VOLUMEN 8 JULIO-SEPTIEMBRE 1955 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 FISIOLOGIA 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, distribuídas 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.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

L'utilizzazione delle varie fonti di carbonio da parte del «Penicillium Chrysogenum», por **Filippo Dentice di Accadia** 231

Estudios sobre nódulo-bacterias. II, por **Gregorio Fraile Ramos.** 249

El aspecto estructural, bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto. I, por **Federico Beato y González** 327

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

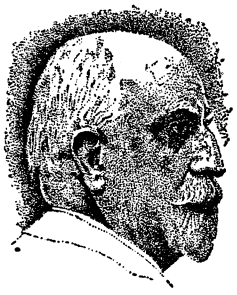
TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

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

VOLUMEN 8 JULIO-SEPTIEMBRE 1955 NUM. 3

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

CONSEJO DE REDACCION

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

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

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

CENTRO INTERNAZIONALE DI CHIMICA MICROBIOLOGICA
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA. ROMA

L'UTILIZZAZIONE DELLE VARIE FONTI DI CARBONIO DA PARTE DEL «PENICILLIUM CHRYSOGENUM» (*)

por
Filippo Dentice di Accadia.

Relativamente pochi lavori sono stati pubblicati sulla nutrizione del carbonio di Pen. chrysogenum e sul suo effetto sulla produzione di penicillina. Jarvis e Johnson nel 1947 investigarono in dettaglio sulla relazione asistente tra utilizzazione degli zuccheri e formazione di penicillina. Essi trovarono che l'ottimo di produzione si ottiene se glucosio e lattosio sono presenti in rapporti tali che si formi una buona quantità di micelio servendosi del glucosio prontamente utilizzabile, prima che la muffa sia constretta ad utilizzare il lattosio lentamente fermentato. Nel 1950 Cook e Brown studiarono l'effetto di vari carboidrati e sali sulle rese di penicillina e ne considerarono le possibili influenze sul meccanismo di formazione della penicillina.

In questa conversazione illustrerò i lavori compiuti da Johnson (1) in questi ultimi anni sull'effetto della nutrizione sugli idrati di carbonio nella produzione di penicillina, e i lavori di Rolinson e Lumb su l'utilizzazione dell'olio di lardo da parte del Pen. chrysogenum e parlerò inoltre su nostre esperienze, attualmente in corso di pubblicazione, sull'utilizzazione dei grassi e gli olii quali fonti di carbonio da parte di Pen. chrysogenum.

Si è considerato per qualche tempo che il massimo di produzione di penicillina si ottiene incondizioni di fermentazione che consentono uno sviluppo molto lento. Sebbene si richiedano per la formazione di penicillina condizioni che consentono uno sviluppo miceliale molto lento, la fase di crescita nella fermentazione dovrebbe essere caratterizzata dal

(*) Conferencia pronunciada en el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, del C. S. I. C., Madrid, 7 de marzo de 1955.

rapido sviluppo di un'alta concentrazione del micelio. Pertanto un terreno ideale dovrebbe consentire due distinti gradi di sviluppo: uno rapido durante la fase di crescita, ed uno molto più lento durante il resto della fermentazione. Il pH ha grande importanza nella fermentazione ed i valori ottimi vanno da 4 a 6,5 nella fase di crescita e da 7 a 7,5 nella fase di produzione di penicillina.

Un terreno sintetico capace di produrre queste condizioni ideali si ottiene regolando opportunamente i suoi costituenti. In determinate condizioni il fatto maggiore che influenza il grado di fermentazione è la natura dell'idrato di carbonio usato nel terreno. Il glucosio è fermentato rapidamente ed il lattosio molto più lentamente. Saccarosio e galattosio sono utilizzati con la stessa rapidità del glucosio. Poichè il grado di produzione del micelio varia direttamente col grado di utilizzazione dello zucchero durante la fase di crescita, una miscela di glucosio e lattosio nel terreno produrrà opportune condizioni per la fermentazione. E' noto che il lattosio è considerato il miglior idrato di carbonio per la produzione di penicillina. Questa superiorità è stata attribuita al fatto che viene utilizzato lentamente. Si pensò allora che une fermentazione durante la quale si fosse aggiunto poco alla volta uno zucchero rapidamente utilizzabile, in modo da uguagliare la lenta utilizzazione del lattosio, avrebbe potuto dare delle buone rese di penicillina. Usando il ceppo Q176 Johnson cominciò a sperimentare con un metodo di rifornimento intermittente di glucosio ogni 12 ore, a partire dalla 24/\ ora di fermentazione, quando la crescita del micelio era quasi completa. Con questo sistema si alternavano un periodo in cui lo zucchero era presente in eccesso ad un periodo in cui esso mancava quasi del tutto. Si intraprese allora una speciale fermentazione nella quale il grado di rifornimento veniva diminuito progressivamente; si ebbe cosi una fase di produzione di penicillina più lunga con un aumento delle rese. Nel caso del glucosio l'ottimo per l'aggiunta risultò essere il 0,4% ogni 12 ore. Si notò inoltre che ad un certo momento della fermentazione l'aggiunta di quantità piuttosto grandi di zucchero dava luogo ad una rapida caduta del pH, ad una forte crescita seguita da sporulazione data la mancanza delle altre sostanze nutritive all'infuori dello zucchero, mentre l'aggiunta di quantità troppo piccole portava ad eventuale autolisi data la mancanza di zucchero ad un certo punto. Il successo ottenuto con il rifornimento intermittente, fece pensare che con un rifornimento continuo si sarebbero

