mitocondrias fueron disminuyendo, y, en 1922, recibieron el golpe de gracia de manos de Cowdry y Olisky, quienes lograron establecer claras diferencias tintoriales entre bacterias y mitocondrias.

No nos ha sido posible conseguir el original de este interesante trabajo de Cowdry y Olisky, sino que los resultados de sus experiencias llegaron a nuestro conocimiento a través de una de las obras de Gier (12), donde este autor los menciona; estos son: «Las bacterias no se tiñen con verde Janus B a diluciones mayores de 1 : 60.000, mientras que las mitocondrias se tiñen perfectamente a diluciones de 1 : 500.000. Las mitocondrias no se tiñen por la coloración de Giemsa después de haber fijado con cualquiera de los fijadores; ni toman ningún colorante después de la fijación con alcohol o con el fijador de Bouin.»

A la par que se va consolidando la idea de que el cuerpo graso es un órgano o sistema que puede albergar simbioses, y se van observando éstos en los micetocitos de cuerpos grasos o de micetomas de diferentes insectos, van surgiendo tres problemas fundamentales, que son:

- a) El significado de los simbioses.
- b) Susceptibilidad de aislamiento en medios artificiales.
- c) Naturaleza de los mismos.

La primera cuestión puede ser considerada como una continuación del problema de la función del micetoma; ya sabemos que el micetoma de los insectos sirve de albergue a sus simbioses microbianos intracelulares, pero ¿qué efectos causan éstos sobre su huésped? Una vez que se descartó la idea de que estos microorganismos fueran simplemente parásitos y se les consideró como verdaderos simbioses, esta pregunta se cambió por otra: ¿de qué le sirven los simbioses al insecto?

Son muchos los autores que han dado contestación a esta pregunta con teorías que, aunque algunas son más o menos especulativas, no faltan las basadas en ingeniosas y finas experiencias.

Nosotros vamos a comentar las siguientes:

Glaser (1920) (14), de sus estudios sobre la simbiosis intracelular en *Parcoblatta virginica* y *Periplaneta americana*, deduce que los simbioses le sirven al insecto como un órgano digestivo. Nosotros hemos leído este trabajo y no hemos encontrado en él experiencias que conduzcan a esta conclusión.

Blewett y Fraenkel (1943) (5), después de trabajar con *Lasioderma serricorne* y *Sitodrepa panicea*, llegan a la conclusión de que dichos microorganismos simbioses constituyen fuentes de vitaminas que son imprescindibles para el completo desarrollo del huésped.

Ries (1930) (38) les achaca, trabajando con *Pedicúlicos*, una función digestiva. Esta consecuencia la saca del hecho observado por dicho investigador, de que en todas las especies del grupo *Ichnocera* que, exceptuando los *Trichodectidos*, se alimentan exclusivamente de plumas, se pueden observar micetomas o, al menos, micetocitos aislados; mientras que éstos faltan en todos los *Amblicera*, los cuales no tienen una alimentación especializada.

También Weurman (1945) (53) atribuye una función digestiva a los simbioses intracelulares, aportando el hecho de que en *Triatoma infestans* los simbioses quedan libres en la luz del proventrículo y aquí intervienen en la digestión de la sangre.

Hans Bode (1936) (6), que trabajó con técnicas muy correctas en el cultivo de cucarachas en medios asépticos, hace el siguiente comentario: «Buchner y sus discípulos Aschner y Ries creen que los microorganismos son indispensables para el crecimiento normal y suministran al organismo animal algunas sustancias desconocidas aún. A esto se oponen Müller y Schwartz, que rechazan toda generalización por infundada; Müller ha

visto que en *Anobidos* y *Cerambycidos* hay un parasitismo cíclico moderado del simbiote para con el huésped.» Para aclarar esto hace cultivos de cucarachas, suministrándole alimentos variados y estériles, viendo así los efectos que producía sobre las larvas la ausencia de algunas vitaminas. De esta manera llega a las conclusiones de que, aunque los simbioses son indispensables para el desarrollo normal y completo del huésped, sin embargo, no son suficientes, puesto que al menos en *Periplaneta americana*, el defecto de vitaminas en la alimentación no pudo ser compensado por la existencia de simbioses.

Bruce (1945) (4) llega a decir que estos microorganismos no son indispensables para el desarrollo del insecto, aunque no son parásitos, sino simbioses.

En la obra de Steinhilber (1949) (51) «Principles of Insect Pathology», que tiene un capítulo dedicado a los microorganismos intracelulares, se lee, en la página 128: «En estos últimos años se han aportado pruebas experimentales que demuestran que la mayoría de los simbioses no son perjudiciales, sino que, por el contrario, son beneficiosos para su huésped.» Muchos de estos experimentos se han basado en lo que ocurre cuando se despoja al insecto de sus simbioses.

También se lee en esta obra que, «al menos en algunos insectos, los microorganismos simbioses son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico de manera que sea aprovechable para el insecto».

Glaser (1946) (17) manifiesta que los difteroides del cuerpo graso de los *Blattidos* están relacionados íntimamente con los huéspedes hembras y están biológicamente ligados al desarrollo de los ovarios.

Ante esta diversidad de interpretaciones, la mayoría de ellas más o menos fundamentadas, nosotros creemos lógica la posición de Müller y de Schwartz, que «rechazan toda generalización por infundada». Sin duda el papel que los simbioses desempeñan no es el mismo en todos los grupos de insectos.

Nosotros, como consecuencia de las investigaciones que constituyen esta tesis, nos consideramos autorizados a opinar que, al menos en los insectos que han sido objeto de nuestro estudio, el micetoma (conjunto de micetocitos distribuidos por el cuerpo graso) está íntimamente relacionado con el metabolismo del huésped y además viene a ser como una glándula de secreción interna que actúa sobre el desarrollo sexual, sobre todo de los individuos hembras.

### Cultivo de los simbioses intracelulares en medios artificiales.

Ya hemos dicho que Blochmann en 1887 intentó cultivar los de la cucaracha, *Periplaneta orientalis*, y no lo logró. Este fracaso de Blochmann fué seguido de otros intentos, frustrados también, por parte de Krassiltschik (1889) (13) y Forber (1892) (13), quienes también trabajaron con *Periplaneta orientalis*.

Más adelante, cuando vayamos a terminar este bosquejo histórico, intentaremos dar una explicación de estos fracasos y de los demás que ahora mencionaremos, así como de los resultados falsamente positivos que nos encontraremos en la literatura.

En 1906, Mercier (29), en su trabajo «Les corps bacteroides de la Blatte (*Periplaneta orientalis*)», manifiesta haber cultivado un bacilo esporulado, al que da el nombre de *Bacillus cuenoti*. Empleó como material de siembra el contenido de las ootecas y como medio de cultivo el caldo común.

Sin embargo, en 1914, Javelly (26) repite las experiencias de Mercier y no obtiene ningún resultado positivo, a pesar de haber empleado diversos medios de cultivo; por esto termina su trabajo afirmando que el bacilo cultivado por Mercier no tiene ninguna relación con los «bacteroides» de la cucaracha y que éstos aún no habían sido cultivados. Incluso llega a dudar de la naturaleza bacteriana de estos corpúsculos intracelulares.

El hecho de que los simbioses intracelulares hayan sido descubiertos en los Blattidos y no en otros insectos se debe, a nuestro juicio, a que en esta familia los simbioses presentan una evidente forma bacteriana; sin embargo, tanto en las especies de Coleopteros y Hemipteros que nosotros hemos estudiado, como en los casos que nosotros hemos visto en la literatura, en la mayoría de ellos los simbioses están dotados de un pleomorfismo tan acusado que, a primera vista, nos hacen pensar en granulaciones endocelulares antes que en microorganismos.

Por consiguiente, no es raro que la morfología de los simbioses intracelulares de los Blattidos induzcan al bacteriólogo a intentar su cultivo. Uniendo a esto el hecho de que los simbioses intracelulares requieren para su cultivo en medios artificiales que éstos posean ciertos factores de crecimiento que aún no han sido determinados, tenemos por resultado el que se hayan estrellado contra el fracaso numerosos zoólogos y bacteriólogos que han intentado el cultivo. A pesar de todo, la literatura nos dice

que ha habido una serie de investigadores que con los medios de cultivo más comunes han obtenido resultados positivos.

Por estas causas, como hasta ahora ha ocurrido, nosotros continuamos encontrándonos con trabajos que versan todos sobre la simbiosis en las Blattidos y que cada uno de los cuales se opone al anterior. Esta serie de trabajos se extiende hasta la actualidad, a la que se llega sin resolver este difícil problema.

En efecto:

En 1920 Glaser (14) comunica que en sus trabajos de aislamiento de microbios intracelulares en *Parcoblatta virginica* y *Periplaneta americana*, ha cultivado un espirilo de cada una de estas especies. No dice en qué medio aísla, pero da gran cantidad de características culturales, y añade que no se parecen al *Bacillus cuneoti*, puesto que no forman endosporos.

Este mismo autor desmiente sus anteriores resultados en un trabajo que publicó en 1929 (15); diciendo que, aunque morfológicamente, los espirilos que él había cultivado eran muy parecidos a los «bacteroides» de los Blattidos, no eran los mismos, sin embargo, y que la falsedad de los resultados fué debida a ciertos defectos de la técnica.

Pero ya, antes de que Glaser reconociera su error, Marshal Hertig, en 1921 (19), trabajando con *Blattella germanica*, *Blatta orientalis* y *Periplaneta americana*, no pudo confirmar los resultados de aquél y sacó la consecuencia de que los espirilos que Glaser había cultivado no representaban la forma cultural de los bacteroides.

Curt Gropengiesser, en 1925 (18), comunica que había aislado de las ootecas de *Periplaneta orientalis* y *Blatta germanica* una levadura, un bacilo y una sarcina. Empleó como material de siembra el contenido de las ootecas y como medios de cultivo el agar común y el caldo común.

Este autor describe en su trabajo la técnica que siguió y que, a nuestro juicio, es perfecta en lo que a la esterilización exterior de la ooteca se refiere. Sin embargo, nos parece muy extraño que los bacteroides hayan crecido en medios tan simples como son los empleados por dicho autor. Nosotros hemos hecho experiencias para cultivar los simbiotes utilizando como material de siembra cuerpo graso de *Blattella germanica* y no hemos conseguido nunca resultados positivos en estos medios sencillos,

y sólo en especialísimas circunstancias, que en su momento expondremos, en los medios más complejos, donde, además, se han desarrollado los simbioses intracelulares de otros insectos.

Apoyándonos en los resultados de Bode (1936) (6), deducimos que los microbios cultivados por Gropengiesser no corresponden a los simbioses intracelulares, sino que, posiblemente, son microbios que viven en el líquido existente en el interior de la ooteca.

De los tres microbios que cultivó, considera la sarcina como contaminación y la levadura y bacilo como las formas culturales de los bacteroides de los Blattidos que estudió; de estos últimos microbios apenas hace una descripción morfológica, no obstante adjunta los resultados de gran cantidad de pruebas serológicas.

En 1929 aparece un nuevo trabajo de Glaser (15), en el que dicho autor comunica haber aislado del cuerpo graso de *Periplaneta americana* tres variedades de un differoide para el que propone el nombre de *Corynebacterium periplanetae*.

Esta vez Glaser describe minuciosamente las técnicas de disección y siembra, así como un medio de agar glucosado, al que le añade sangre de caballo. Sus técnicas serán descritas más adelante, pues son las que nos han servido de pauta para nuestras experiencias, aunque hemos modificado algunos puntos.

Ya estos resultados de Glaser han sido comentados en 1946 por su compatriota Gier (13), quien, repitiendo sus técnicas y modificándolas en el sentido de obtener una esterilización más perfecta y trabajando en condiciones más seguras de asepsia, no logró confirmar los resultados de Glaser. Antes al contrario, dice que los differoides cultivados por este autor son debidos a contaminaciones, basándose en el hecho de que dichos gérmenes le han aparecido en placas sin sembrar que había colocado como control.

Nosotros, por nuestra parte, hemos repetido exactamente las técnicas de Glaser y tampoco hemos obtenido sus resultados; hemos modificado sus técnicas, con las que hemos conseguido resultados positivos que no coinciden, sin embargo, con los de Glaser. No obstante, apoyándonos en nuestra hipótesis de trabajo, la cual más adelante expondremos, confirmada en parte por los resultados que hemos obtenido en *Pirrocoris apterus*, podemos manifestar que los resultados de Glaser pueden ser verdaderos y no debidos a contaminaciones, como opina Gier. Por el momento nos-

## CULTIVO "IN VITRO" DE SIMBIOTES INTRACELULARES DE INSECTOS 197

ctros no tenemos el número suficiente de pruebas para negar los resultados de Glaser

Al año siguiente, 1930, Glaser (16) publica otro trabajo: «Cultivation and classification of bacteroides, symbiots or rickettsias of *Blattella germanica*», en el que, aplicando sus técnicas, aísla otro difterioide que, según sus descripciones, difiere del *Corynebacterium periplanetas*. Para este nuevo difterioide propone dicho autor el nombre de *C. blattellae*.

Hans Bode, en 1936 (6), publica un trabajo bajo el título «Die Bakteriensymbiose bei Blattiden und das Verhalten von Blattiden bei aseptischer Aufzucht». Comienza este autor comentando los trabajos de Mercier y Gropengiesser y adopta una postura prudente, declarando que es muy difícil asegurar que los microbios cultivados por estos dos autores sean realmente los simbiotes, pues el líquido de la ooteca no está siempre libre de organismos extraños; a esto añade: «Como el comportamiento de los simbiotes recién aislados en cultivo unicelular no está conocido, nosotros tampoco podemos conocer si los simbiotes proceden de la flora exterior. También el hecho observado por Mercier y Gropengiesser de la aparición de una levadura no productora de esporas (*Torula gropengiesseri*, Lodder-1934), juntamente con las bacterias simbióticas, necesita una investigación más fina.»

En este mismo trabajo repitió las experiencias de Gropengiesser y de Mercier, pero no pudo confirmar sus resultados; no obstante, consiguió un resultado positivo sembrando en cantidad cuerpo grasoso de *Periplaneta* americana en tubos de caldo. «Se enturbia el caldo —dice— y se forma un velo fino y frágil y, finalmente, hay una precipitación, volviendo a ser transparente el medio de cultivo.» No hace más descripciones culturales ni morfológicas, y en cuanto a la posición sistemática de este microbio, dice que es un bacilo que está relacionado con el *Bacillus subtilis* y el grupo *mesentericus*.

También repite las experiencias de Wollman (1926) (58), pero no consigue que las cucarachas de sus cultivos alcancen el estado de imago.

Como hemos visto, hasta ahora todos los trabajos de aislamiento de simbiotes intracelulares están hechos sobre un solo grupo de insectos, los Blattidos; es en el año 1939 cuando aparece el primer trabajo en que estas experiencias se realizan sobre otro orden de insectos; este trabajo es de Mahdihassan (26) y se titula «Pigmentbildenden Bakterien aus

entsprechend gefärbten Cicade». Este autor dice que «en las investigaciones de simbiosis hasta ahora ha sido desatendida la parte microbiológica y se han ocupado solamente de la histológica». Suponemos que se referirá tan sólo a las investigaciones de simbiosis en los Homópteros.

Luego dice que ha aislado unas bacterias productoras de pigmento, pero no describe las técnicas que ha seguido ni las características morfológicas y culturales; se limita solamente a la descripción de las colonias, de las que adjunta varias fotografías. En una de estas fotografías que nosotros reproducimos aquí (fig. 53), se ven unas colonias situadas junto al borde de la placa y bastante separadas de la huella que deja el asa de platino al hacer la siembra; a la vista de esta fotografía nosotros no podemos asegurar nada; pero por la posición que ocupa la colonia nos parece que se debe a microbios contaminantes y no a simbioses intracelulares. Otro detalle que nos hace sospechar es la presencia en la placa de una colonia de moho, de la que sólo se ve un sector, y que se puede distinguir claramente en el ángulo inferior izquierda de la fotografía.

Aunque los trabajos de Bode son posteriores a aquellos de Glaser, en los que este autor comunica sus resultados de aislamiento de endosimbioses de *Periplaneta americana* y de *Blattella germanica* de 1928 y 1930, respectivamente, éstos no son mencionados por Bode; pero en 1946 aparece un trabajo de H. T. Gier (13), titulado «Intracellular bacteroids in the cockroach (*Periplaneta americana*, Linn)», donde este autor hace una minuciosa revisión de los dos últimos trabajos de Glaser, modifica sus técnicas y emplea para el aislamiento de los simbioses diversos medios de cultivo, entre los cuales están el medio de huevo de Petroff, el medio de Loeffler (con sangre de caballo y de ternera), patata, gelatina, agar con extracto de carne, agar con hormona de Hutoon, e incluso llegó a emplear un medio de sangre, al que le añadía extracto de cucarachas.

A pesar de estas cuidadosas técnicas y de la complejidad de algunos de sus medios de cultivo, los resultados de las experiencias fueron todos negativos, por lo que llegó a las siguientes conclusiones:

«Los numerosos intentos de cultivar los bacteroides de *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Parcoblatta pensilvanica* y *Criptocercus punctulatus* han fallado.»

#### CULTIVO "IN VITRO" DE SIMBIOTES INTRACELULARES DE INSECTOS 199

«Es muy dudoso que alguien haya conseguido cultivar los bacteroides intracelulares de los Blattidos.»

A la vista de esta serie de trabajos, creemos conveniente hacer un ligero comentario con ánimo de dar una explicación a la disparidad existente entre los resultados de los mismos.

Ya Gier en 1946 hace dos consideraciones que explican los resultados positivos y negativos anteriores a él. Dice que «la primera dificultad, causa de la mayor parte de los errores en tales experiencias de aislamiento, es el problema de tener la seguridad plena de que al hacer la siembra no hayamos introducido bacterias extrañas que luego se han de confundir con los verdaderos simbioses».

Si ahora nosotros volvemos a los trabajos de Mercier (1906) (29), Glaser (1920) (14), Gropengiesser (1925) (18) y Bode (1936) (6) vemos que estos autores han trabajado con los medios más sencillos (agar común o caldo común), medios que, según nuestras experiencias y los datos recogidos de la literatura, no son suficientes para el desarrollo de los simbioses intracelulares. Teniendo en cuenta esto, nosotros podemos sacar la consecuencia de que los microorganismos cultivados por dichos autores no corresponden a los simbioses intracelulares, sino que son debidos a contaminaciones procedentes del exterior de las ootecas, del líquido interior de éstas o también de la superficie exterior del propio insecto. No podemos asegurar, sin embargo, que los microorganismos cultivados provengan directamente del aire, puesto que, según los resultados de dichos trabajos, se presentan con más o menos frecuencia; además, esta última causa de error puede aquí ser descartada, puesto que en la mayoría de los casos, cuando se observa una placa de Petri, en la que ha habido crecimiento microbiano, se puede conocer fácilmente si las colonias que han surgido se deben a contaminaciones procedentes del aire, pues éstas suelen estar localizadas en los bordes de la placa, donde nunca se debe sembrar, y cuando aparecen hacia el centro de la placa es muy raro que estén localizadas sobre la huella que deja tras de sí el asa de platino al hacer la siembra; es mucho más raro aún que todas las colonias que hayan aparecido correspondan a la misma especie bacteriana.