potute migliorare le condizioni della fermentazione. Con rifornimento continuo di glucosio o saccarosio, in fermentazioni in beute agitate fu possibile ottenere rese di penicillina talvolta addirittura pari al doppio di quelle ottenute dai controlli contenenti il 3% di lattosio. Con questo sistema continuo la quantità ottimale di glucosio per ora risultò essere del 0,03%. Nel caso del saccarosio l'ottimo risultò pari al 0,036% all'ora. Come ci si aspettava non si ebbe autolisi del micelio fin quando si aggiunse lo zucchero ed il pH tese a scendere mano mano che la fermentazione invecchiava. In nessun momento, durante la fermentazione si potè trovare praticamente zucchero nel mezzo, quando si usò glucosio; quando invece si utilizzò saccarosio si trovò fino al 0,7% dopo 48 ore nei caso che le aggiunte fossero alte, cioè oltre al 0,05% all'ora.

Questi risultati ottenuti in beuta spinsero l'autore a vedere cosa accadeva in fermentatori da 30 litri aereati ed agitati. Si trovò che con una concentrazione del 0,5% di glucosio presente all'inizio nel terreno, lo sviluppo dell'inoculo era rapido e virtualmente completo in 24 ore. La muffa sembrava essere indifferente ad un altro zucchero durante questa prima fase. Il rifornimento continuo fu iniziato tra la 20^ ora e la 24^ dopo l'noculo e continuò per 72 ore; oltre questo periodo l'aggiunta continua sembrò non dare alcun vantaggio, anzi in molte esperienze si ebbe un calo nel titolo di penicillina a 100 ore circa anche quando il rifornimento di zucchero non fu limitato.

Le esperienze di Rolinson e Lumb (2) (3) riguardarono oltre l'utilizzazione degli idrati di carbonio, anche quella degli acidi grassi sempre da parte di Pen. chrysogenum.

Le esperienze furono condotte in fermentatori piccoli muniti di agitatore contenenti 3 litri di terreno e in beute da 250 cc. con 75 cc. di terreno, su shaker rotatorio. Temperatura 24°-26°. Il terreno era costituito da corn steep liquor, lattosio, glucosio e sali minerali, $NaNO_3$, KH_2PO_4 e Na_2SO_4; pH 5,8. Acido fenilacetico aggiunto nei fermentatori in ragione del 0,05% ogni 12 ore, a cominciare dalla 24^ ora; in beuta in ragione del 0,25% all'inizio. Si usò come antischiuma olio di lardo contenente il 2,5% di alcool cetilico. Inoculo con sospensione di spore preparate da culture madri liofilizzate di Pen. chrysogenum ceppo Wis 48-701.

I risultati furono i seguenti: 1) in fermentazioni in beuta, dove l'aereazione è bassa, si ebbe una rapida e completa utilizzazione sia del glucosio sia del lattosio, e alla fine della fermentazione il residuo di

carboidrati era generalmente trascurabile. 2) Nei fermentatori ad alta aereazione, il glucosio era usato rapidamente e completamente, ma il lattosio era utilizzato rapidamente durante le prime 30 ore ca., dopo di che l'utilizzazione diveniva molto lenta e alla fine della fermentazione ne restava nel mezzo ancora il 60% circa.

Essendo ciò dovuto alla grande differenza di aereazione, si provò variando in vasti limiti l'aereazione dei piccoli fermentatori, agendo sull'agitazione e l'immissione di aria e si vide che l'aumento di aereazione corrispondeva ad un minor grado di utilizzazione del lattosio, ottenendosi una più lenta utilizzazione con il grado di aereazione più alto. Però anche se si diminuiva l'aereazione al di sotto di un certo limite si diminuiva il grado di utilizzazione del lattosio e ciò si vide aumentando il volume di liquido nelle beute. La scarsa utilizzazione del lattosio non influiva sullo sviluppo miceliale ad alta aereazione, e pertanto si pensò che qualche altra sostanza doveva essere utilizzata; le sole sostanze possibili erano le proteine e gli ammino-acidi del corn steep e l'olio di lardo che fu aggiunto frequentemente in quantità totale dell'1%.

Le sostanze organiche azotate del terreno non dimostrarono di essere influenzate dal grado di aereazione.

L'olio di lardo invece si comportò in maniera diversa; infatti estratto dal brodo alla fine della fermentazione, sbattendo 500 cc. di brodo con 100 cc di cloroformio per due volte (unendo questo estratto con cloroformio che aveva lavato l'interno del fermentatore), evaporato e pesato, dette il 5% dell'olio di lardo totale immesso nel corso della fermentazione. Esperienze manometriche con micelio lavato mostrarono che l'olio di lardo poteva essere rapidamente ossidato e che il grado di respirazione con esso era più alto che con il glucosio o col mezzo di cultura completo; ciò con micelio proveniente dai fermentatori. Con micelio di 70 ore proveniente da beute si vide invece che sebbene il glucosio fosse ossidato rapidamente, l'olio di lardo non dette alcun aumento significativo nella respirazione; ciò vuol dire che seppure metabolizzato in beuta l'olio di lardo è ossidato in un grado molto più basso rispetto alle fermentazioni ad alta aereazione.

Questa differenza nell'ossidazione dell'olio di lardo, da parte dei due diversi miceli, sembra indicare una differenza nel contenuto enzimatico. Gli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'olio di lardo sono sintetizzati

durante la fermentazione partendo de spore e questa sintesi è favorita de un'alta aereazione.

In fermentazioni partite con inoculo vegetativo anzichè con spore e usando olio di lardo, il lattosio fu utilizzato molto bene anche con alta aereazione, il che indica che il lattosio è utilizzato di preferenza in questo caso, ferma restando anche la utilizzazione dell'olio di lardo, cosa che invece è preferita da inoculo con spore. Nel caso dell'inoculo con spore, dove l'olio di lardo è metabolizzato di preferenza sul lattosio, non è chiaro se alte concentrazioni di ossigeno diffuso inibiscano direttamente l'utilizzazione del lattosio, o se il metabolismo dell'olio di lardo involve qualche meccanismo che è coinvolto anche nell'utilizzazione del lattosio cosicchè l'olio di lardo può diminuire l'utilizzazione del lattosio per competizione di questo meccanismo comune. Sembra dai risultati ottenuti che l'aumento della concentrazione dell'ossigeno diffuso inibisca direttamente l'utilizzazione del lattosio, poichè un limitato aumento nel grado di aereazione ha dato luogo ad una caduta del peso miceliale corrispondente ad una caduta del lattosio utilizzato.

Ulteriori esperienze sempre degli stessi autori, dimostrarono che, nelle condizioni prevalenti durante i primi stadi di certe fermentazioni di penicillina ad alta aereazione, l'olio di lardo e l'acido oleico sono ossidati soltanto lentamente, o per niente, da sospensioni di micelio lavato di Pen. chrysogenum; ma sia l'olio di lardo sia l'acido oleico sono ambedue ossidati rapidamente a 48 ore, e oltre.

Sembra che il micelio derivante da fermentazioni in beuta (condizioni di aereazione relativamente bassa) ossidi l'olio di lardo lentamente anche durante gli ultimi stadi della fermentazione, sebbene l'acido oleico, che è il principale prodotto d'idrolisi dell'olio di lardo, sia invece ossidato rapidamente.

La mancanza di qualunque aumento nell'assorbimento dell'ossigeno da parte del micelio giovane, quando si aggiunse olio di lardo come substrato può anche non indicare la completa assenza di ossidazione di questo substrato. La respirazione endogena in queste esperienze risultò relativamente alta, il che è tipico dei funghi. Un substrato aggiunto da una sospensione di micelio lavato può essere ben ossidato, ma a spese di sostanze che altrimenti contribuiscono alla respirazione endogena, e quindi non provocare alcun aumento nel grado totale di respirazione. L'assenza apparente dell'ossidazione dell'olio di lardo da micelio giovane può

indicare soltanto un grado di ossidazione relativamente più basso di quello che si ha con micelio più vecchio.