Otra de las observaciones que Gier hace es la siguiente: «La segunda y, posiblemente, la mayor dificultad en estas experiencias de cultivo es el lograr un medio artificial adecuado para el desarrollo de los simbioses. Como quiera que las propiedades fisiológicas y químicas del habitat natural

de estos organismos no están conocidas por completo, solamente por tanteo se podrá llegar al medio adecuado. Es de suponer que organismos tan altamente especializados como son estos simbiotes intracelulares requieran medios muy especiales.»

Por esta segunda dificultad que Gier señala, nosotros podemos explicar los resultados negativos de Blochmann (1887), Krassiltschik (1889), Forbes (1899), Javelly (1914) y Hertig (1921); pues estos autores utilizaron los medios usuales de laboratorio, los cuales, según nuestras experiencias, no son lo suficientemente complejos y aptos para cubrir las exigencias de tales microorganismos.

Lo único que nos queda por explicar son los resultados opuestos de Glaser (1929 y 1930) y Gier (1946). Estos no se pueden explicar por el primer punto que Gier establece, puesto que las técnicas de Glaser, tal como este autor las describe, son correctas. Tampoco es explicable por la segunda explicación que hace Gier, porque sus medios de cultivo, muchos de ellos muy parecidos al utilizado por nosotros, Löwenstein sin colorante, los consideramos con suficiente complejidad para que en ellos se desarrollen los simbiotes intracelulares.

Por lo tanto, creemos que esta cuestión ha de ser explicada de otro modo:

Nosotros, como ya aclaramos más adelante, a medida que hemos avanzado en nuestros trabajos, hemos ido concibiendo una hipótesis de trabajo, a saber: los simbiotes intracelulares de los insectos no son aislables durante todos los estados de desarrollo de su huésped. En aquellos insectos que desarrollan sus actividades vitales en ciertas épocas del año, permaneciendo el resto del tiempo en estado de letargo, como sucede con *Pirrocoris ápterus*, es fácil determinar cuál es la época propicia para el aislamiento de sus simbiotes; sin embargo, para la mayoría de los Blattidos, que, por vivir en lugares donde no se registran grandes oscilaciones de la temperatura que les obliguen a invernarse, se reproducen a lo largo de todo el año, es necesario hacer un criadero de estos insectos para estudiar de un modo ordenado el problema. El período favorable para el aislamiento de los simbiotes, según los resultados de nuestras experiencias, está comprendido entre la fecundación y la puesta en los individuos hembras (en los machos nunca hemos obtenido ningún resultado positivo, a pesar de que en los frotis de cuerpo graso se pueden observar los simbiotes intracelulares).

Hemos intentado el cultivo en el laboratorio de *Blattella germanica* con la esperanza de que así podríamos resolver con exactitud este problema; pero, no sabemos por qué, nunca estos insectos alcanzaron el estado adulto, sino que después de un ligero crecimiento morían.

Ante este obstáculo nos vemos obligados a hacer conjeturas, basándonos en nuestros resultados y en los hechos que entresacamos de los trabajos de dichos autores:

Glaser (15 y 16), empleando un medio más o menos complejo, consiguió resultados positivos que no pueden atribuirse a defectos de sus técnicas, puesto que éstas son correctas.

Gier (13), utilizando los mismos medios que Glaser, no confirmó sus resultados.

Nosotros hemos repetido las experiencias de Glaser y tampoco hemos conseguido sus resultados cuando trabajamos con individuos machos. Por otro lado, del cuerpo graso de las hembras de *Blattella germanica*, solamente hemos obtenido el crecimiento de sus simbiotes en medios artificiales cuando sorprendíamos al insecto con los ovarios llenos de huevos, es decir, próximo a hacer la puesta.

Los microorganismos que nosotros hemos obtenido no coinciden, al menos morfológicamente, con los descritos por Glaser, puesto que este autor lo incluye entre las bacterias (género *Corynebacterium*) y nuestros microorganismos son dos: uno, al parecer, un hongo, que encaja, por sus características morfológicas, entre las levaduras; el otro es un bacilo bastante pleomórfico que se puede incluir entre las bacterias.

Este último lo hemos obtenido cuando realizamos las siembras muy poco antes de verificarse la puesta (cuando está comenzando la formación de la ooteca); la levadura la hemos cultivado cuando la siembra fué hecha a partir de cuerpo graso de hembras en cuyos ovarios ya hay huevos completamente formados, aunque todavía no había indicio de la formación de ooteca.

Basándonos en estos hechos podemos deducir que en las hembras de *Blattella germanica* hay momentos críticos comprendidos entre la fecundación y la puesta en que sus simbiotes intracelulares pueden ser cultivados en determinados medios artificiales.

Por consiguiente, por el momento no tenemos pruebas suficientes para negar los resultados de Glaser, puesto que este autor ha podido en sus experiencias sorprender al insecto en alguno de dichos momentos críticos.

Se nos puede objetar que Gier, que ha trabajado con miles de individuos, ha tenido que sorprender algunos de los individuos en esta época propicia para el aislamiento de los simbioses. Sin embargo, creemos que aplicando las técnicas de este autor, es muy difícil que se obtengan resultados positivos, puesto que ha cuidado tanto de la esterilización exterior del insecto que es muy probable que no sólo haya conseguido ésta, sino que también ha esterilizado el cuerpo graso.

Cuando exponamos nuestros trabajos, aportaremos algunas pruebas concretas, las cuales proporcionarán solidez a nuestras suposiciones.

#### **El problema de la naturaleza de los simbioses intracelulares.**

Podemos establecer a priori que no es posible resolver científicamente esta cuestión hasta que no se hayan cultivado los simbioses intracelulares en medios artificiales; pero es que, una vez conseguido el cultivo, este problema, como pronto veremos, sigue siendo de difícil solución:

Dado que todavía, según se desprende de la literatura, no se han reunido los datos suficientes para dar una solución a esta cuestión, y puesto que los resultados de nuestros trabajos poco podemos sacar en este aspecto, nos vemos imposibilitados para el estudio a fondo de este problema de gran interés biológico, pues una vez conocida la naturaleza de los simbioses intracelulares, se podrá aclarar científicamente su origen y, sin duda, su significado.

El primer obstáculo que encontramos es el acusadísimo pleomorfismo de que están dotados estos microorganismos simbioses. Si nosotros observamos un corte histológico de cuerpo graso de *Pirrocoris* (Figs. 12, 13, 14, 15), por ejemplo, observamos en sus micetocitos gran cantidad de granulillos que difieren no sólo en la forma, sino también en el tamaño; además de estos granulillos finos, también se pueden observar otros corpúsculos mayores muy parecidos a levaduras. Estas características morfológicas, observadas por nosotros en *Pirrocoris apterus*, *Zonabris 6-punctata* y *Coccinella septempunctata*, están descritas en muchos insectos; así, por ejemplo, tenemos las descripciones de Buchner (9) y de Ries (38) referentes a las diversas formas que adoptan los simbioses en el micetoma de los *Pediculidos*; las formas que describen Müller y Mahdihassan (27) en algunos *Coccidos*, Schneider (41) y otros.

Encontramos, sin embargo, algunos casos en los que no se observa pleomorfismo, como sucede en los *Blattidos* y en un termita australiano (*Mastotermes darwiniensis*) sobre el que A. Koch publica un trabajo en 1938 (18). En estos insectos, los simbiotes tienen una forma claramente bacilar y han sido considerados como bacterias. No obstante, a pesar de su morfología, algunos autores, como Lwoff (25), muestran tendencia a considerarlos como levaduras, basándose en la manera de reproducirse.

También se han descrito formas rickettsianas como simbiotes intracelulares (Steinhaus, 1949) (51).

Muchos de los simbiotes intracelulares que tienen una morfología definida han sido incluso «clasificados» atendiendo a las características que presentan en su hábitat natural. Esto ha sucedido con la mayor parte de los simbiotes levaduriformes; así tenemos el *Saccharomyces anobii*, Buchner, y luego las pertenecientes a los géneros creados por Brain (1923) (51), cuyo nombre se forma poniendo el subfijo *cola* a *myces* al nombre genérico de insecto, así tenemos los siguientes ejemplos: *Lecanicola*, *Cicadicola*, *Coccidomyces*, etc.

Desde el punto de vista microbiológico encontramos bastante aventurada la clasificación de un microorganismo basándose sólo en las características morfológicas que presenta en su hábitat natural. Es necesario, repetimos, cultivarlos en medios artificiales. Sin embargo, el problema es mucho más complicado porque el cultivo, al menos en algunos de los casos en que nosotros lo hemos conseguido, no es todavía suficiente para la determinación de la naturaleza de estos simbiotes intracelulares. En algunos casos se observa tal pleomorfismo en medios artificiales que no sabemos si se trata de bacterias o de levaduras (Figs. 40 y 41).

Tan sólo en dos casos hemos obtenido en medios artificiales levaduras que presentan una morfología algo constante.

Pierantoni (36 y 37) cree que estos microbios intracelulares pueden ser hongos, bacterias, rickettsias, e incluso virus filtrables, que se han adaptado tan estrechamente a su hábitat (el micetocito) que casi se confunden con el plasma que los contiene. También admite un ciclo evolutivo de los simbiotes.

Después de esta puesta al día de toda la literatura que con grandes dificultades hemos logrado reunir y antes de entrar en las consecuencias

que puedan surgir de nuestros estudios creemos que no será osado establecer:

a) que la tendencia actual es hacia la admisión por casi todos los autores técnicos en esta materia de que el hecho capital en el micetoma y cuerpo graso es la presencia de simbioses.

b) que hasta el presente, sólo en muy escasas ocasiones se ha conseguido su cultivo de una manera categórica y sin lugar a dudas.

c) que debido al estado actual de la ciencia microbiológica que durante múltiples años, en especial, en casi todo lo que va de este siglo, se ha hecho monomorfista, es difícil el interpretar la microbiología del micetoma, que después de la literatura aquí expuesta, puede deducirse bastante claramente que sólo las teorías pleomorfitas serán capaces de arrojar cierta luz sobre este particular.

d) como corolario de estos apartados, antes expuestos, lo más importante es encontrar un medio artificial apto para el cultivo de estos microorganismos, cosa que presenta grandes dificultades y puede ser la piedra de toque de toda esta cuestión.

A base de estas premisas y de todo lo expuesto hemos llevado a cabo nuestros estudios.

## PARTE SEGUNDA

### MORFOLOGIA E HISTOLOGIA DEL MICETOMA

Hemos de iniciar este capítulo aclarando una serie de ideas que, a nuestro juicio, están algo confusas, debido principalmente a que (como sucede siempre que trabajan en un mismo campo diferentes investigadores e independientemente los unos de los otros) han sido designados con términos diferentes.

Dejando a un lado las distintas denominaciones que le han dado al micetoma antes de conocer su verdadera función, puesto que éstas actualmente no se usan, nos ocuparemos solamente de aquellas que se refieren al concepto moderno de micetoma.

Como ya hemos dicho en el capítulo anterior, la denominación de micetoma fué dada por Sùlc en 1910 cuando, trabajando con Afidos, vió en el interior de las células de este órgano unos microorganismos que él consideró de naturaleza micóide.

Nosotros, basándonos en la literatura, podemos definir el micetoma, en el amplio sentido de la palabra, como «la célula o conjunto de células que albergan en su protoplasma microorganismos simbiotes. Cada una de las células que componen el micetoma se llama micetocito».

Modernamente se tiende a restringir el significado de estos términos empleándolos tan sólo en el caso de que los simbiotes sean hongos, y usando las palabras bacteriotoma y bacteriocito cuando los simbiotes son de naturaleza bacteriana.

No obstante, nosotros no creemos conveniente adoptar estos dos últimos términos, que, a nuestro ver, vienen a complicar la terminología, puesto que en muchos de los casos existen en los micetomas, además de organismos bacteriformes, organismos levaduriformes; otra razón es que en las descripciones que se han hecho de estos microbios endocelulares, a veces se lee que éstos experimentan profundos cambios en la morfología (Ries, 1930) (38) y no faltan autores (Müller (9), Mahdihassan (24), Schneider (37), que han cerrado ciclos evolutivos de dichos microorganismos durante los cuales éstos presentan forma de levadura y de bacteria. Aunque admitamos que existan micetomas, como ocurre en los Blattidos, en los que no se hayan observado más que organismos bacteriformes, no consideramos sea error grave el llamarle micetoma, puesto que de todos es sabido que la terminología de las diversas ramas del saber está plagada de palabras que actualmente no tienen el mismo significado que cuando se introdujeron, sin que esto impida que se sigan usando en el lenguaje correcto.

Además, tengamos en cuenta que hoy día está bien definido el concepto y el término que nos sirve para denominar a los hongos sexuales y asexuales con la palabra miceto o eumiceto y a las bacterias, que desde Nageli se les denomina como Schizomycetes. Por tanto, sin entrar en la cuestión en la que vemos partidarios, como Ries, Mahdihassan, Schneider, de que se trata de formas de una misma especie en un ciclo evolutivo (la teoría pleomorfista), o bien la de la mayoría de otros autores que las interpretan como formas correspondientes a especies distintas, consideramos que el término miceto, hoy por hoy, de un modo lógico o no, abarca todos estos microorganismos, y, por consiguiente, consideramos buenas las denominaciones de micetoma y micetocito.

Muy diferente es el caso de un término que al introducirlo en la literatura no fueron observadas correctamente las reglas etimológicas y desde

un principio es incorrecto. Tal sucede con la palabra «simbiote». Como se observará, nosotros venimos usando la palabra «simbiote» en lugar de «simbionte». Nos ha movido a ello las siguientes razones de Steinhaus (1949) (43).

«El uso de la palabra «simbiosis» ha sido objeto de considerable abuso por parte de los biólogos y hasta de los no biólogos. De Bary (1879) usó originalmente esta palabra para significar simplemente la vida en conjunto de organismos distintos, sin tener en cuenta la resultante de tal asociación. Autores posteriores han empleado frecuentemente este término para designar tan sólo aquellas uniones en que la asociación era mutuamente ventajosa. Este uso no siguió el original de De Bary ni está de acuerdo con la recomendación del Comité de terminología de la Sociedad de Parasitólogos americanos. El término simbiosis es muy amplio e incluye no sólo la relación de mutualismo (relación en que la asociación es mutuamente ventajosa), sino también el parasitismo y el comensalismo.»

«Teniendo en cuenta el sentido que De Bary da a la palabra «simbiosis», nosotros vamos a usar ahora correctamente la palabra «simbiote», que significa, simplemente, un organismo que vive asociado a otro organismo. Simbionte es la palabra introducida por De Bary, y es usada por muchos autores. Esta palabra no está deducida correctamente, etimológicamente hablando. La palabra se deriva del griego «sumbiontes», que significa «compañero», «socio», «uno que vive con». Por consiguiente, la forma correcta es «simbiote», puesto que «simbionte» no tiene original en griego».

Ei micetoma puede estar localizado en diferentes partes del cuerpo, generalmente está en el abdomen del insecto; unas veces el micetoma se compone de células epiteliales del intestino medio; otras veces consiste en un grupo de células ya diferenciadas, que se localizan en ambos lados del intestino medio, siendo, por consiguiente, un órgano par; pero en la mayoría de los casos el micetoma es el conjunto de micetocitos que se encuentran entre las células del cuerpo graso, pudiendo estar diseminados entre éstas o bien dispuestos en un cierto orden.

Llamamos cuerpo graso a una serie de lobulillos más o menos esféricos de color variable (desde el blanco lechoso al amarillo rojizo), según la especie y la edad del insecto; estos lobulillos, unidos entre sí, dan lugar a cordones, racimos o, a veces, redes que ocupan gran parte del abdomen, disponiéndose en dos capas: el «cuerpo graso cuticular o periférico» y el «cuerpo graso visceral» (figs. 1 y 2).

Entre estos dos estratos del cuerpo graso no hemos encontrado diferencias fundamentales. En las larvas de *Taumatopoea* sp., nos parece idéntico el cuerpo graso parietal y el visceral; ambos consisten en largos cordones constituidos por una o más hileras de células esféricas que adoptan una forma poliédrica debido a la presión que se ejercen entre sí; deducimos que la forma es esférica porque las superficies libres son curvas (fig. 3). En el protoplasma de estas células y entre las gotas de grasa se pueden observar unos corpúsculos más o menos esféricos que interpretamos como simbioses intracelulares, basándonos en la analogía existente entre estos gránulos endocelulares y los simbioses observados por nosotros en los micetocitos de *Zonabris 6-punctata*, de *Coccinella septempunctata* y de *Pirrocorris apterus*. En estos tres últimos insectos hemos comprobado su naturaleza microbiana por medio del cultivo en medios artificiales; en las larvas de *Taumatopoea* no hemos intentado este cultivo.

En *Pirrocorris apterus*, según se desprende de nuestras preparaciones, existen ligeras diferencias entre el cuerpo graso parietal y el visceral; en aquél (fig. 10) las células son mayores, están más apretadas y sus vacuolas son de mayor tamaño que las de las células que constituyen el cuerpo graso visceral (figs. 5 y 11).

Tanto en un estrato como en otro podemos observar micetocitos; éstos presentan en su interior unos corpúsculos grandes, levaduriformes (figs. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15) y unas formas cocáceas muy parecidas a los gránulos de cromatina del núcleo. Hemos confirmado la naturaleza microbiana de estas formaciones intracelulares valiéndonos del cultivo en medios artificiales.

Hemos de mencionar aquí unas formas que observamos en un frotis de cuerpo graso de *Pirrocorris apterus*, teñido por el procedimiento de Graum (modificación de Hucker). Consisten éstas (figs. 16, 17, 18 y 19) en unos filamentos largos que presentan unas hinchazones ovaladas fuertemente Gram-positivas. Estos filamentos se anastomasan formando marañas, entre las cuales se ven formas esféricas sueltas también bastante teñidas en violeta. Tan sólo una vez hemos observado la presencia de estas formas; no conseguimos su cultivo en medios artificiales; sin embargo, creemos conveniente comunicarlo en este trabajo aunque desconozcamos su verdadera naturaleza.