Il cambiamento nella capacità di ossidare l'olio di lardo e l'acido oleico può essere dovuto alla sintesi degli enzimi necessari durante la crescita. Variazioni nell'attività enzimatica dipendenti dalla crescita sono state riportate per alcuni enzimi batterici (Gale, 1943) i quali mostrano poca o nessuna attività in cellule giovani ma si formano durante la crescita e raggiungono il massimo al momento che ha termine la divisione cellulare. Negli esperimenti effettuati con Pen. chrysogenum il momento in cui aumentò la capacità di ossidare l'olio di lardo corrispose con il periodo di massima crescita. Pertanto, una tale variazione nell'attività enzimatica può non essere dovuta a variazionè nel contenuto enzimatico, ma a cambiamento nelle condizioni per l'azione enzimatica, come i cambiamenti del pH del terreno o della permeabilità delle cellule durante la fermentazione. Variazioni nella permeabilità del micelio rispetto all'olio di lardo o all'acido oleico possono anche ritenersi responsabili per le variazioni nell'attività enzimatica in conseguenza dell'età. Può essere anche possibile che non tutto il grasso penetri nella cellula ma sia idrolizzato al difuori della membrana cellulare. Inoltre se le variazioni dell'attività enzimatica in funzione dell'età fossero dovute a cambiamenti nella permeabilità, sarebbe anche necessario postulare una diminuzione della permeabilitá dopo 48 ore, quando l'attività enzimatica comincia a declinare. L'incapacità del micelio giovane di ossidare l'olio di lardo non è dovuta soltanto alla incapacità di ossidare i costituenti acidi grassi in questo stadio. Il grasso apparentemente non è idrolizzato, perchè la glicerina che si libererebbe per idrolisi, sarebbe prontamente ossidata dal micelio giovane a pH 5.3.

Recentemente Perlman e Langlykke (4) hanno preso un brevetto in cui descrivono un terreno per la produzione di penicillina nel quale olii vegetali sostituiscono i carboidrati (lattosio o glucosio) completamente o in parte quali fonti di carbonio e di energia. Questo terreno è constituito da corn steep liquor, olio di semi di cotone, poco glucosio (0,5 %), carbonato di calcio e precursore sotto forma di N(2-idrossietil) fenilacetammide.

Secondo i suddetti autori, fermentazioni condotte su questo terreno dettero produzioni di penicillina G nel terreno di cultura, maggiori delle produzioni ottenute nel controllo fermentato nelle stesse condizioni e nel quale al posto dell'olio di seme di cotone era stato messo lattosio.

In conseguenza pertanto delle esperienze di Rolinson e Lumb e del

brevetto di Perlman e Langlykke le nostre esperienze si svolsero nella seguente maniera.

Ceppi. I ceppi usati sono stati il 49133 Wis, proveniente dalla collezione di Bákus, e il 5120 C, che è un ceppo selezionato nel nostro laboratorio di micologia da una cultura di 5120 Wis proveniente anch'esso dalla collezione di Bakus.

Terreni di cultura. Il terreno di cultura usato è stato lo stesso per le beute e per ir fermentatori.

Terreno di semina. Il terreno di semina è constituito da corn steep liquor, glucosio, carbonato di calcio; nei fermentatori da 5 litri si è aggiunto all'inizio antischiuma consistente in olio di paraffina contenente il 6 % di alkaterge C.

Terreno di fermentazione A. Il terreno di fermentazione A è costituito da corn steep liquor, olio o grasso e carbonato di calcio; non contiene antischiuma; come precursore si è adoperato il fenilacetato di sodio somministrato in ragione del 0,1 % di acido fenilacetico ogni 24 ore a partire dalla 24ª ora nel caso delle beute e dei fermentatori da 10 litri, e in ragione del 0.05 % di acido fenilacetico ogni 6 ore a partire dalla 12ª ora nel caso dei fermentatori da 3.000 e 12.000 litri.

Terreno di fermentazione B. Il terreno di fermentazione B che rappresenta il controllo contiene lattosio in sostituzione dell'olio nelle stesse proporzioni e nelle fermentazioni in impianto pilota e semi-industriale ha richiesto l'aggiunta di antischiuma costituito da olio di paraffina con il 6 % di alkaterge C, somministrato a partire dall'ora 0, ogni 8 ore.

Tecnica di fermentazione. Tutte le fermentazioni sono state eseguite a 25° C. Le fermentazioni in laboratorio sono state condotte in beute del tipo Erlenmeyer da 500 c. c. riempite con 60 c. c. di terreno di cultura per avvicinarsi il più possibile alle condizioni ottimali di aereazione (5) agitate su agitatore rotatorio (fig. 1).

Le fermentazioni in impianto pilota sono state eseguite in fermentatori da 10 litri, in acciaio inossidabile muniti di agitatore (6) (fig. 2). Le fermentazioni su scala semi-industrialle sono state eseguite in fermentatori da 3.000 e 12.000 litri, rivestiti di acciaio inossidabile e provvisti di agitatore.

La semina è stata effettuata con una sospensione di spore sia per le beute sia per i fermentatori in concentrazione di ca. 1.000.000 spore per c. c. di terreno di semina.

Metodi di dosaggio. La penicillina nel brodo filtrato è stata dosata per

via iodometrica con il metodo di Beloff-Chain e Dentice di Accadia (7) e per via biologica con il metodo dei cilindri su agar-germi di B. subtilis.

Il pH è stato determinato con un pH-metro SIS.

Il peso secco è stato eseguito filtrando dopo acidificazione con acido cloridrico concentrato per sciogliere il carbonato di calcio, e ponendo il pannello di micelio formatosi in stufa a 120° C. per una notte.

Il dosaggio degli olii e grassi è stato eseguito con il seguente procedimento: 60 c. c. (tutto il contenuto di una beuta) o 50 c. c. (nel caso dei fermentatori) di brodocultura contenuti in una beuta da 500 c. c. vengono acidificati con 4 c. c. di acido cloridrico concentrato allo scopo di sciogliere il carbonato di calcio; si aggiugono poi 30-35 c. c. di etere di petrolio e si sbatte su agitatore rotatorio per 15'. Si filtra su Buchner ed il micelio viene lavato con etere di petrolio e poi con acqua e utilizzato per la determinazione del peso secco. Il filtrato ed i lavaggi vengono posti in imbuto separatore e la fase acquosa viene separata dal solvente. La fase acquosa si addiziona con 25 c. c. di etere di petrolio e si tratta di nuovo in beute sull'agitatore rotatorio per 10'. Si separano i due strati in imbuto separatore e l'estratto etereo si riunisce con quello derivante dalla prima estrazione. Si disidrata con solfato di sodio anidro e si distilla sotto vuoto in palloncino tarato. Si pesa infine il palloncino contenente l'olio residuo.

Osservazioni microscopiche. Le osservazioni microscopiche del micelio sono state fatte raccogliendo un'ansata di brodocultura prima di qualsiasi trattamento e colorando con blu-cotton.

RISULTATI

Le sostanze esaminate in questo lavoro sono state sia di origine animale (burro, margarina, strutto, olio di fegato di merluzzo e olio di lardo) sia di origine vegetale (olio di arachide, olio di seme di soia, olio d'oliva, olio di seme di cotone, olio di vinaccioli).

Grassi ed olii animali.

Nella tabella 1. riportiamo i risultati ottenuti usando alcuni grassi solidi ed olio di fegato di merluzzo e di lardo in fermentazioni in beute agitate.