Como el tema fundamental de nuestro trabajo es el aislamiento de los

simbioses intracelulares, es imprescindible, si queremos trabajar de un modo científico, hacer un profundo estudio bioquímico del micetoma que nos permita elaborar un medio de cultivo lo más parecido a este hábitat de los simbioses intracelulares, estudio que requiere una sólida preparación de química biológica de la que, hoy por hoy, desgraciadamente carecemos la mayor parte de los naturalistas españoles.

Por lo tanto nos es indispensable, si no encontramos en la literatura la naturaleza bioquímica del micetoma, hacer suposiciones basadas en algunas particularidades anatómicas e histológicas que hemos recogido de la bibliografía referente al tema.

Glaser en 1920 (14) y Anadón en 1943 (1), al describir la Anatomía microscópica del cuerpo graso de *Blattidos* el primero y de *Ephypigerinos* el segundo, hacen notar que entre las células del cuerpo graso hay unas que están cargadas de simbioses y otras que poseen cristales de ácido úrico y de uratos, pero que nunca coexisten los simbioses y los uratos en una misma célula. Esta incompatibilidad nos pareció muy interesante. Anadón da la interpretación de que los uratos no se pueden formar en los micetocitos porque los simbioses producen una uricasa que los ataca. Nosotros, en un principio, admitimos dos causas posibles: o que los simbioses utilizan los uratos para su desarrollo o que, por el contrario, estas sustancias actúan como inhibidores sobre los simbioses y, por consiguiente, impiden su desarrollo.

Deseando aclarar este punto, hemos hecho siembras de cuerpo graso de *Pirrocoris apterus* en placas de Petri con medio de Löwenstein sin colorante, cuya superficie la humedecemos con solución saturada de ácido úrico unas y de urato sódico al 1 por 100 otras. Después de ciento veinte horas de incubación a 27° C. no obtuvimos ningún resultado positivo en estas placas; sin embargo, en las que utilizamos como control (placas con el medio de Löwenstein sin colorante sin añadirles las soluciones) obtuvimos crecimiento a las cuarenta y ocho horas.

Estas experiencias las podemos resumir en la tabla siguiente:

INFLUENCIA DEL ÁCIDO ÚRICO Y DEL URATO SÓDICO SOBRE EL DESARROLLO DE LOS SIMBIOTES INTRACELULARES DE *Pirrocoris apterus*

Medio de cultivo.	Tiempo de incubación.				
	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.
Löwenstein sin colorante con sol. conc. de ácido úrico ... ..	—	—	—	—	—
Löwenstein sin colorante con sol. 1% de urato sódico ... ..	—	—	—	—	—
Löwenstein sin colorante ...	—	+			

Temperatura de incubación, 27° C.

Esta experiencia la repetimos cinco veces, obteniendo los resultados que indica la tabla en cuatro de ellas. En la restante no hubo crecimiento en ninguna de las placas.

Estos resultados nos indican que, tanto los uratos como el ácido úrico impiden el desarrollo de los simbioses, al menos en este medio artificial; es muy posible, por tanto, que en su hábitat natural suceda lo mismo, siendo ésta la causa de que no haya simbioses en las células donde existan estas sustancias.

Otro de los detalles anatómicos del cuerpo graso o de los micetomas localizado es que estas formaciones están profusamente recorridas por tráqueas; de este hecho deducimos que los microorganismos simbioses serán favorecidos en su desarrollo por una atmósfera abundante en oxígeno. En nuestras experiencias hemos encontrado un hecho que está de acuerdo con nuestras suposiciones: si después de hacer la disección asépticamente, sembramos cuerpo graso de *Pirrocoris* en placa de Petri y en tubo, ambos con el mismo medio de cultivo, Löwenstein sin colorante, nos encontraremos con el hecho de que en la placa hay crecimiento, mientras que en el tubo, no. Podía esto explicarse por una relativa limitación de la ventilación en el tubo.

Ahora, para ajustarnos al título que hemos puesto en este capítulo tendríamos que hacer un estudio histológico del cuerpo graso; pero como esto sería una repetición de lo que hace tiempo está descrito en la

literatura, nos limitaremos a contribuir con una serie de microfotografías tomadas de cortes histológicos de *Pirrocoris apterus* y de larvas de *Taumatopea* sp., las cuales se adaptan con bastante exactitud a las descripciones hechas por autores que han trabajado sobre este tema, pero que la mayoría de ellos se han limitado a adjuntar dibujos más o menos esquemáticos.

### Técnicas

La fijación de las piezas la hemos hecho siempre con el fijador de Bouin, que es el que nos ha parecido más apropiado, porque, además de que conserva las estructuras finas, presenta la ventaja de que evita las falsas interpretaciones por confusión de las mitocondrias con los simbioses intracelulares, puesto que, según Cowdry y Olisky (1922) (12), las mitocondrias no se tiñen por ninguno de los métodos si el material ha sido previamente fijado con el fijador de Bouin.

La inclusión en parafina la hemos hecho siguiendo el método de Peterfi, que nos ha dado magníficos resultados, a pesar de que durante la deshidratación con los alcoholes y con el benzol se disuelve algo de cuerpo grasoso. Aquí hemos encontrado una diferencia entre la sustancia lípida del cuerpo grasoso de los insectos y la grasa de los animales superiores, pues ésta se disuelve totalmente cuando se deshidrata el material para su inclusión en parafina.

El espesor de los cortes varía entre 3 y 12 micras.

Pretendiendo una absoluta honradez en nuestros trabajos, hemos de decir que estas mismas técnicas fueron empleadas en 1939 por Werner Rosenkranz (40), aunque nosotros no conocimos su obra hasta año y medio después de que empezamos a utilizar estas técnicas. Nosotros hemos elegido las técnicas entre las que se describe el libro de B. Romeis (39) «Guía-formulario de Técnica histológica», y ha dado la curiosa coincidencia de que hemos entresacado las mismas que había empleado Rosenkranz en 1939, que, dicho sea de paso, no menciona para nada la obra de Romeis y, tal como están descritas, dan la impresión de que fueron ideadas por dicho autor.

La tinción que con mayor frecuencia hemos usado es el método de la hematoxilina férrica de Heidenhain, empleando como colorante de contraste el príco-carmín de índigo. En este método de coloración, así como

## CULTIVO "IN VITRO" DE SIMBIOTES INTRACELULARES DE INSECTOS 211

en todos aquellos en que el colorante ha de permanecer por largo tiempo en contacto con la preparación, hemos evitado la excesiva precipitación del colorante sobre los tejidos, que luego ha de ser un gran inconveniente para la correcta diferenciación, de la siguiente manera: tanto el alumbre de hierro como la hematoxilina han sido aplicados vertiéndolos en sendas placas de Petri, bien limpias, hasta que alcancen la altura de un milímetro aproximadamente. Luego se colocan, diametralmente opuestas y paralelas entre sí, dos laminillas de vidrio, sobre las que va a descansar el portaobjetos, de manera que los cortes queden por la cara inferior y así tocan la superficie del líquido, que, por adherencia, se extiende y moja la preparación.

También para la coloración de los cortes hemos empleado los métodos de Giemsa, May-Grünwald y Gram (modificación de Hucker).

### PARTE TERCERA

#### MICROBIOLOGIA

El punto más difícil de la simbiosis intracelular es, sin duda, el que se refiere al aislamiento de los simbioses. Como ya se ha visto en nuestro bosquejo histórico, aún está por aclarar si los simbioses intracelulares de los insectos pueden ser cultivados en medios artificiales.

Como nuestro propósito es el aislamiento de dichos microorganismos, hemos seguido, aunque modificando algunos puntos, las técnicas de Glaser, pues este investigador, según parece, lo ha conseguido trabajando con *Periplaneta americana* y con *Blattella germanica*, empleando como medio de cultivo el agar glucosado, al que añade suero de caballo.

Hemos seguido las técnicas de Glaser que, además, son las que nos parecen menos expuestas a contaminación, sin detrimento de la viabilidad de los simbioses.

#### Material y técnicas.

Hemos elegido para nuestras experiencias insectos pertenecientes a órdenes diferentes, con la idea de dar un carácter general a nuestros resultados; sin embargo, no hemos conseguido nuestro propósito, debido, tal

vez, a que las exigencias de cultivo no son las mismas para los simbioses de los diferentes huéspedes. Los insectos que han sido objeto de nuestro trabajo son *Blatella germánica*, *Pirrocoris apterus*, *Coccinella septempunctata* y *Zonabris 6-punctata*.

La disección de los insectos ha de hacerse en condiciones de asepsia. La técnica que nosotros hemos seguido es la siguiente:

- a) Esterilización del instrumental.
- b) Esterilización exterior del insecto.
- c) Preparación de la parafina para la sujeción del insecto.
- d) Disección.

El instrumental, que consta de unas tijeras, una lanceta, un fino bisturí, dos pinzas y alfileres inoxidables, lo esterilizamos sumergiéndolo durante sesenta minutos en alcohol de 80 por 100.

La esterilización exterior del insecto la realizamos introduciéndolo vivo en un pocillo que contiene una mezcla a partes iguales de sublimado corrosivo al 1 : 1.000 y alcohol absoluto. Glaser (15) somete previamente el insecto a la acción del éter hasta que queda inmóvil y luego lo tiene durante quince a veinte minutos en la mezcla de sublimado corrosivo y alcohol. Nosotros, al introducirlo vivo en el desinfectante, creemos obtener la ventaja de que, de este modo, la esterilización es más completa, puesto que al debatirse el insecto se favorece la penetración del desinfectante en los espacios que quedan entre los anillos del exoesqueleto.

Una vez que el insecto ha permanecido durante quince minutos en dicha mezcla, lo pasamos a otro pocillo con alcohol de 96 por 100, donde ha de permanecer unos veinte minutos. Luego se lava con solución salina estéril y se procede a la disección.

La parafina se prepara fundiéndola y vertiéndola en una placa de Petri hasta que alcance aproximadamente un centímetro de espesor. Una vez que se haya solidificado la parafina se termina de llenar la placa de alcohol de 96 por 100, dejándolo actuar durante treinta minutos. Al cabo de este tiempo se quita el alcohol y la superficie de parafina se lava con solución salina estéril.

Para proceder a la disección se le cortan previamente las patas al insecto para que no estorben, y luego se coloca en la superficie de la parafina con el lado ventral hacia arriba. Se fija con alfileres (¡sin pincharlo!) estériles que se clavan en la parafina y se cruzan sobre el insecto a la altura del metatórax. Luego se vierte en esta placa un poco de solución

salina estéril hasta que el insecto quede cubierto. Ahora se comienza la disección, que realizamos de la manera siguiente:

Con el bisturí estéril se hace una incisión lateral a lo largo del abdomen, procurando profundizar lo menos posible. Con las pinzas se levanta el exoesqueleto que cubre la parte ventral del abdomen y ya nos encontramos con el cuerpo graso periférico o cuticular.

Ahora no tenemos nada más que ir extrayendo con las pinzas el cuerpo graso (teniendo sumo cuidado en no romper el tubo digestivo, sobre todo en las zonas donde el cuerpo graso está atravesado por tubos de Malpigio.) El cuerpo graso extraído es lo que nos ha de servir como material de siembra.

La siembra la hemos hecho por dos procedimientos: aplicando la «spotting technique» de Glaser (15), y, simplemente, por siembra directa.

La técnica de las manchas de Glaser consiste en tomar con las pinzas estériles porciones del cuerpo graso y llevarlas a un tubo que contiene agua estéril y se agita. La suspensión así obtenida se utiliza ahora como material de siembra, del cual, con el asa de platino, se toma una gota y se va frotando con ella la superficie del medio de cultivo contenido en una placa de Petri, de manera que queden una serie de círculos sembrados, separados unos de otros. Como resultado de esta operación quedará la superficie de la placa con una serie de manchas que, debido a la grasa que el material de siembra contiene, son brillantes. Glaser hacía en cada placa de 2 a 15 manchas sin recargar el asa.

Las placas así sembradas se llevan luego a la estufa a 35 ó 36° C. durante cuarenta y ocho horas. Pasado este tiempo se examinan las placas y da la impresión de que las manchas se han secado, sin que a simple vista se observe colonia alguna. Lo único que se observa dentro de la mancha son unos puntitos brillantes muy pequeños, los cuales no hay que confundir con colonias, pues, no son sino pequeñísimas gotas de grasa.

A pesar de que a simple vista no se aprecian indicios de desarrollo microbiano, no obstante si ahora frotamos con el asa de platino la superficie de una de estas manchas y resembramos el material recogido en un tubo que contenga el mismo medio de cultivo que el de la placa, puede ocurrir que antes de las ciento cuarenta y cuatro horas aparezcan colonias visibles en dicho tubo.

La operación de resiembra en tubo se ha de repetir para cada una de las manchas, de manera que al final tengamos un tubo por cada mancha.

Es muy importante, según Glaser, que en el tubo haya bastante agua de condensación; si esto no fuera así habría que añadirle unas gotas de una solución estéril, consistente en 5 c. c. de caldo, al que se le añade 1 c. c. de suero sanguíneo de caballo.

El modo de hacer esta resiembra es el siguiente: Con el asa de platino se toma un poco de agua de condensación del tubo que se va a sembrar, con este agua se humedece la mancha de la cual se va a hacer la toma y después de frotar un poco la superficie de ésta con el asa se vuelve a llevar al tubo, donde se hace la resiembra.

Los tubos así sembrados se incuban a 36° C., a también se pueden dejar a la temperatura del laboratorio. Después de las cuarenta y ocho horas de incubación se observan los tubos todos los días. Si ha habido desarrollo microbiano, las colonias aparecerán entre las cuarenta y ocho y ciento cuarenta y cuatro horas. Pasado este tiempo, si no ha habido crecimiento la experiencia se puede considerar como negativa.

Nuestra siembra directa consiste en ir tomando con pinzas estériles trocitos de cuerpo graso y, con las mismas pinzas, extenderlo sobre la superficie del medio de cultivo, haciendo estrías rectas y más o menos paralelas.

La temperatura de incubación fué siempre de 27° C.

En todas nuestras experiencias de cultivo siempre hemos hecho la siembra por ambos procedimientos, es decir, que una parte del cuerpo graso de cada individuo lo destinábamos a la siembra directa y otra parte a la «spotting technique». Esto lo consideramos necesario, puesto que ambas técnicas tienen sus ventajas y sus inconvenientes. En efecto, la técnica de las manchas tiene la ventaja de que, al menos en nuestras experiencias, da resultados casi siempre positivos cuando el medio de cultivo es adecuado; sin embargo, presenta el inconveniente de que este crecimiento es tan escaso que las colonias no son visibles a simple vista. Lo contrario sucede con la siembra directa; por medio de ésta no siempre se obtiene crecimiento microbiano, aunque hayamos sembrado micetocitos; pero, en compensación, tiene la ventaja de que, cuando hay crecimiento, éste es abundante y visible a simple vista.

Esto que acabamos de decir es fácilmente explicable si aceptamos la idea de que los simbioses intracelulares están sometidos a dos acciones que se suceden periódicamente de acuerdo con las actividades sexuales del huésped. Así, unas veces los simbioses son favorecidos en su repro-

ducción y otras veces son obstaculizados seguramente por algún agente bacteriostático. Por esto, unas veces es mejor liberarlos de él. En la siembra directa nosotros colocamos sobre la superficie del medio de cultivo a los simbiotes encerrados en los micetocitos que, a su vez, están rodeados por las restantes células del cuerpo graso; en este caso, la multiplicación de los simbiotes se aproxima algo a lo que ocurre «in vivo»; por consiguiente, habrá crecimiento abundante si en el momento que nosotros hacemos la disección del insecto había en el cuerpo graso factores favorables al desarrollo de los simbiotes; si, por el contrario, nosotros sorprendemos al insecto en una época en que sus simbiotes están sometidos a la acción inhibitoria de algún agente bacteriostático, que suponemos sea de naturaleza química y que, lógicamente, ha de encontrarse en las células del cuerpo graso, los simbiotes seguirán siendo inhibidos «in vitro», cuando la siembra es directa, no ocurriendo esto cuando aplicamos la técnica de las manchas de Glaser, puesto que durante la maceración los micetocitos se rompen, dejando en libertad a los simbiotes, los cuales quedan en suspensión.

Hemos probado para estas experiencias los siguientes medios de cultivo: caldo común, agar común, agar glucosado, agar malta (\*), agar sangre, medio Cabouread, medio de Glaser (\*\*), medio V. IV (\*\*\*) y medio de Löwenstein sin colorante.

Todos estos medios para comprobar su esterilidad fueron incubados a la temperatura de 37° C. antes de su empleo en nuestras experiencias.

Solamente hemos obtenido resultados positivos en los dos últimos de estos medios, cosa que nos comprueba la idea de la necesidad de la complejidad del medio. El de Löwenstein se emplea para el aislamiento

- (\*) Malta ... .. 500 c. c.  
 Agua ... .. 500 c. c.  
 Agar ... .. 20 g.
- (\*\*) Agar común fundido ... .. 10 g.  
 Sangre de caballo desfib. y est. 3 c. c.  
 Solución el 10 %, estéril, de glucosa, 2 c. c.

En una placa Petri se pone la sangre y la solución de glucosa y luego se le añade el agar común, cuando este esté a la temperatura de 45° C. El pH se ajusta a 7--7.4.

- (\*\*\*) Extracto de patata ... .. 75 g.  
 Extracto de levadura ... .. 25 g.  
 Peptona ... .. 1 g.  
 Glicerina ... .. 4 g.  
 Agar ... .. 2 g.  
 Glucosa ... .. 1 g.

de *Mycobacterium tuberculosis*. Este mismo medio, pero sin añadirle el colorante selectivo, fué empleado por Socías (comunicación personal), en sus estudios de transformación bacteriana, especialmente para el aislamiento del posible agente etiológico del tracoma, enfermedad infecciosa que da lugar a unos estados anatómo-patológicos, a veces tan parecidos microscópicamente al cuerpo graso de algunos insectos, que es difícil distinguir si una preparación es de cuerpo graso o de un granuloma tracomatoso (44). Para los mismos trabajos también fué ideado por Socías el medio V. IV.

El medio de Löwenstein presenta el inconveniente de que se contamina con mucha facilidad; esto solamente puede evitarse trabajando con sumo cuidado.

Como ya hemos dicho, solamente hemos logrado el aislamiento de los simbioses intracelulares en el medio V. IV y en el medio de Löwenstein sin colorante. Esto no quiere decir que dichos medios sean los óptimos para el crecimiento de tales microorganismos; antes al contrario, vamos ahora a exponer algunas de nuestras observaciones que nos van a dar idea de la escasa aptitud de estos dos medios.