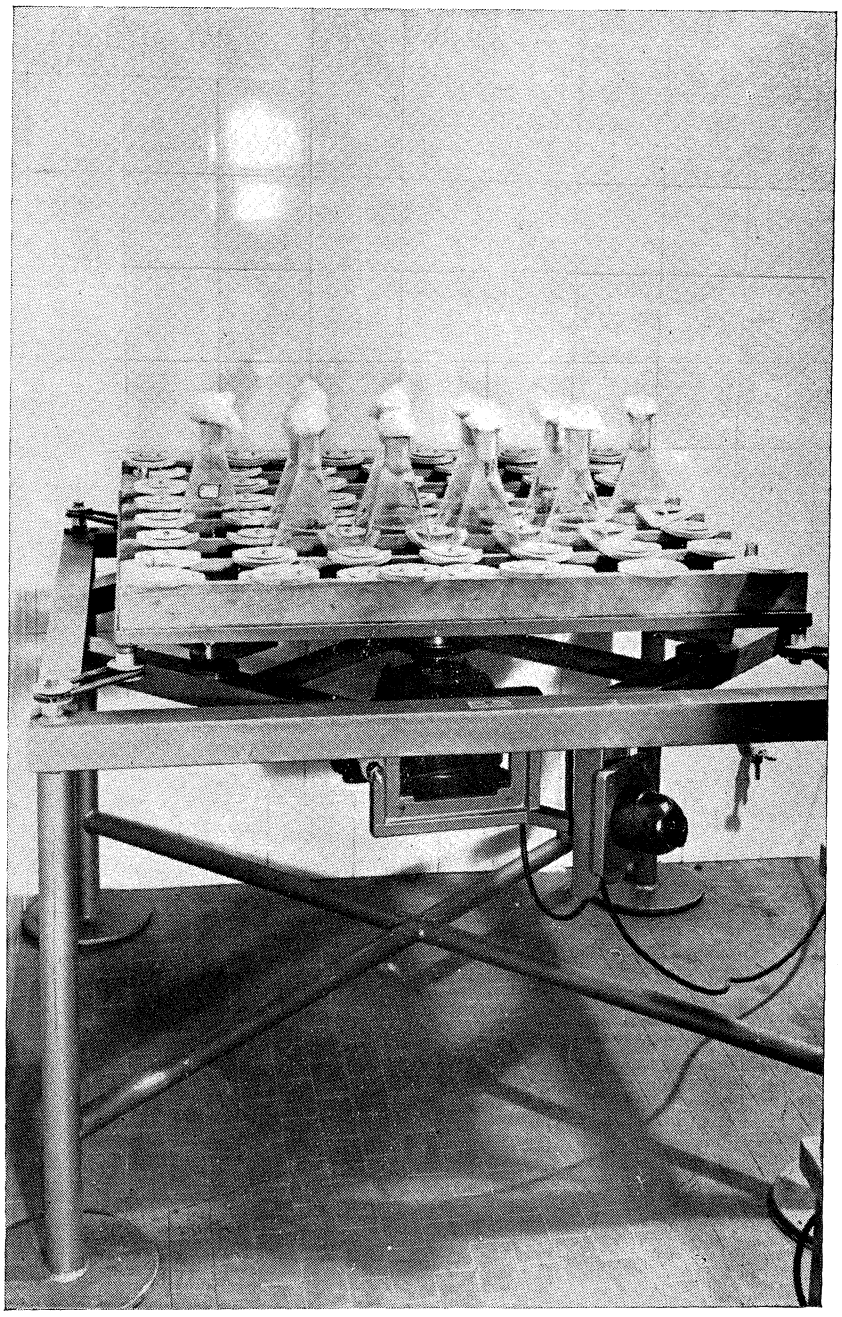


Fig. 1.—Agitatore rotatorio con beute da 500 cc.