En todas nuestras experiencias hemos utilizado estos dos medios, y así como en el Löwenstein sin colorante hemos obtenido resultados positivos en la mayoría de los casos, en el medio V. IV tan sólo ha dado resultados claramente positivos en dos experiencias. Ambas en placas sembradas por siembra directa. Esto nos indica que este último medio constituye un sustrato al que se pueden adaptar los simbioses solamente en circunstancias especiales que por ahora desconocemos y que suponemos serán debidas al estado de los simbioses o al de las células del cuerpo graso. Del hecho de que nunca se hayan desarrollado dichos microorganismos en este medio cuando se siembran por el procedimiento de Glaser, deducimos que por sí solo no cubre las exigencias de cultivo de los simbioses.

Por otro lado, aunque empleando el medio de Löwenstein sin colorante hemos conseguido resultados positivos en la mayoría de los casos; sin embargo, no reúne todas las condiciones y factores de crecimiento suficientes para que en él se desarrollen en todos los casos los simbioses intracelulares. Nos han llevado a esta conclusión los siguientes hechos:

a) En ninguno de los casos hemos obtenido el cultivo en este medio cuando sembramos (por ambos procedimientos de siembra) cuerpo graso

de individuos machos, a pesar de que en su cuerpo graso se pueden observar simbioses que llenan los micetocitos.

b) Sembrando por la técnica de Glaser cuerpo graso de hembras *Pirrocoris apterus*, *Zonabris 6-punctata* y *Coccinella septempunctata*, obtenemos el cultivo en todos los casos; sin embargo, utilizando este mismo procedimiento para *Blattella* germánica no hemos obtenido resultados positivos sino cuando utilizamos individuos próximos a hacer la puesta.

c) Sembrando directamente cuerpo graso de los insectos antes citados no hemos obtenido el cultivo nunca cuando los ovarios están vacíos (hembras jóvenes, adultas no fecundadas o adultas después de haber hecho la puesta).

Estos tres hechos sólo pueden ser explicados admitiendo que el micetoma de los individuos machos constituye un medio ambiente en el que siempre existe un determinado agente inhibidor o falta algún factor de crecimiento, del que también carece el medio de Löwenstein sin colorante.

Tampoco el medio de Löwenstein es capaz de salvar tal carencia en el caso de las siembras por el procedimiento de Glaser de cuerpo graso de *Blattella* germánica.

Las experiencias que ahora vamos a detallar se refieren todas a individuos hembras, puesto que, como ya hemos dicho, nunca hemos obtenido ningún resultado positivo (aplicando las mismas técnicas y empleando idénticos medios) de las siembras de cuerpos grasos de individuos machos.

#### Experiencias con *Pirrocoris apterus*

Los individuos con que hemos trabajado los hemos recogido en el Jardín Botánico de Madrid.

La disección y la siembra la hemos hecho por los procedimientos ya descritos.

Con el fin de orientarnos, siempre que hacíamos una disección tomábamos con las pinzas un poco de cuerpo graso y lo extendíamos en un portaobjetos para luego teñirla por el procedimiento de Gram (modificación de Hucker).

En esta preparación, observada al microscopio, es muy difícil encontrar un adipocito, puesto que éstos, al hacer el frotis, se destruyen con mucha facilidad, dejando en libertad las gotas de grasa que luego se disuelven

casi en su totalidad al decolorar la preparación. No ocurre esto, sin embargo, con los micetocitos, que muchos de ellos permanecen intactos. Estos micetocitos suelen ser abundantes, sobre todo en el cuerpo graso de las hembras, dentro de micetocitos se ven unos corpúsculos Gram-positivos, esféricos, cuyo diámetro oscila entre 2 y 3 micras, a veces están unidos en grupos de dos a tres elementos. Se observan también, aunque muy escasos, unos corpúsculos ovoideos, algo mayores que los anteriores y también Gram-positivos. Otros de los elementos que también se observan con constancia en estas extensiones de cuerpo graso son unos elementos levaduriformes grandes, en forma de botella con cuello corto. Algunos de éstos, cuando quedan débilmente teñidos, dejan ver en su interior unos gránulos esféricos, intensamente teñidos, cuyo número es muy variable, a veces son sólo tres; otras veces son tan numerosos que ocupan totalmente el interior de estos elementos levaduriformes.

En todas las experiencias hemos hecho la siembra por los dos procedimientos: por el de Glaser y por siembra directa. En las placas sembradas según la técnica de Glaser, cuando el medio de cultivo es el de Löwenstein sin colorante, siempre se ha observado crecimiento, aunque nunca éste fué visible a simple vista; pero si estas microcolonias son sembradas en un tubo, también de Löwenstein sin colorante, entonces, ya a las cuarenta y ocho horas podemos observar unas colonias incoloras, hemisféricas y de medio milímetro de diámetro. Las características de cultivo y morfológicas de los microbios, que dan lugar a estas colonias, ya las daremos más adelante.

En las placas, también de Löwenstein, sin colorante, sembradas por siembra directa, no siempre hemos obtenido resultados positivos. En el 40 % de las siembras no ha crecido colonia alguna, los trocitos de cuerpo graso permanecen invariables sobre la estría hasta que la placa se seca. Pero en el resto (60 %) de las experiencias, ya desde las veinticuatro horas se pueden observar las mismas colonias que se obtienen por el procedimiento de Glaser en los tubos de Löwenstein sin colorante.

Con ánimo de explicarnos esta diferencia en los resultados, comenzamos a revisar nuestro cuaderno de laboratorio, donde habíamos anotado las características anatómicas de los individuos con que habíamos trabajado, y encontramos que estos resultados negativos correspondían a siembras hechas con cuerpo graso de hembras cuyos ovarios estaban vacíos (antes de la maduración o después de la puesta); en cambio, en los resultados

positivos (60 % de las siembras directas) correspondían a hembras que tenían los ovarios repletos de huevos (antes de la puesta).

Para comprobar esto de una manera más exacta, tuvimos que esperar a la siguiente primavera, que es cuando estos insectos reanudan sus actividades sexuales.

Hicimos siembra de cuerpo graso de individuos jóvenes y no obtuvimos resultados positivos por ninguno de los dos procedimientos de siembra. De las hembras adultas seguimos obteniendo constantemente resultados positivos, sembrando en Löwenstein, sin colorante, por el procedimiento de Glaser; sin embargo, de estos mismos individuos, que procuramos recogerlos cuando se encontraban en cópula, los resultados eran negativos si hacíamos la siembra directa inmediatamente; pero si dejamos das hembras en un cristalizador con alimento durante cinco o seis días, entonces obteníamos resultados positivos de las siembras directas de cuerpo graso. Tampoco obtuvimos resultados positivos si la siembra la hacíamos de cuerpo graso de hembras que ya hubieran hecho la puesta.

En dos de las experiencias hubo crecimiento de estos simbiotes en el medio V.IV, sembrado por siembra directa con cuerpo graso de hembras fecundadas. Las colonias que aquí crecieron son de idéntica morfología que las del medio de Löwenstein sin colorante. También coinciden las características morfológicas de los microbios.

Como ya hemos dicho, las colonias que surgen en este medio a partir de la siembra de cuerpo graso de *Pirrocoris apterus*, ya sea aplicando la técnica de Glaser o ya sea por siembra directa, tienen un crecimiento lento y no llegan al alcanzar más de un milímetro de diámetro.

Antes de seguir adelante, creemos conveniente mencionar algunas particularidades del medio de Löwenstein que, como nos ocurrió a nosotros, inducen a error en estos trabajos. En la superficie de este medio aparecen siempre unos puntitos amarillos o blancos, muy brillantes, que tienen el aspecto de colonias microbianas y, precisamente, son de un parecido extraordinario con las auténticas colonias que se originan de las siembras de cuerpo graso en este medio.

Otra de las causas de error, que, si va asociada a la anterior, nos lleva por falsos caminos, al menos en las primeras experiencias, es que este medio, por su compleja composición, presenta en preparaciones microscópicas teñidas por el método de Gram, unos corpúsculos Gram-

positivos unos y Gram-negativos otros, de forma caprichosa, que dan la sensación de que nos encontramos ante unos microorganismos dotados de gran pleomorfismo que es precisamente una de las características de los simbioses intracelulares en sus primeros cultivos en medios artificiales.

Para aclarar estas coincidencias, nosotros sembramos en tubos con Löwenstein las falsas colonias, existentes en la superficie de una placa de Petri, sin haber sido previamente sembrada, y no obtuvimos crecimiento alguno. Lo cual nos indica que estas formaciones hemisféricas y muy brillantes no son colonias de microorganismos, sino que seguramente serán pequeñas gotas de grasa que quedan en la superficie de este medio.

#### **Características morfológicas de los microorganismos aislados.**

Si hacemos una extensión de una de las colonias que ha crecido por siembra directa a las cuarenta y ocho horas de incubación, podemos observar (Figs. 27 y 28) abundantes formas cocáceas Gram-positivas, de tamaño que puede variar desde una hasta cuatro micras de diámetro. Puede suceder que cuando se hace la toma para hacer la extensión, se recoja algún pequeño trozo del cuerpo graso sembrado; en este caso, se pueden ver algunos micetocitos, intactos aún, que están repletos de simbioses en estado de división.

Lo que nunca hemos podido observar en las extensiones de colonias a las cuarenta y ocho horas de esta primera siembra son las levaduras u organismos levaduriformes que hemos descrito en las extensiones de cuerpo graso tomado directamente del insecto. Sin embargo, si de la placa de Löwenstein hacemos una resiembra en un tubo de agar glucosado, obtenemos unas colonias de diámetro un poco mayor que las anteriores. Microscópicamente se observa un cambio en la morfología, éste consiste en que los cocos se van alargando abandonando su forma esférica de tal modo que más bien parecen unos bacilos rechonchos. Cuando este cultivo en agar glucosado va envejeciendo, se observa en algunos casos —no en todos— que entre estas colonias pequeñas surgen otras de un color rosado que van creciendo y dan lugar a unas colonias de cinco o seis milímetros de diámetro.

En preparación microscópica de estas nuevas colonias se observan, además de las formas cocáceas, levaduras típicas, aunque entre ellas no faltan las de tamaño algo mayor y en forma de botella (Figs. 20, 21, 22, 23, 24).

Para separar las levaduras de las formas cocáceas pequeñas hemos

sembrado en placa de agar glucosado, obteniendo de esta manera colonias discretas de ambos microbios: las pequeñas e incoloras, de un milímetro de diámetro, y las grandes y rosadas de cinco milímetros de diámetro.

Los organismos que componen las colonias pequeñas son los mismos que ya hemos descrito en los tubos de agar glucosado. Pero en las colonias grandes, además de las formas que ya tienen una clara morfología de levaduras, se encuentran las formas pequeñas (Fig. 29), no sólo en el exterior de las levaduras, sino también en su interior.

Este hecho nos hizo pensar en un ciclo morfológico de estos simbiotes intracelulares. Lo único nuevo que nosotros aportamos con esto es que este cambio en la morfología se ha verificado en medios artificiales, pues este mismo ciclo o uno muy análogo ha sido descrito, pero «in vivo», por Müller (9), Mahdihassan (27), Schneider (41) y Stammer (50) al estudiar la morfología de los simbiotes de los micetomas de algunos insectos.

Estos autores describen y representan más o menos esquemáticamente los cambios morfológicos que experimentan los simbiotes. En unos casos (Mahdihassan) comienzan por unas formas grandes, de protoplasma homogéneo que luego se va poblando de granulillos, estos granulillos van aumentando en número y en tamaño, hasta que esa forma grande se divide en varias partes pequeñas parecidas a cocos que son llamados «formas de invasión» porque son las que luego van a establecerse en los huevos en estado de desarrollo. Otras veces (Schneider) el microbio pasa por una fase levaduriforme y otra fase bacilar. Tampoco es nuevo el paso de mohos o de levadura a bacteria, pues ya ha sido descrito (Socias: 43, 45, 46, 48 y 49). El pleomorfismo observado en nuestras experiencias de cultivo se debe, a nuestro juicio, a que los microorganismos simbiotes están dotados de una extraordinaria capacidad de adaptación (dentro de los límites de sus exigencias de cultivos), debido a la cual responden a las variaciones del medio ambiente, con profundos cambios, no sólo en su morfología, sino también en sus características tintoriales.

Posiblemente en su hábitat natural, estos cambios también ocurren, pero aquí son debidos al estrecho control del huésped sobre sus simbiotes. Es indudable que en la época del celo o si no en la maduración sexual, los simbiotes han de multiplicarse activamente, pues han de invadir a cada uno de los huevos. En esta época el huésped favorece el desarrollo de sus simbiotes con ciertos factores de crecimiento que vertirá en el micetoma;

sin embargo, en la época de letargo, en los que como *Pirrocoris*, invernan, o después de verificar la reproducción, en los que como los *Blattidos*, no entran en vida latente, los simbiotes han de ser inhibidos sin que su capacidad fisiológica sea alterada, para lo cual la variación del estímulo ha de ser poco acusada; es decir, que se ha conseguido un equilibrio tal, que una variación mínima hacia cualquiera de ambos sentidos (favoreciendo o inhibiendo), produzca grandes cambios en la morfología, fisiología y características tintoriales de los simbiotes. Como estos estímulos se suceden periódicamente, los simbiotes, cambiando, llegan a cerrar un ciclo.

Este ciclo es difícil de determinar y más difícil aún de controlar trabajando en medios artificiales, puesto que en el huésped estará regido por ligeros cambios de las condiciones ambientales. Como no tenemos la menor idea de cuáles puedan ser las causas de estas variaciones morfológicas, nos limitamos a observar lo que ocurre cuando se ha logrado cultivar los simbiotes intracelulares en un medio artificial, donde, al encontrarse libres del control de su huésped, se desarrollan en todas las direcciones, al menos en los primeros cultivos, dando lugar a la pluralidad de formas ya descritas y al cambio de unas en otras, que en algunos casos hace del todo imposible su clasificación, puesto que a veces no sabemos si son levaduras o son bacterias.

Nosotros, en nuestros medios artificiales, en el caso de *Pirrocoris apterus*, hemos visto cerrarse este ciclo, aunque no lo sabemos provocar a voluntad. Como ya hemos dicho, en algunos casos, no sabemos por qué, en cultivos en tubos de agar glucosado de las formas cocáceas pequeñas, surgen, esparcidas entre las colonias de éstas (Fig. 28) otras mayores y de color rosado y que corresponden a microorganismos levaduriformes. Una vez aisladas estas levaduras en cultivos puros, siempre dejan ver, en preparaciones microscópicas, las formas cocáceas dentro y fuera de su protoplasma.

Estas formas pequeñas que nosotros observamos, tanto en el cuerpo graso de *Pirrocoris*, como en los cultivos en medio de Löwenstein sin colorante, corresponden a las formas de invasión a que ya hemos hecho referencia. Esto lo hemos deducido del hecho siguiente: de los cultivos en los que se ha utilizado como material de siembra huevos extraídos de ovarios, siempre salen formas cocáceas pequeñas y nunca las formas de levadura que pueden surgir de cultivos hechos a partir del cuerpo graso del

## CULTIVO "IN VITRO" DE SIMBIOTES INTRACELULARES DE INSECTOS 223

mismo individuo. Tampoco en frotis hechos del contenido de los huevos se han visto las formas ovaladas grandes; sin embargo, en los cortes histológicos del cuerpo graso se pueden ver claramente.

Por lo que vamos exponiendo, nos parece que las formas de levaduras se originan a partir de las formas cocáceas; sin embargo, no sabemos cómo ni por qué causas concretas. Suponemos que, bien durante el desarrollo embrionario o postembrionario, aparece el estímulo que provoca el cambio.

Dado que, como ya hemos señalado, se han clasificado algunas levaduras del cuerpo graso de insectos, nos ha parecido interesante estudiar y clasificar la levadura que nosotros hemos obtenido con la idea de encontrar (si es que existe) alguna relación entre ésta y aquéllas.

Siguiendo las claves de Lodder (24) hemos llegado a la especie *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison: basándonos en las siguientes características:

En el medio de extracto de malta: A los tres días de incubación a la temperatura de 25° C. las células son ovals a largo ovals (2'5-5). (6-12) micras, aisladas o agrupadas por pares. Se multiplican por gemación multilateral. En el fondo del matraz se forma un ligero depósito. Al mes de incubación, además del depósito, puede formarse un anillo muy fino.

Cultivo en agar-malta: A los tres días a 25° C. podemos observar células ovals o largo-ovals (2-3,5). (5-11) micras, aisladas o reunidas en parejas. Después de un mes a 17° C., la estría es lisa, de brillo céreo y color rosa claro.

Cultivo sobre el portaobjetos: No se observa formación de pseudo-micelio.

Medios y métodos empleados para este estudio de la morfología.

Extracto de malta: Se mezcla 1 kg. de malta con 2,6 litros de agua. Se calienta a 45° C. durante tres horas en un bañomaría. Luego se le eleva la temperatura a 63° C. y esta temperatura se mantiene por una hora. La mezcla se filtra a través de un colador de crin y el filtrado se esteriliza a 120° C. durante quince minutos. Luego se filtra a través de papel, se diluye hasta 15° Bllg. y se ajusta al pH alrededor de 5,4. Se reparte en matraces y se esteriliza a 110° C. durante quince minutos.

Agar-malta: En el medio anterior solidificado con un 2 por 100 de agar se esteriliza a 110° durante quince minutos.

Cultivo sobre el portaobjetos: Se preparan estos porta-

objetos esterilizados en un horno, luego se vierte sobre una de las caras agar patata estéril y recién fundido. Cuando esta lámina de agar se ha solidificado, se siembra la levadura haciendo tres estrías, sobre las que luego se coloca un cubreobjetos estéril.

Se colocan dentro de una placa de Petri sobre una varilla en forma de U. Se añade agua estéril con el fin de evitar que el agar se seque. Se incuba a 25° C.

La observación de estos cultivos se hace a los cuatro o cinco días de incubación.

**Fermentación:** Nula. Los tubos de Einhorn incubados a 25° C. Se probaron los siguientes azúcares en solución al 2 por 100 en extracto de malta.

Glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa. No hubo producción de gas en ninguno de los tubos.

**Asimilación de azúcares (fig. 32).**

Glucosa	...	+
Galactosa	...	+
Sacarosa	...	+
Maltosa	...	—
Lactosa	...	—
Inulina	...	—

Esta prueba la hemos realizado de la siguiente manera: Como medio de cultivo se emplea el siguiente, que no posee ninguna fuente de carbono.

SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	...	5	grs.
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	...	1	gr.
SO <sub>4</sub> Mg. 7 (H <sub>2</sub> O)	...	0,5	grs.
Agua destilada	...	1.000	c. c.

Se solidifica añadiendo un 2 por 100 de agar.