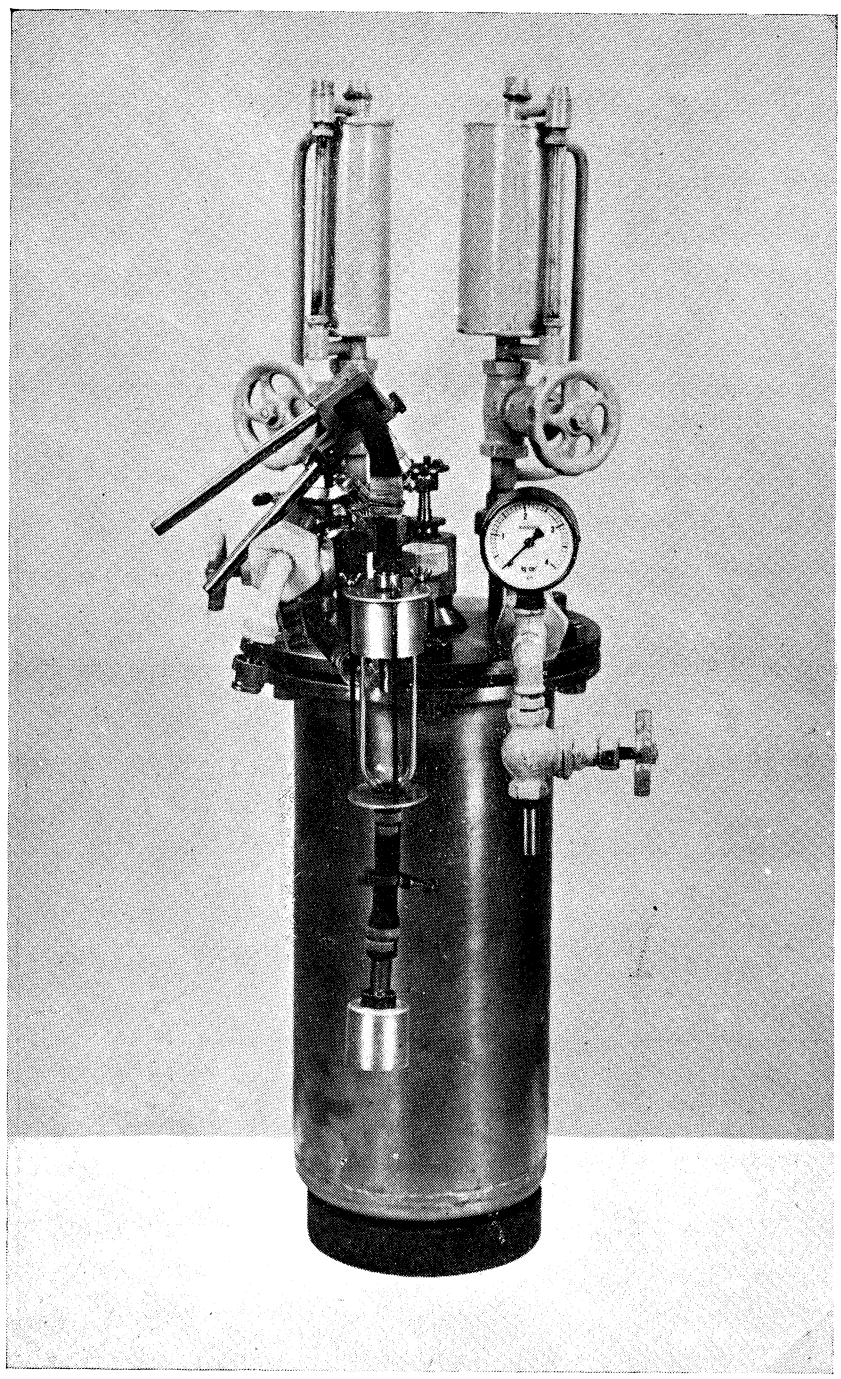


Fig. 2.—Fermentatore da 10 litri in acciaio inossidabile, munito di recipiente per le aggiunte di precursore e antischiuma, di manometro per la misura della pressione interna, e di presa campione.

TABELLA 1

Produzione di penicillina in u/cc. nel terreno di cultura usando come fonte di carbonio grassi ed olii animali, in fermentazioni in beute agitate

Grasso o olio impiegato	Ceppo 49133 età 96h Titolo chim	Ceppo 49133 età 96h Titolo biol	Ceppo 49133 età 120h Titolo chim	Ceppo 49133 età 120h Titolo biol	Ceppo 5120 C età 96h Titolo chim	Ceppo 5120 C età 96h Titolo biol	Ceppo 5120 C età 120h Titolo chim	Ceppo 5120 C età 120h Titolo biol
BURRO	460	465	0	0	580	590	0	0
MARGARINA	1090	1080	0	145	730	720	485	845
STRUTTO	820	760	580	660	600	780	1090	980
Olio di fegato di merluzzo	280	125	365	155	560	505	945	830
Olio di lardo	1470	—	—	—	1620	—	—	—
(+) Controllo	1090	655	745	665	1450	1520	1505	1355

(+) il controllo contiene al posto del grasso o dell'olio, lattosio 4%, le altre condizioni sono identiche

Dalla tabella 1. si vede come il ceppo 5120 C sia miglior produttore del 49133 con tutti i grassi impiegati. Soltanto nel caso della margarina il ceppo 49133 ha dato alla 96/\ ora una produzione di penicillina maggiore di quella ottenuta con il ceppo 5120 C. Sia con la margarina sia con il burro si è notata una completa scomparsa di penicillina a 120 h e ciò indipendentemente dal ceppo usato.

Fra i grassi e gli olii sperimentati l'olio di lardo è indubbiamente quello che consente di ottenere le più alte produzioni di penicillina superiori perfino a quelle avute impiegando il lattosio come fonte di carbonio.

Si è pertanto creduto opportuno approfondire lo studio dell'olio di lardo e tralasciare invece un ulteriore esame delle altre sostanze.

Olio di lardo.—La sperimentazione con olio di lardo è stata eseguita sia in beuta, sia in fermentatori da 10, 3.000 e 12.000 litri col ceppo 5120 C che nelle prove preliminari si era dimostrato, come si è detto, più efficiente. Nella tabella 2. diamo i dati relativi alla produzione di penicillina ottenuta con olio di lardo come fonte di carbonio e i dati provenienti da fermentazioni controllo con lattosio al posto dell'olio di lardo.

I dati relativi ai tank da 3.000 litri e da 12.000 litri si riferiscono ad una fermentazione, gli altri sono i valori tipici riscontrati in una serie di fermentazioni.

Come si vede dalla tabella 2. l'olio di lardo utilizzato come fonte di

carbonio per la produzione di penicillina dà dei buoni risultati. La produzione di penicillina è più rapida nei grandi fermentatori che non nei piccoli e nelle beute; questo è un fenomeno che si riscontra anche nel

TABELLA 2

Produzione di penicillina in u/cc. nel terreno di cultura usando come fonte di carbonio olio di lardo in fermentatori di varie grandezze

fermentatori	22h		42h		50h		60h		70h		92h		116h	
	olio	contr.	olio	contr.	olio	contr.	olio	contr.	olio	contr.	olio	contr.	olio	contr.
Beute da 500 cc.	–	–	440	320	–	–	–	–	1200	1100	1600	1300	1680	1400
Tank da 10 L.(*)	–	–	400	400	–	–	–	–	700	1000	1320	1300	1540	1900
Tank da 3000 L.	320	440	820	1500	1300	1900	–	–	–	–	–	–	–	–
Tank da 12000 L.(:)	220	340	1040	1220	1300	1340	1600	1500	–	–	–	–	–	–

(*) Controllo con antischiuma olio di vinaccioli col 6% di alkaterge
(:) » » » » di lardo col 6% di alkaterge

controllo. Mentre infatti nei fermentatori da 3.000 e 12.000 litri la produzione di penicillina raggiunge 1300 e 1600 u/cc rispettivamente a 50 e 60 ore, nei piccoli fermentatori e nelle beute bisogna attendere 92 ore per ottenere gli stessi risultati.