Este medio se funde y se deja enfriar hasta unos 45° C. y se vierte en una placa de Petri, donde se han puesto previamente 2 c. c. de una suspensión de levadura y una gota de agua de levadura o de solución de vitaminas. Estos líquidos se mezclan cuidadosamente. Después que se

solidifique el medio se lleva éste a la estufa a 25° C. durante dos o tres horas para que se seque su superficie.

Luego, como única fuente de carbono, en diferentes puntos de la superficie de la placa se coloca una pequeña cantidad de los azúcares (glucosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa). Se incuba a 25°. Los resultados se observan al cabo de veinticuatro o cuarenta y ocho horas. Habrá crecimiento de las levaduras únicamente debajo de los azúcares que ésta es capaz de asimilar.

Asimilación de fuentes de nitrógeno (fig. 33).

Peptona ... ..	+
Nitrato potásico ... ..	—

Se prepara el siguiente medio de agar que no contiene fuente alguna de nitrógeno y que, como fuente de carbono, tiene glucosa.

Glucosa ... ..	20	grs.
PO <sub>4</sub> H <sub>3</sub> K ... ..	1	gr.
SO <sub>4</sub> Mg. 7H <sub>2</sub> O ... ..	0,5	grs.
Agua destilada ... ..	1.000	c. c.

Se solidifica con un 2 por 100 de agar.

Se siembra por el procedimiento anterior y cuando ya la superficie del medio está seca se coloca en su superficie (diametralmente opuestos) un poco de peptona y unos cristallitos de nitrato potásico.

La placa se incuba a 25° C. y los resultados se observan al cabo de uno o dos días.

Asimilación del etanol como única fuente de carbono.—Negativa.

Esta prueba se hace en medios líquidos, de la manera siguiente:

Se añade un 3 por 100 de etanol a su medio basal que no contiene carbono. Se ponen 5 c. c. de esta mezcla en tubos y éstos se incuban con una gota de suspensión de la levadura. Se incuba a 25° C. Los tubos se observan al cabo de una semana.

Como control se siembra un tubo del medio basal, al que no se le ha añadido etanol.

Medio basal:

SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ... .. .	1 gr.
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K ... .. .	1 »
SO <sub>4</sub> Mg. 7HH <sub>2</sub> O ... .. .	0,5 grs.
Agua destilada ... .. .	1.000 c. c.

Se esteriliza a 120° C. durante quince minutos.

El 3 por 100 de etanol, así como una gota de extracto de levadura o de una mezcla de vitaminas, se le añade después de la esterilización.

Hidrólisis de la arbutina.—Positiva.

El medio contiene un 0,5 por 100 de arbutina extracto de levadura solidificado con agar. Se funde y se vierte en placas de Petri, en las que previamente se ha puesto como indicador una gota de una solución acuosa de cloruro férrico. Se mezclan bien. Una vez que se haya solidificado el agar se inocular con la levadura y se incuba a 25° C.

Al cabo de cuatro o seis días, si el resultado es positivo, aparece un anillo pardo oscuro rodeando las colonias.

Presencia de pigmentos carotinoides.—Positiva.

Método: Se hace una suspensión de la levadura en solución alcohólica de KOH. Si existen pigmentos carotinoides quedan libres y cristalizan, dando color azul con ácido sulfúrico concentrado.

Esporulación.—Negativa.

Producción de ésteres.—Negativa.

Producción de ácido.—Negativa.

Producción de almidón.—Negativa.

Hidrólisis de las grasas.—Negativa.

Siguiendo las claves de Lodder llegamos, según las características expuestas, a la especie *Rhodotorula minuta* (Saito) Horison. Sin embargo, encontramos algunas diferencias entre nuestra cepa y dicha especie; éstas son:

NUESTRA CEPA SE DIFERENCIA DEL TIPO POR SUS CELULAS BAS-TANTE MAYORES Y POR NO ASIMILAR EL ALCOHOL ETILICO.

Estas diferencias no son suficientes para hacer de ella una nueva especie, pero podría constituir una variedad.

Esta cepa se conserva en la colección de levaduras del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, con el número 49.

### Experiencias en *Coccinella septempunctata*.

El material que nos ha servido para estas experiencias ha sido recogido en el Jardín Botánico de Madrid.

No hemos obtenido resultados positivos de las siembras de cuerpo graso de individuos machos a pesar de que no encontramos diferencias entre las extensiones del cuerpo graso de éstos y el de las hembras. En ambos (fig. 35) encontramos, además de las células grasas, algunos micetocitos en los que todavía se puede distinguir el núcleo rodeado de los simbioses más o menos numerosos, que se tiñen bien con la coloración de Gram (mod. de Hucker).

Los simbioses aquí son esféricos (fig. 34) de una micra de diámetro. En estos microorganismos no observamos, «in vivo», el pleomorfismo que presentan los simbioses de *Pirrocoris*.

Para el cultivo en medios artificiales hemos seguido las técnicas de esterilización, disección y siembras, así como los medios de cultivo ya descritos.

De todos los medios de cultivo probados solamente nos ha dado resultados positivos el de Löwenstein sin colorante.

Estos simbioses dan en el medio de Löwenstein sin colorante, a las cuarenta y ocho horas de incubación, unas colonias hemisféricas de más de un mm. de diámetro, brillantes, incoloras, compuestas por unas formas cocáceas (fig. 36) que presentan más variaciones en la morfología que cuando las observamos en las extensiones de cuerpo graso.

A medida que se van adaptando a los medios ordinarios de laboratorio la morfología se va estabilizando y, finalmente, dan unos cocos Gram positivos que, posiblemente, estarán incluidos en la familia Micrococáceas (fig. 37).

### Experiencias en *Zonabris 6-punctata*.

El material ha sido recogido en Peña Grande (Madrid).

Como nos ha sucedido en las anteriores experiencias, no hemos conseguido cultivar los simbioses existentes en el cuerpo graso de los machos de esta especie. En las hembras lo hemos conseguido tan sólo cuando éstas presentaban los ovarios llenos de huevos.

En los frotis de cuerpo graso de estos insectos podemos observar algunos micetocitos casi intactos (figs. 38 y 39), en los que, rodeando el núcleo, hay una gran cantidad de simbiontes esféricos pequeños (una micra de diámetro) y fuertemente Gram-positivos.

Las técnicas de esterilización, disección y siembra son las mismas que en las anteriores experiencias.

Hemos empleado también todos los medios de cultivo ya descritos. Tan sólo hemos conseguido el cultivo en el medio de Löwenstein sin colorante, donde a las veinticuatro horas de la siembra directa aparecen unas colonias grandes que, unidas unas con otras, se extienden a lo largo de las estrías.

Si hacemos un frotis de estas colonias y teñimos por Gram (mod. de Hucker), podemos ver (fig. 40) un microorganismo extraordinariamente pleomórfico, cuya forma más frecuente es la esférica, análoga a la observada en el interior de los micetocitos. Además de estas formas hay otras algo mayores y ovaladas, también Gram-positivas, y unos bacilos largos, algunos de los cuales son muy delgados (menos de una micra de anchura), otros tienen más de una micra de espesor y, finalmente, hay otros cuya anchura no es la misma en ambos extremos.

Dado el pleomorfismo que presenta este microorganismo, nos hizo pensar que se tratara de dos o más especies microbianas que habían crecido juntas.

Descartamos esta idea cuando, después de hacer el aislamiento en placa de Petri y obtener colonias discretas, observamos en éstas la misma pluralidad de formas, cosa que nos demostró que todas ellas procedían de un mismo individuo.

#### Experiencias en *Blattella germánica*.

Si hacemos una extensión de cuerpo graso de *Blattella germánica* podemos observar al microscopio (Figs. 42 y 43) sus simbiontes intracelulares, los cuales presentan una morfología claramente microbiana; son unas formas alargadas (de uno a dos micras de ancho por cuatro a seis de largo), Gram-positivas, generalmente un poco curvadas y de extremos redondeados. Se reproducen, según se desprende de nuestras preparaciones, por una especie de división desigual que más bien parece una gemación, pues no es raro encontrar células alargadas como las que acaba-

mos de describir, en cuyo extremo hay una «célula hija» que es perfectamente esférica.

También en los frotis de cuerpo graso podemos encontrar restos de micetocitos en los que se puede apreciar el núcleo rodeado por estos simbioses.

Estos simbioses son característicos de todos los Blattidos y, según Koch (21), de *Mostotermes darwiniensis*; este autor, basándose en la analogía existente en los simbioses, relaciona filogenéticamente los Blattidos con los Isopteros.

Acerca de la naturaleza de estos simbioses se ha escrito mucho; la tendencia general, como ya hemos señalado en el primer capítulo, es considerarlos como bacterias; sin embargo, no se han incluido en ninguna familia determinada, sino que se les denomina con el término general de «bacteroides».

Estos «bacteroides» algunas veces han sido incluidos en el género *Bacillus* (Mercier, Gropengiesser, Bode), otras veces como *Spirillum* (Glaser, 1929) y otras como *Corynebacterium* (Glaser, 1929 y 1930). Estos autores se han basado en la clasificación de los microbios que han obtenido en sus experiencias de cultivo.

Lwoff (25), basándose en las características que presentan los «bacteroides» en el cuerpo graso, establece la duda diciendo que morfológicamente pueden ser considerados como bacterias, pero que por la manera de reproducirse se parecen a las levaduras. Añade que en el caso de que sean bacterias han de estar incluidas en el género *Bacillus*, y si son levaduras pertenecen a los *Schyzosacharomyces* por los tabiques transversales que presentan.

Nosotros, basándonos en los hechos que a continuación exponemos, adoptamos las nuevas ideas pleomorfistas y consideramos a los simbioses de *Blattella germanica* como un estado intermedio entre hongo y bacteria.

Tampoco hemos conseguido cultivar los simbioses del cuerpo graso de los machos de *Blattella germanica*.

De las siembras, por los dos procedimientos ya descritos, verificadas, a partir del cuerpo graso de hembras, hemos podido cultivar sus simbioses intracelulares sólo sembrando en el medio de Löwenstein el material extraído de hembras muy próximas a hacer la puesta. Dentro de este período obtenemos dos resultados diferentes:

Si la siembra la hacemos cuando va a comenzar la puesta (la ooteca comienza a formarse), obtendremos a las cuarenta y ocho horas de incubación a 27° C. unas colonias pequeñas (0,5 mm. de diámetro) transparentes formadas por un microorganismo Gram-positivo pleomórfico, cuya forma más frecuente son unos bacilos largos (1 micra por 8 a 20 micras), que se pueden presentar aislados o formando cadenas de tres a cinco elementos; también existen formas bacilares cortas, pero fuertemente curvadas, hasta el punto de que a veces sus dos extremos se tocan. No faltan en las extensiones de estas colonias las formas redondas. (Figs. 44 y 45.)

Si verificamos la siembra cuando los ovarios contienen huevos completamente desarrollados, pero sin que se observen indicios de que se vaya a formar la ooteca, nos aparecen a las veinticuatro a cuarenta y ocho horas de incubación a 27° unas colonias de unos tres milímetros de diámetro, brillantes, de color amarillo, compuesto por un organismo levaduriforme que presenta gran cantidad de micelio. Estas formas son fuertemente Gram-positivas.

Crece bien en agar-malta, dando a las veinticuatro horas de incubación a la temperatura de 27° C. unas colonias blancas, brillantes y de consistencia viscosa. En frotis de estas colonias podemos observar un microorganismo Gram-positivo claramente levaduriforme que presenta la particularidad (Figs. 46 y 47) de formar grupos de tres o cuatro células que se disponen alrededor de un punto. En este mismo cultivo, a los seis días de incubación, estas formas ya son alargadas, adoptando la forma que presentan en las células del cuerpo graso (compárese las fotografías 48 y 49 con las 42 y 43).

Dado que no conocíamos la manera tan especial de agruparse, intentamos su estudio y clasificación, pero llegamos a la conclusión de que, aunque sus características son las del género *Torula*, es decir, que se trata de un hongo levaduriforme. He aquí sus características:

En malta, a los tres días de incubación a la temperatura de 25° C., sólo forma depósito. Células redondas alargadas (2,5-7). (6-16), multiplicándose por tabicación.

Al mes de incubación a 17° C. forma anillo fino e islotes mucosos.

La estría sobre agar malta, después de un mes a 17° C., es de color parduzco, brillante y mucosa.

En el cultivo sobre portaobjetos forma un micelio verdadero que se

fragmenta en trozos pequeños, dando la impresión de que se han formado artrosporas.

Fermentación: Nula.

Asimilación de azúcares (fig. 50).

Glucosas ... ..	+
Galactosa ... ..	+
Sacarosa... ..	+
Maltosa ... ..	—
Lactosa ... ..	—

Asimilación de fuentes de nitrógeno (fig. 51).

Peptona ... ..	+
Nitrato potásico ... ..	—

Asimilación de etanol: Negativa.

Esporulación: Negativa.

Hidrólisis de la arbutina: Ligeramente positiva.

#### PARTE CUARTA

##### ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS IDEAS PLEOMORFISTAS

Puesto que el comportamiento de los simbiotes intracelulares de los insectos, tanto «in vivo» como «in vitro», solamente puede ser explicado por las teorías pleomorfistas, vamos a hacer una reseña de las vicisitudes por las que estas teorías han pasado desde que la bacteriología constituyó una ciencia.

Aunque desde mediados del siglo XVI, Fracastoreo de Verona adelantó el concepto de que existía un «contagium vivum» que se podía considerar como la causa posible de la enfermedad infecciosa, fué Leeuwenhoek, en el último tercio del siglo XVII, quien, con sus lentes, abrió un nuevo campo para las ciencias, poniendo de manifiesto los célebres «animáculos» que, con nombres distintos, siguieron incluidos dentro de la Zoología, hasta que Ferdinand Cohn, Profesor de Botánica de Breslau, el año 1854, sugi-

rió, en una Memoria publicada «sobre el desarrollo de algas y hongos microscópicos», que la familia que Ehrenberg había creado en el año 1838 con el nombre de «Vibronia» debía estar en el reino vegetal mejor que en el animal, puesto que presentaban analogías con algunas algas microscópicas. Propuso el nombre de «Mycophyceae» o «Wasserpilze», aludiendo a la falta de clorofila y a su abundancia en las infusiones

F. Cohn no sólo es el creador de la Bacteriología como una ciencia, sino que es quien en 1872 sienta las bases de la doctrina monomorfista en su clásica «*Untersuchungen über Bakterien*» donde establece géneros y especies que considera con caracteres fijos, que se transmiten por herencia y que han de servir para su clasificación.

Basándose en esta idea clasifica las bacterias en cuatro grupos, cada uno de los cuales contiene uno o más géneros

Tribu I) Sphaerobacteria.—Género *Micrococcus*.

Tribu II) Microbacteria.—Género *Bacterium*.

Tribu III) Desmobacteria.—Géneros *Bacillus* y *Vibrio*.

Tribu IV) Spirobacteria.—Géneros *Spirillum* y *Spirochaeta*.

Como podemos observar, los nombres aluden a las características morfológicas.

Ya, antes que Cohn presentara la Bacteriología como monomorfista, Ernst Hallier, Profesor de Botánica de Jena, había trabajado en el pleomorfismo de los hongos y había publicado varios trabajos, en los que sostenía que las formas microscópicas de los vegetales parásitos no constituían géneros y especies, sino que eran simplemente estados («*Morphen*») de desarrollo de hongos más complicados y que las transformaciones eran debidas a cambios del medio, a la temperatura y a otros factores menos importantes. Estos ciclos evolutivos los estudió añadiendo diversos productos químicos a los medios de cultivo y comparando los resultados con los que obtenía de los cultivos conservados en diferentes condiciones. Para estos estudios ideó dos aparatos: uno llamado por él «*Culturapparat*», donde provocaba los cambios en el medio, y el otro, que llamó «*Iso-lirapparat*», que era donde conservaba un cultivo como control para luego hacer la comparación.

Esta teoría de Hallier, que hoy en día está olvidada, debido a que sus aparatos y técnica eran rudimentarios y poco seguros, sin embargo en aquel tiempo fueron conocidos por muchos de los bacteriólogos, que se valieron del pleomorfismo para explicar ciertos cambios que observaban en

la morfología de las bacterias que estudiaban, dudando, por lo tanto, de las especies establecidas por Cohn. Entre éstos están Huxley, Lister, Ray Lankester, Klebs, Warming y especialmente Billroth, Cienkowski y Zopf.

Nägeli lleva al extremo las doctrinas pleomorfistas al oponerse a la idea de Cohn sobre la fijeza morfológica de los Esquizomicéticos (término introducido por Nägeli), emitiendo su «teoría de la adaptación» por la que pasaban a ser caracteres accidentales la morfología y la fisiología. «Las bacterias—dice—son células móviles o inmóviles y éstas células pueden provocar, según las condiciones de existencia, todas las fermentaciones y todas las enfermedades infecciosas.»

Por el año 1883 la teoría de Zopf reemplaza a la de Nägeli. Aunque no está de acuerdo con la clasificación de Cohn, admite, sin embargo, la posibilidad de fundar especies basándose en los caracteres morfológicos. Según su teoría, los géneros son estados de las formas vegetativas de las especies multiformes y la transformación de una especie en otra depende principalmente de las condiciones de nutrición, como Nägeli había sostenido.

Clasifica las bacterias en cuatro grupos en forma globular.

1. *Coccaceae*: Se presenta únicamente en forma globular.
2. *Bacteriaceae*: Células cocáceas, bacilares y filamentosos, sin distinguirse la base y el ápice.
3. *Leptotricheae*: Cocos, bacilos y filamentos, estos últimos con base y ápice.
4. *Cladotricheae*: Cocos, bacilos, espirales y mostrando ramificación.

Winogradsky, en 1887, en su trabajo sobre las bacterias del azufre, ataca a las ideas pleomorfistas, mientras que Metchnikoff es acérrimo partidario de estas doctrinas.

Durante este tiempo en Francia se traslada el mismo problema al estudio de las levaduras y se preguntan si deben considerarse como especies autónomas o si representan, simplemente, un estado más avanzado en el desarrollo de los hongos filamentosos, que durante el invierno presentarían la forma micelial y en otoño pasan a ser levaduras.

En este problema toma parte Pasteur (1875) con toda una serie de trabajos, en los que observa que las levaduras encontradas en el pellejo de las uvas están presentes en ellas en una determinada época del año,

coincidiendo con la madurez del fruto, pero al llegar el invierno desaparecen gradualmente. Pasteur supone que las levaduras que se encuentran en las uvas proceden del hongo *Dematiium pullulans*, y se expresa del siguiente modo: «Las células de las levaduras se originan de pequeños quistes de *Dematiium*, que tanto abunda en el poien.»

Jørgensen (195) admite también una relación entre los condios de los hongos y las levaduras.

Pasteur, más tarde, declara que su idea era errónea, cuando Chamberland demuestra que estas levaduras de *Dematiium* no son capaces de producir la fermentación alcohólica.

Durante la última década del pasado siglo y las dos primeras del presente, se atenúan las polémicas y las opiniones se inclinan a favor de las ideas monomorfistas sostenidas ahora por Robert y su escuela. Las bacterias son seres rígidamente específicos, con morfología propia que varía muy poco según el medio de cultivo; se multiplican por bipartición sencilla y no se piensa en ningún otro proceso de reproducción.

No obstante, ya desde 1914 comienzan a reaparecer las ideas pleomorfistas cuando varios autores, entre ellos Löhnis, Hort y Enderlein, llaman la atención sobre nuevos modos de reproducirse las bacterias muy diferentes de los sencillos procesos de división binaria. Aunque estos hechos fueron achacados a defectos de las técnicas por algunos autores, sin embargo, despertaron interés y muchos investigadores se dedican al estudio del pleomorfismo bacteriano, apareciendo trabajos como los de Niemeyer, en 1924; Petchenco, en 1930; De Regel (1923) y Bachinskaya, en 1935, sobre la morfología del *Azotobacter* en condiciones de cultivo controladas.

A medida que nos vamos acercando al momento actual, va aumentando de una manera considerable el número de bacteriólogos que se interesan por el pleomorfismo, estableciendo ciclos vitales de mohos y de levadura que pasan por una fase de bacterias, con la ventaja de que hoy se trabaja con medios de cultivo sólidos y con las suficientes garantías de asepsia. Entre este último grupo de pleomorfistas destacan Socías y su escuela, Enderlein y Schanderl.

Vemos por otro lado que la bacteriología monomorfista va cediendo terreno, puesto que hoy en día, aunque no admitan las transformaciones

moho-bacteria o levadura-bacteria, no hay ningún bacteriólogo que no reconozca los fenómenos debidos a la variación bacteriana.

Se entiende por variación bacteriana al conjunto de cambios que experimentan las bacterias en el tamaño de sus células, en su forma, motilidad, cápsulas, pigmentos y otros caracteres, motivados en la mayoría de los casos, según parece, por irregularidades muy pequeñas de tiempo y temperatura de incubación, edad del cultivo, composición del medio y otros factores ambientales. Algunos de los cambios parecen ocurrir espontáneamente, es decir, sin que encontremos causas a que atribuirlos.

Los cambios que se estudian dentro de la variación bacteriana pueden dividirse en dos grupos:

- a) Cambios temporales o modificaciones.
- b) Variaciones hereditarias.

Las modificaciones son alteraciones en la morfología o modo de desarrollo de las células bacterianas o de sus colonias, o también en el comportamiento fisiológico y bioquímico. Estas alteraciones no son hereditarias, puesto que no pasan a las resiembras si no se mantienen las mismas condiciones ambientales.

Variación hereditaria es la aparición de un nuevo carácter que persiste en los medios de cultivo y cuando se hacen cultivos paralelos de la variante y de la original dan lugar a crecimientos diferentes y característicos.

Estas variaciones pueden ser reversibles e irreversibles. Estas últimas fueron descubiertas en *B. coli mutabile*, por Neisser y Massini, quienes dieron a este fenómeno el nombre de «mutación» por su analogía con las mutaciones de De Vries.

Más frecuentes son las variaciones reversibles, en las que hay una cierta tendencia de las formas variantes a volver a las formas originales. Entre estas variaciones reversibles encontramos dos tipos: a) Variación alternante, en la que la variante, que puede ser totalmente diferente de la forma inicial, después de dos o tres resiembras, vuelve a transformarse completamente en ésta. b) Variación progresiva, en la que, a medida que se van haciendo resiembras, van apareciendo cada vez más colonias de la variante, sin que llegue a desaparecer la forma normal.

Para explicar la variación bacteriana han sido emitidas varias teorías, entre ellas la de la ciclo genia, que considera las formas

variantes como estados de los ciclos vitales de las especies, que tienden a volver al punto de partida. Estos estados están determinados por marcados cambios morfológicos y fisiológicos. Los partidarios de la ciclogenia admiten la reproducción de las bacterias, no sólo por división simple, sino también por otros procedimientos, como la gemación y la formación de gonidios en el interior de la bacteria. Entre los autores que sostienen esta teoría están Löhnis, Mellon, Enderlein, Thornton y Gangulee; estos dos últimos han demostrado que el *B. racicola* presenta un ciclo vital, en el que dichos autores observan tres estados diferentes: dos bacilos claramente distinguibles entre sí y una forma cocácea. Han demostrado el cambio de unas formas en otras y pueden cerrar el ciclo dos veces en veinticuatro horas.

A la vista de esta brevísimas exposición de las teorías pleomorfitas, nos vemos obligados a admitirlas para poder explicar los cambios morfológicos que experimentan los simbioses intracelulares.

### CONCLUSIONES

1) En el cuerpo graso de *Pirrocoris apterus*, *Coccinella septempunctata*, *Zonabris 6-punctata* y *Blattella germanica* existen micetocitos diseminados entre las células del cuerpo graso.

2) Para conseguir el cultivo de los simbioses intracelulares en medios artificiales es necesario que éstos sean ricos y complejos.

3) La condición anterior no es suficiente por los hechos que a continuación enumeramos:

a) No hemos logrado cultivar los simbioses intracelulares del micetoma de individuos machos.

b) No hemos cultivado nunca los simbioses intracelulares de hembras jóvenes o adultas no fecundadas si la siembra la hacemos por el procedimiento de la siembra directa.

4) Empleando la técnica de Glaser obtenemos el cultivo en el medio de Löwenstein, sin colorante, si sembramos cuerpo graso de hembras de *Pirrocoris apterus*, *Coccinella septempunctata* y *Zonabris 6-punctata*.

5) Empleando la técnica de la siembra directa conseguimos resultados positivos solamente cuando las hembras están fecundadas.

6) Con la técnica de Glaser nunca hemos conseguido el cultivo de los simbioses intracelulares de *Blattella germanica*.

7) Se puede conseguir el cultivo en el medio de Löwenstein sin colorante de los simbioses intracelulares de las hembras de *Blattella germanica* solamente cuando éstas están muy próximas a verificar la puesta.

8) En *Pirrocoris apterus* los simbioses experimentan un ciclo morfológico, pasando por formas cocáceas y levaduriformes, que se pueden cultivar en medios artificiales.

9) Los simbioses de *Blattella germanica* al ser cultivados en el medio de Löwenstein pueden dar lugar a dos microorganismos diferentes, uno de los cuales es una bacteria y el otro es un hongo levaduriforme cuyas características coinciden con las del género *Torula*.

10) Sólo por las teorías pleomorfistas puede ser explicado el comportamiento de los simbioses intracelulares, tanto «in vivo» como «in vitro».

#### RESUMEN

En este trabajo se hace un estudio de la literatura referente a la simbiosis intracelular, procurando dar una explicación de las contradicciones que se observan, sobre todo, en los trabajos de cultivo de los simbioses.

Se hacen aclaraciones sobre el empleo de algunas palabras con ánimo de simplificar la terminología.

Se da una técnica y un medio artificial para el cultivo de los simbioses intracelulares.

Se han cultivado los siguientes microorganismos:

De <i>Pirrocoris apterus</i>	{	Una bacteria cocácea. Una levadura que constituye una variedad de <i>Rhodotorula minuta</i> .
------------------------------	---	--

De *Coccinella septempunctata*.—Una forma cocácea.

De <i>Zonabris 6-punctata</i> .	{	Un microorganismo extraordinariamente pleomórfico.
---------------------------------	---	--

De <i>Blattella germanica</i>	{	Una bacteria pleomórfica. Un hongo levaduriforme.
-------------------------------	---	--

## BIBLIOGRAFIA

- (1) **ANADON, Emilio.**—1943. Sobre simbiosis endocelulares de Ephemigerinos. *Bol. R. Soc. Española H. Nat.*
- (2) **BAB, Naidu.**—1945. A special technique for the identification of the Membracidae species by intracellular micro-organisms of their tumours. *Current Sci.* 14 (8) 210-211.
- (3) **BEADLE, G. W., E. L. TATUN and C. W. CLANCY.**—1939. Development of eye colors in *Drosophila*: Production of v-Hormone by fat body. *Biol. Bull.* 77 (3), 407-424.
- (4) **BERLESE.**—1909. Gli insetti.
- (5) **BLEWETT and FRAENKEL.**—1943. Intracellular symbiosis and vitamins requirements of two insects, *Lasioderma serricorne* and *Sitodrepa panicea*. *Proc. Roy Soc. Ser. B. Biol. Sci.* 132 (867); 212-221.
- (6) **BODE, Hans.**—1936. Untersuchungen über die Symbiose von Tiere mit pilzen und Bakterien. V. Mitteilung: Die Bakteriensymbiose bei Blattiden und Verhalten von Blattiden bei asseptischer Aufzucht. *Arch. Mikrobiol.* 7; 391-403.
- (7) **BRUES, Ch. T. and B. C. DUNN.**—1945. The effect of Penicillin and certain Sulfa Drugs on the intracellular-bacteroids of the Cockroach. *Science*, 101.
- (8) **BUCHNER, Paul.**—1947. Symbiosis in *Oliarius*. *Nature*, pág. 264.
- (9) ———— 1949. Symbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Walter de Gruyter & Co. Berlin.
- (10) **BUXTON, P. A.**—The louse. Edward Arnold & Co. London.
- (11) **FROBISHER, M.**—1947. Elementos de Bacteriología. Salvat Editores. Barcelona.
- (12) **CIER, H. T.**—1936. The morphology and behavior of the intracellular bacteroids of roaches. *Biol. Bull.* 71: 433-452.
- (13) **GIER, H. T.**—1946. Intracellular bacteroids in the roach (*Periplaneta americana*). *J. Bacteriol.* 57: 157-189.
- (14) **GLASER, R. W.**—1920. Biological studies on intracellular bacteria. *Biol. Bull.* 39: 133.
- (15) **GLASER, A. W.**—1929. On the isolation and classification of the isolation and classification of the so-called intracellular «symbionts» or «rickettsia» of *Periplaneta americana*. *J. Exptl. Med.* 51: 59-82.

- (16) GLASER, R. W., 1930.—Cultivation and classification of the «bacteroids», «symbiotic» or « rickettsia» of *Blattella germanica*. *J. Exptl. Med.* 51: 903-907.
- (17) GLASER, R. W., 1946.—The intracellular bacteria of the cockroach in relation to symbiosis. *J. Parasitol.* 31: 483-489.
- (18) GROPENGIESSER, Curt.—1925. Untersuchungen über die Symbiose der Blattiden mit niederen pflanzlichen organismen. *Zentr. Bakt. Parasitenk.*, II. 64; 495-511.
- (19) HERTIG, M.—1921. Attempts to cultivate the bacteroids of the Blattidae. *Biol. Bull.*, 41: 181.
- (20) JAVELLY.—1914. Les corps bacteroides de la Blatte (*Periplaneta orientalis*) n'ont pas encore été cultivés.
- (21) KOCH, A.—1938. Die Bakteriensymbiose der Termiten. *Verhand. der Deutschen Zoolog. Gesellschaft.* 81-90.
- (22) KOCH, A.—1950. Der Kornkäfer, ein Getreideschädling mit Bakteriensymbiose. *Mikrokosmos*, octubre 1950.
- (23) KOCH, A.—1951. Die Bakteriensymbiose der Kopflaus. *Mikrokosmos*, octubre 1951.
- (24) LODDER, J., and N. J. W. KREGER.—1952. The yeast. A. Taxonomic Study. North-Holland publishing Company Amsterdam.
- (25) LWOFF, A.—1923. Nature et position systematique des bacteroides des Blattes. *C. R. Soc. Biol.*, 89: 945-946.
- (26) MAHDIHASSAN, S.—1939. Pigmentbildenden Bakterien aus einer entsprechend gefärbten Cicaden. *Verhandl. der Deutschen Zoolog. Gesellschaft.*
- (27) MAHDIHASSAN, S. I.—Bacterial Symbiosis in a *Margarodes* sp.
- (28) MARCO, H.—1950. «Contribución al estudio anatómico y fisiológico de los Efípigerinos de la Sierra de Guadarrama, en especial del cuerpo adiposo y del corpus allatum.»  
(Tesis doctoral que obra en la Biblioteca de la Universidad de Madrid.)
- (29) MERCIER, M. L.—1906. Les corps bacteroides de la Blatte (*Periplaneta orientalis*): *Bacillus cuenoti* (n. sp. L. Mercier) *C. R. Soc. Biol.*, 61.
- (30) NEUKOMM, Alexandre.—1927. a. Sur la structure des bacteroides des Blattes. *C. R. Soc. Biol.*, 96: 306.
- (31) NEUKOMM, Alexandre.—1927 b. Action des rayons ultra-violet

sur les bacteroides des Blates (*Blattella germanica*) *C. R. Soc. Biol.*, 96: 1.155.

(32) **PACKARD**.—1909. A text-book of Entomology. MacMillan & Co. London.

(33) **PAILLOT et NOEL**.—1928. Recherches histophysiologiques sur le tissu adipeux des larves d'Insectes (*Bombys mori* et *Pieris brassicae*). *Bull. Hist. Appt. Phys. et Path.*, 5 (1): 12-20.

(34) **PARKER and HASWELL**.—1949. A text-book of Zoologi. MacMillan and Co., Limited. London.

(35) **PEKLO**.—1946. Symbiosis of *Azotobacter* with insects. *Nature*,

(36) **PIERANTONI, U.**—1944. Tratado de Zoología. Edit. Labor, S. A. Madrid.

(37) **PIERANTONI, U.**—1943. Compendio de Biología. Edic. Labor, S. A. Madrid.

(38) **RIES, ERICH**.—1930. Ueber die symbionten der Läuse und Federlinge Zentr. *Bakt. Parasitenk. und Infektion. Orig.*, 117: 286.

(39) **ROMEIS, B.**—1928. *Guía-Formulario de Técnica histológica*. Edic. Labor, S. A. Barcelona.

(40) **ROSENKRANZ, W.**—1939. Die Symbiose der Pentatomiden (*Hemiptera hetroptera*). *Zeitchr. Morph. u. Okol. Tiere.*, 36 (2): 279-309.

(41) **SCHNEIDER, G.**—1939. Beitrage zur Kenntnis der symbiontischen Einrichtungen der Heteropteren. *Zeitschr. Morph. u. Okol. Tiere.*, 36 (4): 595-644.

(42) **SOCIAS, A.**—1944. Formas pseudocelulares del agente etiológico del tracoma. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*. Año XVIII, núm. 7.

(43) **SOCIAS, A.**—1949. Un hongo (*Eumyceta*) se transforma en bacteria (*Schizomyceto*). *Anales de Edafología y Fisiología Vegetal*. Tomo VIII, núm. 2.

(44) **SOCIAS, A.**—1950 a. Bacterias y mohos procedentes de cultivos de folículos tracomatosos. *Microbiología Española*: 3 (2), 99-116.

(45) **SOCIAS, A.**—1950 b. Formas micósicas en la conjuntiva tracomatosa. *Microbiología Española*. 3 (3/4), 187-198.

(46) **SOCIAS, A.**—1951. De la metilación orgánica como factor de la transformación moho-bacteria y su papel en la etiología microbiana del tracoma. *Microbiología Española*, 4 (1), 33-38.

- (47) **SOCIAS, A., C. GONZALEZ y C. RAMIREZ.**—1952. Transformación de varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* en *Bacillus subtilis*. *Microbiología Española*, 5 (3/4), 133.
- (48) **SOCIAS, A. y C. GONZALEZ.**—1952. Ciclo vital levadura-bacteria. *Microbiología Española*, 5 (3/4), 169.
- (49) **SOCIAS, A. y G. SIERRA.**—1951. El factor de transformación mohobacteria. *Microbiología Española*, 4 (1), 23-32.
- (50) **STAMMER, Hans-Jurgen.**—1931. Eine Bakteriensymbiose bei den Donaciinen (Coleoptera). *Naturwissenschaften*, 12 (19): 270.
- (51) **STEINHAUS, E. A.**—1949. Principles of insect pathology. MacGraw-Hill Company, Inc. New York.
- (52) **TOTH, László.**—1947. Entwicklungzyklus und Symbiose von Pemphigus spirothecas Pass (Aphidine). *Zeitschr. Morphol. u. Okol. Tiere*, 36 (3) 412-437.
- (53) **WEURMANN.**—1945. Investigations concernig the symbiosis of bacteria in *Triatoma infectans*. (Klug.) *Ant. v. Leeuwech. J. Microbiol. and Ser.* 11 (3/4) 129.
- (54) **WIGGLESWORTH, V. B.**—1950. Insect physiology. Methen & Co. Ltd. London.
- (55) **WINOGRADSKY.**—1949. Microbiologie du Sol. Masson et Cie. Paris.
- (56) **WOLF, Jean.**—1924 a. Contribution a la morphologie des bacteroides des Blattes (*Periplaneta orientalis*).
- (57) **WOLF, Jan.**—1924 b. Contribution a la localization des bacteroides dans les corps adipeux des Blattes (*P. orientalis* L.) *C. R. Soc. Biol.*, 91: 1.182.
- (58) **WOLLMAN, E.**—1926. Observation sur une lignée aseptique des Blattes (*Blattella germanica*) datant de cinq ans. *C. R. Soc. Biol.*, 95: 164-165.

Fig. 1.—Microfotografía de un corte transversal de *Pirrocoris apterus*. Se pueden observar los dos estratos de cuerpo graso. Tinción: Hematoxilina férrica de Heidenhain.

Fig. 2.—Microfotografía de un corte transversal de larva de *Taumatopoea* sp. p, cuerpo graso parietal; v, cuerpo graso visceral; d, tubo digestivo. Tinción: Hematoxilina férrica de Heidenhain.

Fig. 3.—Microfotografía de cuerpo graso de *Taumatopoea* sp. En el protoplasma de las células grasas, unos gránulos negros que consideramos como simbiotes.  $\times 1200$ . Hematoxilina férrica de Heidenhain.

Fig. 4.—Células poliédricas que componen el cuerpo graso visceral de *Pirrocoris apterus*.  $\times 1000$ . Hematoxilina férrica de Heidenhain.

Figs. 5, 6 y 7.—Distintos aspectos del cuerpo graso de *Pirrocoris apterus* mostrando simbiotes levaduriformes.  $\times 1000$ . Hematoxilina férrica de Heidenhain.

Fig. 8.—Microfotografía de corte transversal de *Pirrocoris apterus*. Las flechas señalan micetocitos cargados de formas cocáceas.

Fig. 9.—Cuerpo graso vísceras adosado al tubo digestivo. De un corte transversal de *Pirrocoris apterus*.

Fig. 10.—Simbiotes en forma de levadura. Corte transversal de *Pirrocoris apterus*.

Fig. 11.—Formas alargadas en un micetocito. Corte transversal de *Pirrocoris apterus*.

Figs. 12, 13, 14 y 15.—Diversos aspectos del cuerpo graso de *Pirrocoris apterus* mostrando simbiotes levaduriformes y cocáceos.

Figs. 16, 17, 18 y 19.—Cuatro microfotografías tomadas de un frotis de cuerpo graso de *P. apterus* teñido por Gram (modificación de Hucker), en las que se ven estas extrañas formas filamentosas que presentan, de trecho en trecho, abultamientos que se tiñen más intensamente de violeta.

Figs. 20, 21, 22 y 23.—Diferentes campos de un frotis hecho de las colonias grandes de color rosado, que a veces surgen en el medio de agar glucosado entre las pequeñas e incoloras que crecen de la resiembra de los simbiotes de *P. apterus* cultivados en Löwenstein sin colorante. Aquí se pueden observar claramente dos tipos de microbios; unos de forma cocácea, muy pequeños, y otros levaduriformes, fuertemente Gam-positivos, que generalmente se presentan agrupados o formando largas cadenas ramificadas.

Fig. 24.—Frotis de las colonias de levadura cultivadas en agar glucosado, en el que se observan los dos tipos de microbios. En algunas de las levaduras (cuando queda débilmente teñida, como la que indica la flecha), se pueden ver formas cocáceas en su interior.

Figs. 25 y 26.—Otros campos del frotis anterior, en los que se ven los cocos formando agrupaciones que conservan la forma de la levadura. Esto constituye una prueba de que las levaduras pierden su membrana, dejando en libertad a las formas cocáceas que había en su interior.

Fig. 27.—Formas cocáceas de los simbiotes de *P. apterus*, aisladas de las levaduriformes en cultivo puro, por el medio de Löwenstein, sin colorante.

Fig. 28.—Tubo de agar glucosado donde han surgido entre las colonias transparentes de cocos (no se ven debido a su transparencia) varias colonias grandes y rosadas que corresponden a la *Rhodotorula minuta*.

Fig. 29.—Extensión de un cultivo de *Rhodotorula minuta*, en la que se pueden observar las formas cocáceas.

Fig. 30.—Frotis de un cultivo de *Rhodotorula minuta* cultivada en agar-matta.

Fig. 31.—Cocos aislados del cuerpo graso de *P. apterus*, aplicando la técnica de Glaser y el medio de Löwenstein, sin colorante.

Fig. 32.—Fotografía de la placa donde se hizo la prueba de asimilación de azúcares para el estudio de *R. minuta*. Las áreas claras son debidas al crecimiento de la levadura M = Maltosa; L = Lactosa; Gl = Glucosa; G = Galactosa; S = Sacarosa.

Fig. 33.—Fotografía de la placa donde se hizo la prueba de asimilación de nitratos para el estudio de *R. minuta*. N = nitrato potásico; P = peptona.

Fig. 34.—Microfotografía de una extensión de cuerpo graso de *Coccinella septempunctata* teñida por el método de Gram (modif. de Hucker). Se observan abundantes simbioses que presentan la forma esférica.

Fig. 35.—Restos de un micetocito de *C. septempunctata*, en el que se ven los simbioses alrededor del núcleo, que es lo único que queda del micetocito.

Fig. 36.—Frotis de un cultivo en Löwenstein sin colorante de los simbioses intracelulares de *C. septempunctata*. (Obsérvese el pleomorfismo.)

Fig. 37.—Frotis de un cultivo en agar glucosado de los simbioses intracelulares de *C. septempunctata*.

Figs. 38 y 39.—Micetocitos observados en un frotis de cuerpo graso de *Zonabris 6-punctata*. Se observan los simbioses ocupando la totalidad del protoplasma. Estos simbioses se presentan como formas cocáceas de tamaño y forma muy constante.

Figs. 40 y 41.—Frotis de un cultivo de los simbioses de *Zonabris 6-punctata* en Löwenstein sin colorante. Obsérvese el extraordinario pleomorfismo.

Figs. 42.—Frotis de cuerpo graso de *Blattella germánica*. En el centro de la fotografía se ve el núcleo de un micetocito que tiene a su alrededor algunos simbioses. La flecha señala a uno de los microorganismos que está sufriendo una división desigual a modo de gemación.

Fig. 43.—Otro campo de frotis anterior; en él se ven los simbioses, algunos de los cuales están en división.

Figs. 44 y 45.—Microorganismo pleomórfico aislado de *Blattella germánica* cuando se está iniciando la formación de ooteca. Cultivado en Löwenstein, sin colorante, a las cuarenta y ocho horas de incubación.  $\times 1.300$ .

Figs. 46 y 47.—Hongo levaduriforme cultivado a partir del cuerpo graso de *Blattella germánica* fecundada, con huevos bastante desarrollados en sus ovarios, aunque aún no se observan indicios de formación de la ooteca. Cultivada en agar malta. Cuarenta y ocho horas de incubación, a 27°.  $\times 1.050$ .

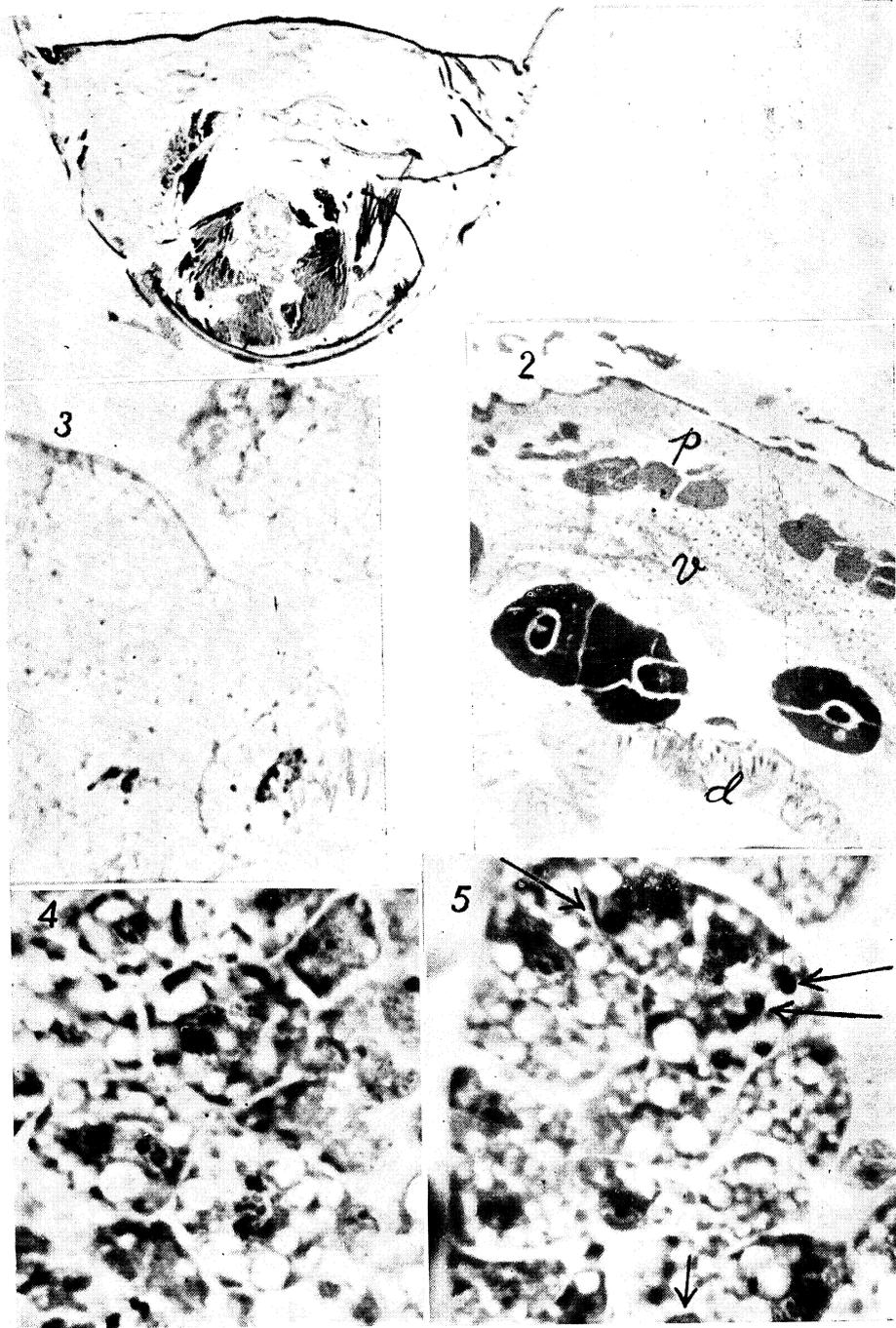
Figs. 48 y 49.—El mismo cultivo a los seis días de incubación a 27° C. Estas formas alargadas tienen un parecido extraordinario con los simbioses que se observan en las figuras 42 y 43, sobre todo en la manera de dividirse.

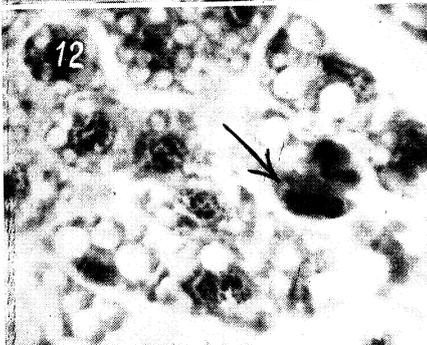
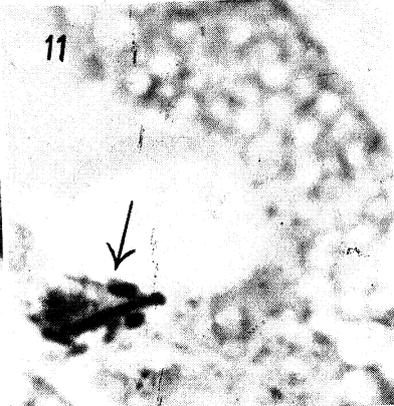
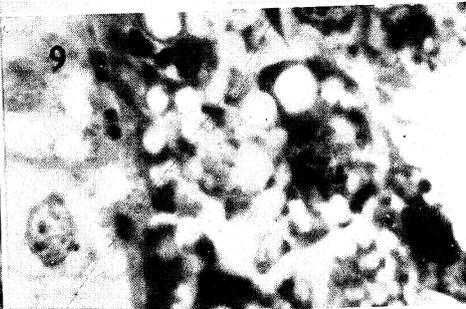
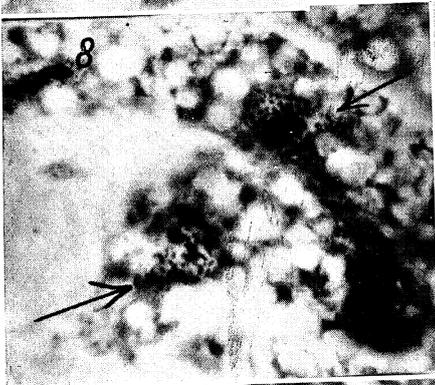
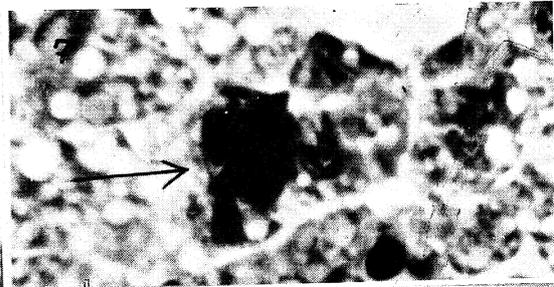
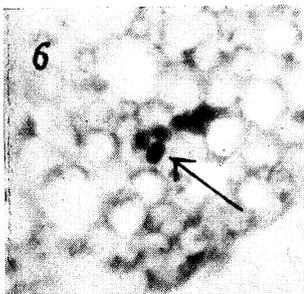
Fig. 50.—Fotografía tomada de una de las placas donde hemos hecho la prueba de asimilación de azúcares. L = Lactosa, M = Maltosa, S = Sacarosa, Gl = Glucosa, G = Galactosa.

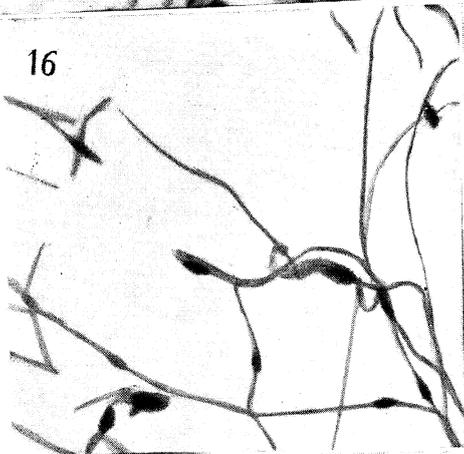
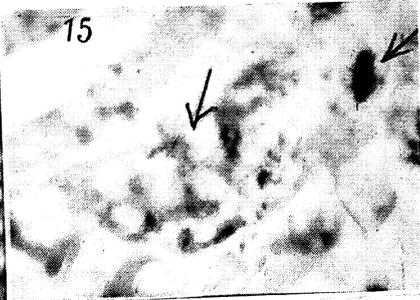
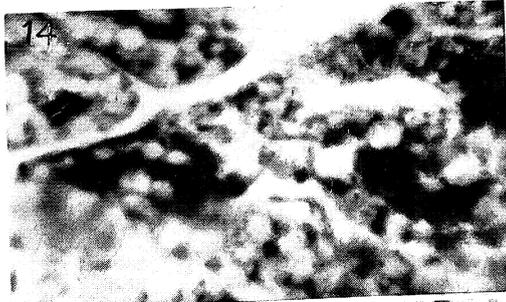
Fig. 51.—Fotografía de una de las placas donde hemos hecho la prueba de la asimilación de nitratos.

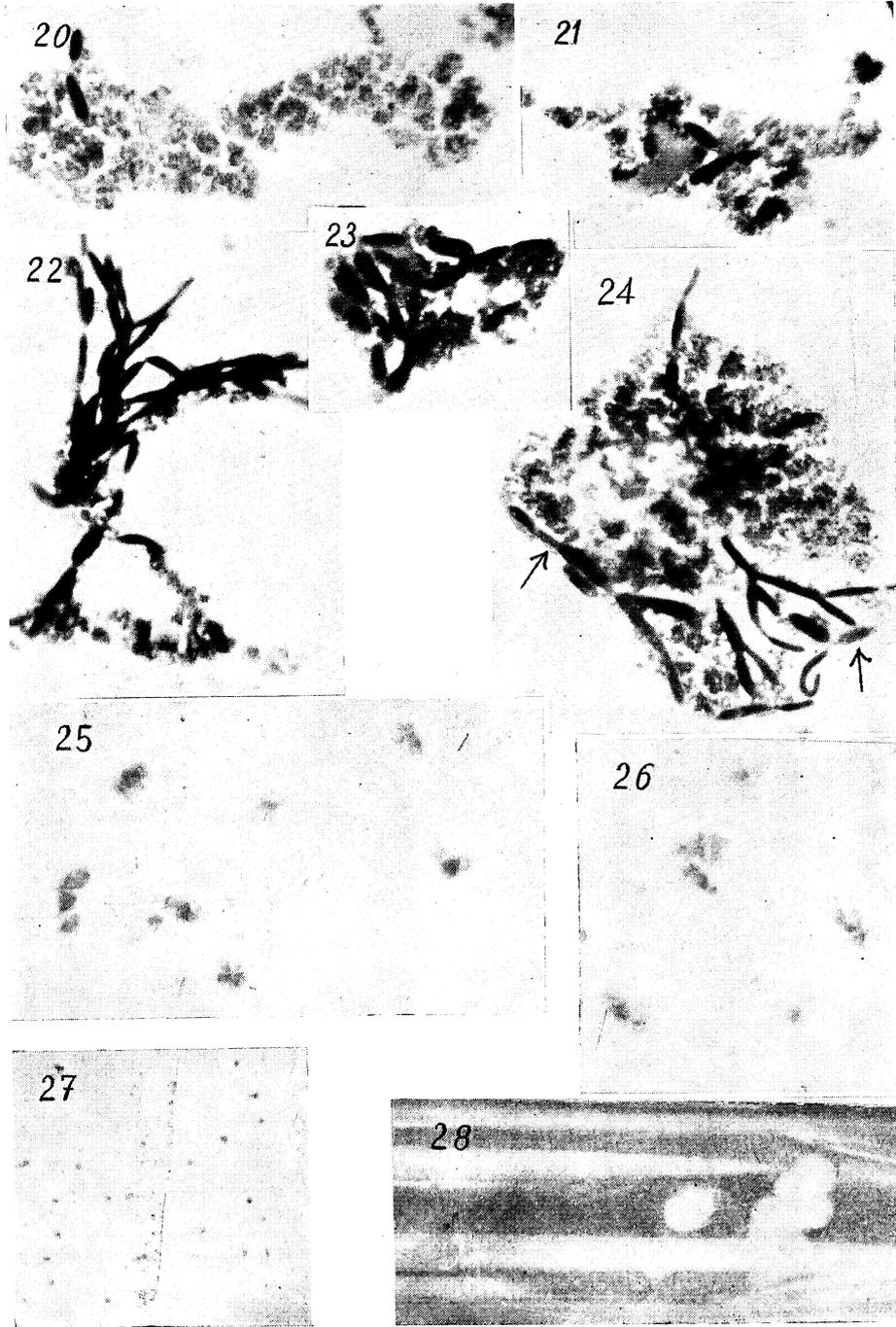
Fig. 52.—Hongo levaduriforme aislado de *B. germánica* a la semana de incubación en el medio de Czapek con colina. Se observa, además de las células ovaladas, unos filamentos largos cargados de gotas de grasa. Microfotografía hecha en el microscopio de fase de una extensión en fresco.  $\times 1.750$ .

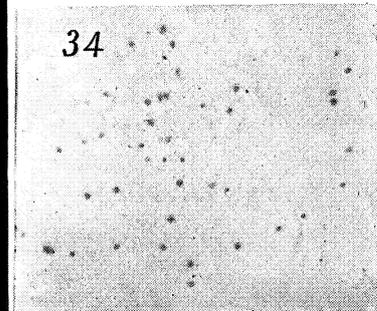
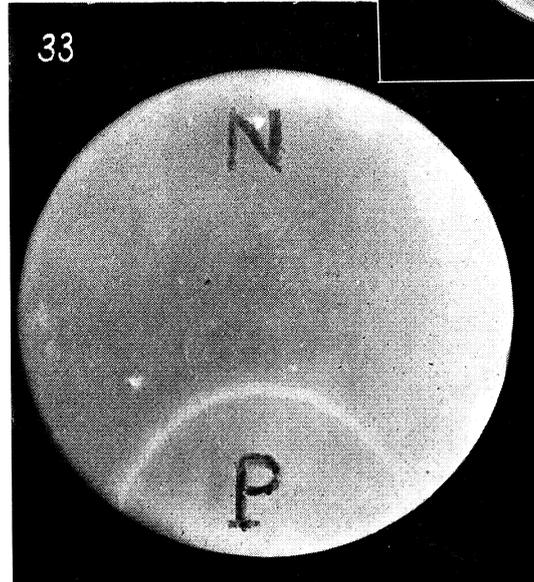
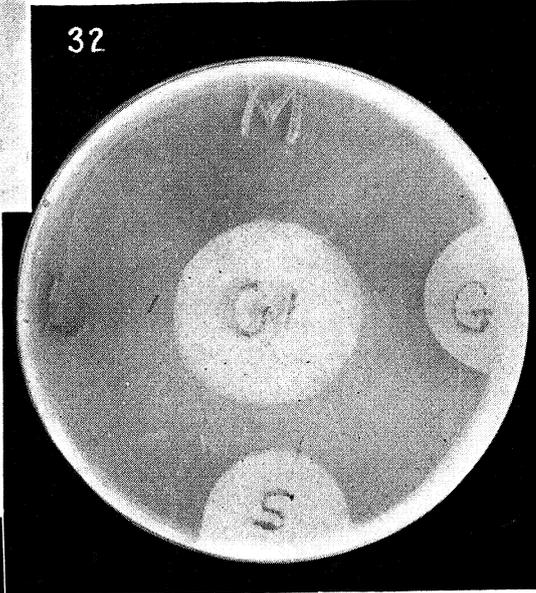
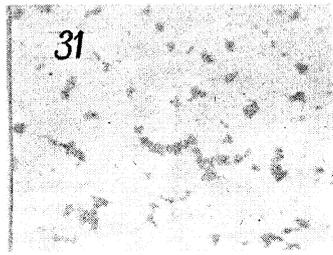
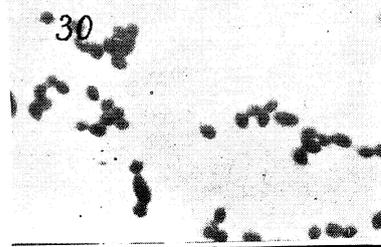
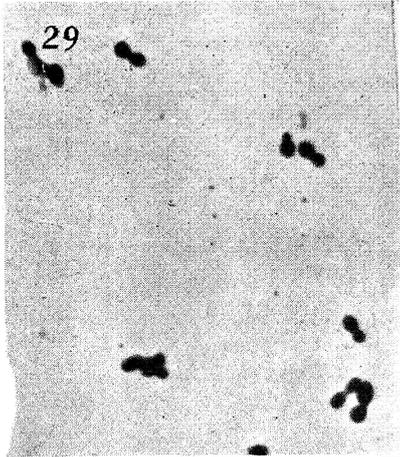
Fig. 53.—Reproducción de una de las fotografías que Mahdihassan adjunta a su trabajo. Aquí podemos observar el desarrollo microbiano en el mismo borde de la placa. En el ángulo inferior izquierdo asoma una colonia de moho.

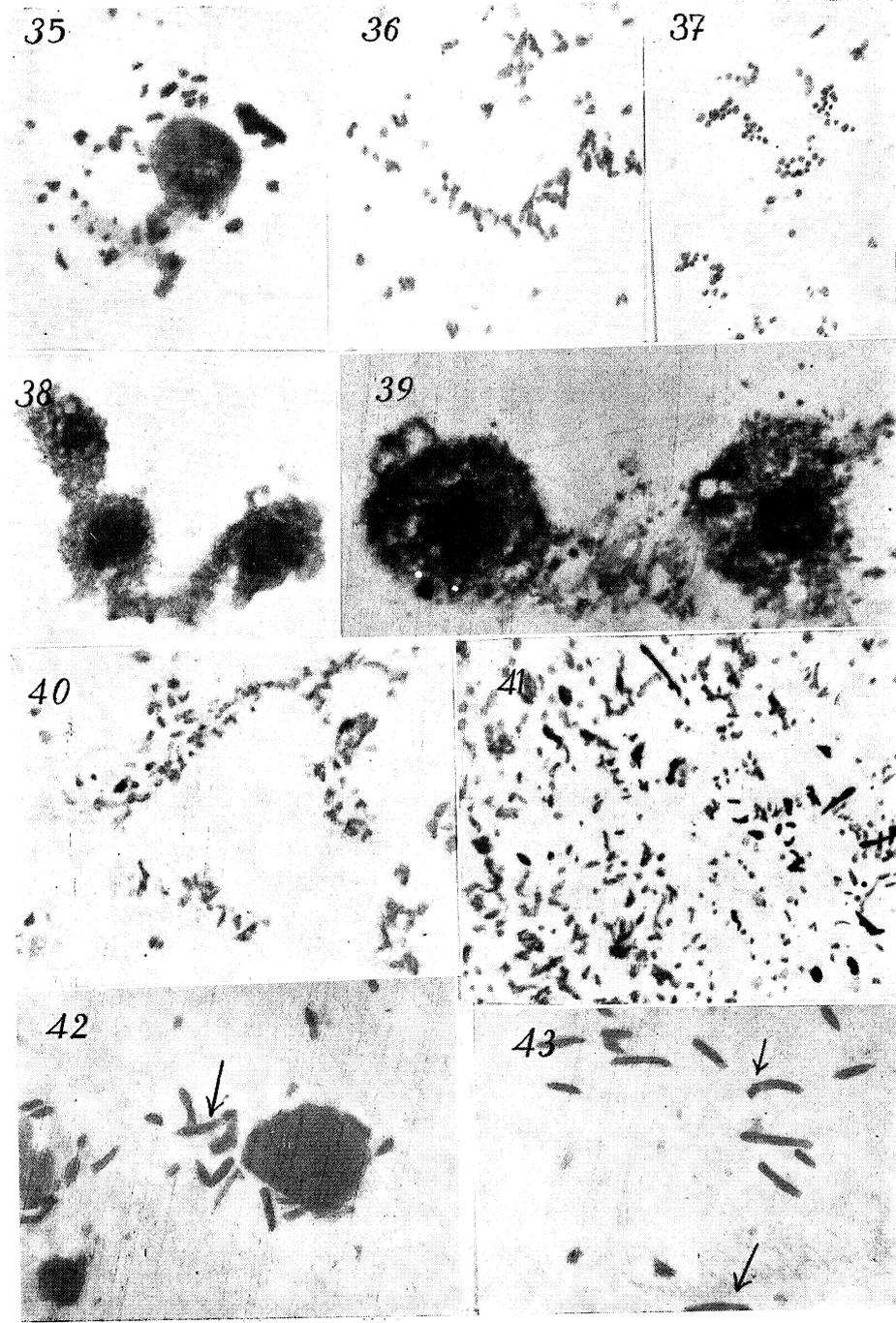


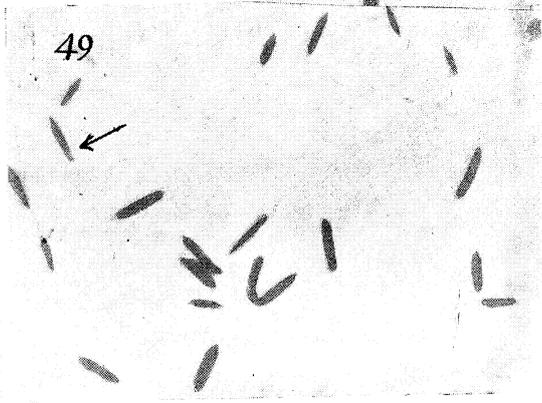
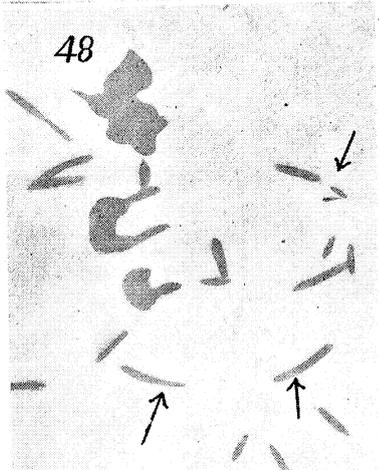
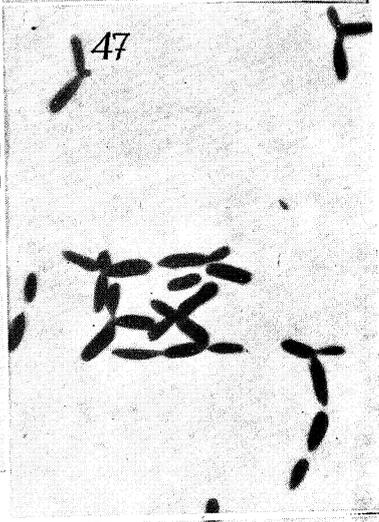
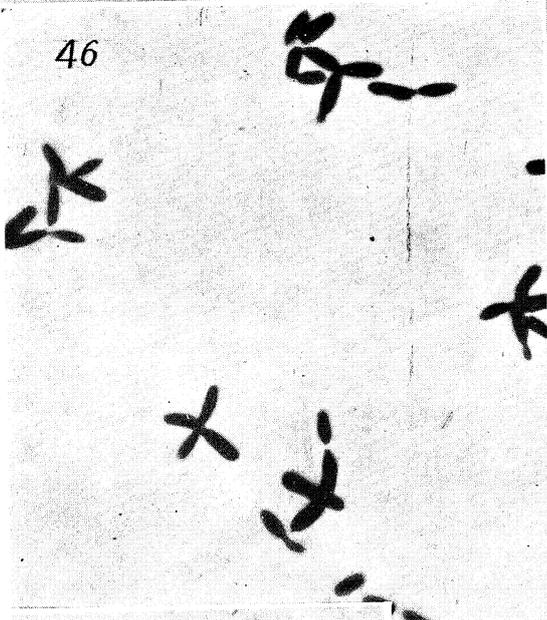
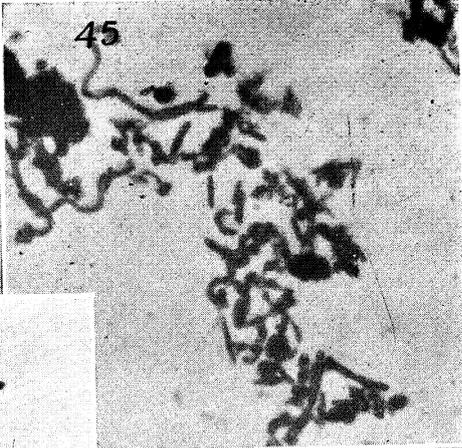
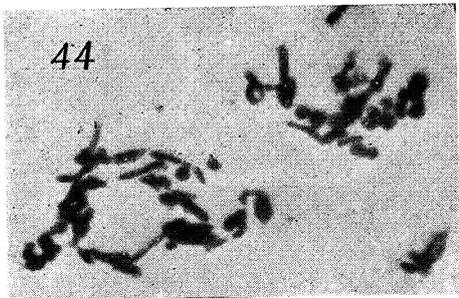


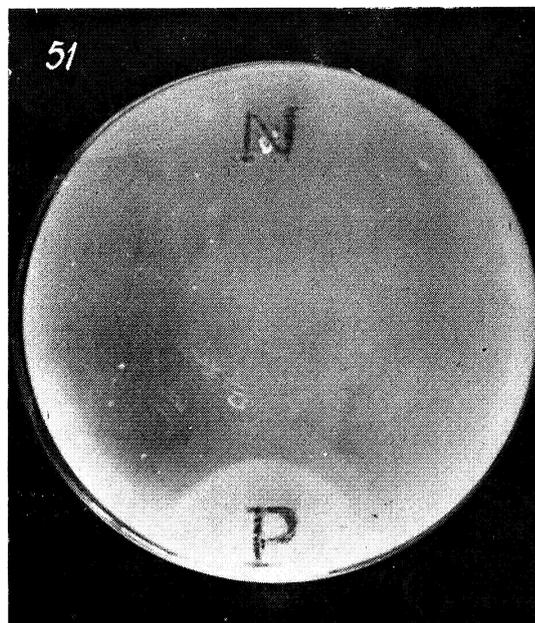
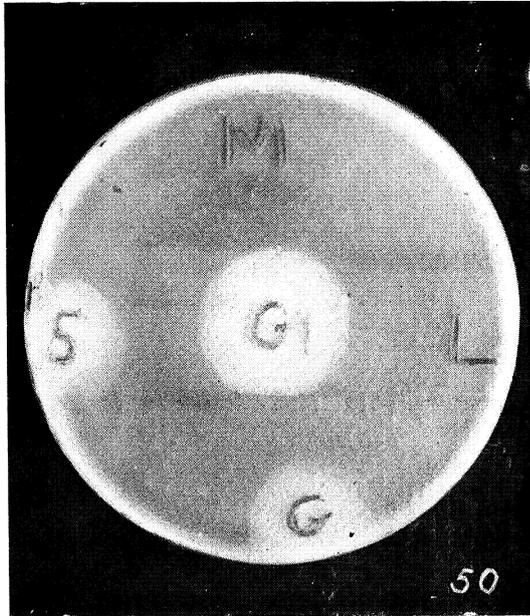


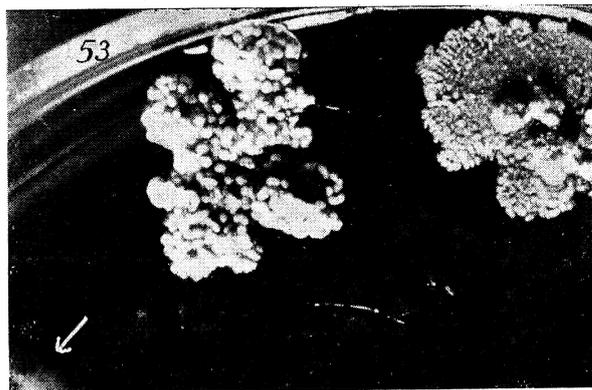
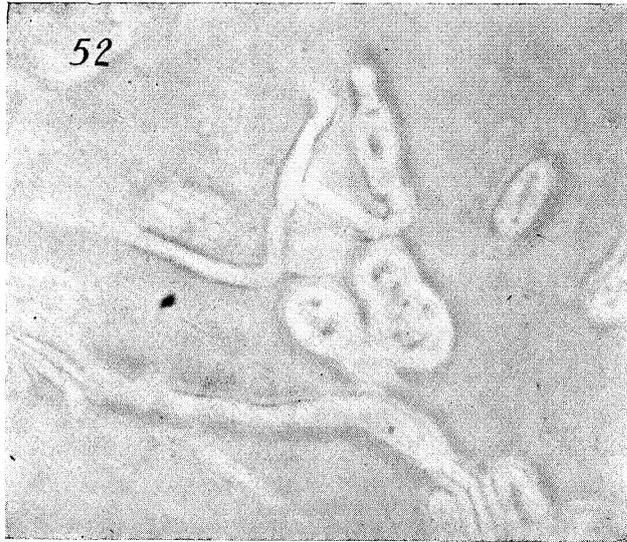












# INFORMACION

## ACTAS DE LA SOCIEDAD

MADRID

### Acta de la sesión celebrada el día 26 de abril de 1954.

Bajo la presidencia de don Antonio Ruiz Falcó y actuando como Secretario don Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las 19,50 horas en el salón de actos de los Institutos «Alonso Barba» y «Alonso de Santa Cruz», del C. S. I. C., Serrano, 119.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. Son admitidos como socios de número Don Antonio Portolés Alonso, Farmacéutico, y don Emilio Ronda Laín, Veterinario, ambos de Madrid, presentados por don Arnaldo Socías y don Jaime del Campo; y don Santiago Font Cunillera, Farmacéutico, de Alcalá de Henares (Madrid), presentado por don Lorenzo Vilas y don Gregorio Fraile.

El señor Presidente indica que va a celebrarse el escrutinio de los votos secretos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta, renovación que comprende los cargos de Tesorero, Bibliotecario y cuatro Vocales. Son designados la señorita Tejerina y el señor Ortegui para ayudar al acto del escrutinio. Efectuado éste se obtienen los siguientes resultados: Número de votantes, 74; votos anulados por falta del remitente en el sobre externo, 4. Tesorero, don Miguel Benlloch Martínez, 68 votos; don Florencio Pérez Gallardo, un voto; don Juan Santa María Ledochowski, un voto. Bibliotecario, don Ricardo Salaya León, 69 votos; don Justiniano Pérez Pardo, un voto. Vocales: Don Eduardo Gallardo Martínez, 69 votos; don José García Bengoa, 67 votos; don Juan Manuel

Martínez-Arroyo Núñez, 61 votos; don Arnaldo Socías Amorós, 65 votos; don Gregorio Baquero Gil, un voto; don Pablo Cartañá Castellá, un voto; don Isidoro García Rodríguez, un voto; don José María de la Lastra Soubrier, un voto; don Florencio Moreno de Vega, dos votos; don Julián Peña Yáñez, un voto; don Florencio Pérez Gallardo, un voto; don Miguel Rubio Huertos, siete votos; don Antonio Valls Conforto, un voto; don Lorenzo Vilas López, un voto; don José María Xandri Tagüña, un voto.

A la vista de los resultados anteriores quedan elegidos los señores siguientes: Tesorero, don Miguel Benlloch Martínez; Bibliotecario, don Ricardo Salaya León; Vocales: don Eduardo Gallardo Martínez, don José García Bengoa, don Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez y don Arnaldo Socías Amorós.

En consecuencia queda constituida la Junta Directiva de la siguiente forma: Presidente, don Antonio Ruiz Falcó; Vicepresidente, don Gerardo Clavero del Campo; Secretario, don Lorenzo Vilas López; Tesorero, don Miguel Benlloch Martínez; Bibliotecario, don Ricardo Salaya León; Vocales: don Genaro Alas Cores, don Gabriel Colomo de la Villa, don Eduardo Gallardo Martínez, don José García Bengoa, don Emilio Luengo Arroyo, don Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez, don Florencio Moreno de Vega Soler y don Arnaldo Socías Amorós.

El señor Presidente tiene frases elogiosas para los señores reelegidos y para el nuevo Vocal, señor Martínez-Arroyo, quien sustituye a don Rafael Ibáñez González, que cesó en su cargo por haber trasladado su residencia a Granada.

A continuación, don Angel Martínez da lectura a un trabajo propio en colaboración con el señor Cordón, titulado: «Consideración crítica y revisión experimental de los conceptos y métodos de Parfentier sobre la concentración enzimática de antitoxinas».

Y no habiendo más asuntos que tratar se levanta la sesión a las 20,50 horas.