Data l'elevata produzione di penicillina ottenuta in queste condizioni si è ritenuto opportuno inviare alla filtrazione e quindi all'estrazione e cristallizzazione della penicillina il contenuto del tank da 12.000 litri contenente olio di lardo come fonte di carbonio.

La filtrazione fu fatta su filtro rotativo Oliver-Dorr e l'estrazione in tre fasi secondo la solita tecnica industriale in centrifughe Podbielniak. La penicillina fu cristallizzata come sale di N-etilpiperidina e successivamente come sale di potassio.

Tutta la serie delle operazioni dalla filtrazione alla preparazione del sale di potassio si è svolta come di consueto ed è interessante osservare che non si è verificata alcuna difficoltà o inconveniente, imputabili eventualmente all'olio residuo nel brodo di fermentazione. La resa brodo filtrato: sale di N-etil-piperidina fu del 75 %.

Olii vegetali.

Gli olii esaminati sono stati sia olii non essiccativi, come l'olio di arachide e l'olio di oliva, sia olii semi-siccativi come l'olio di seme di cotone e l'olio di vinaccioli. Tutti questi olii, utilizzati come fonte di carbonio, hanno dato produzione di penicillina seppure in misura diversa.

Olio di arachide.—Quest'olio è il solo tra gli olii vegetali il quale oltre che in beuta ed in fermentatore da 5 litri è stato sperimentato anche in un tank da 3.000 litri.

Nella tabella 3. vengono riportate le produzioni di penicillina ottenute utilizzando questo olio come fonte di carbonio rispetto a quelle ottenute nel controllo dove al posto dell'olio vi era lattosio usando il ceppo 5120 C.

TABELLA 3

Produzione di penicillina in u/cc. nel terreno di cultura usando come fonte di carbonio olio di arachide in fermentatori di varie grandezze.

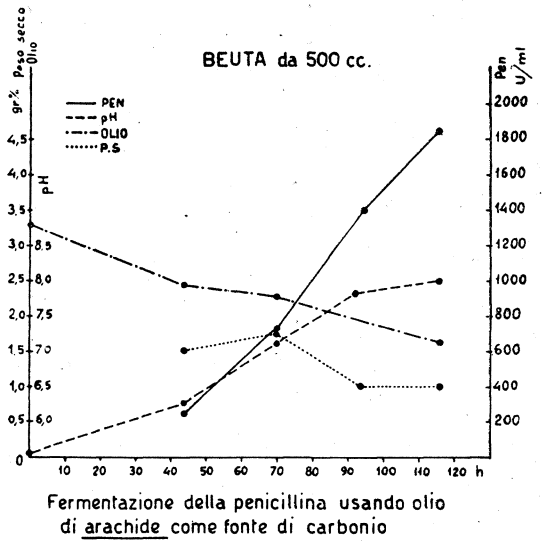
fermentatori	22^h		44^h		70^h		92^h		116^h	
	olio	contr	olio	contr	olio	contr	olio	contr	olio	contr
Beuta 500 cc	—	—	260	320	640	1100	1320	1300	1680	1400
Tank da 10 l. (°)	—	—	500	400	880	1000	1360	1300	1400	1900
Tank da 3000 l.(°)	200	440	800	1600	1500	—	—	—	—	—

(°) Controllo con antischiuma olio di vinaccioli col 6% di alkaterge

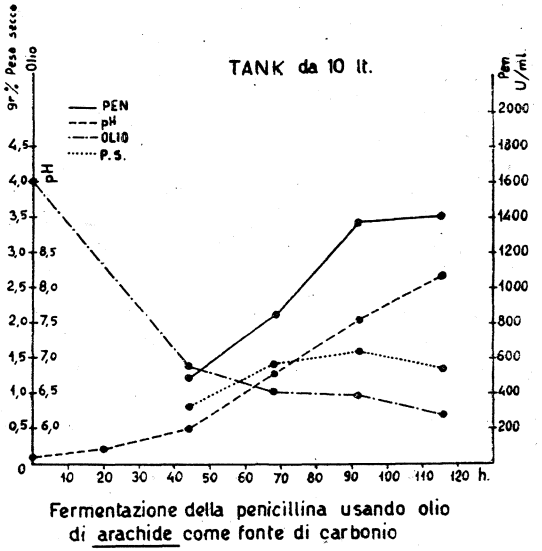
I dati relativi al tank da 3.000 litri si riferiscono ad una fermentazione. La tabella 3. conferma quanto abbiamo già visto nella tabella 2. e cioè che la fermentazione nel tank da 3.000 litri è più rapida che nelle beute e nei piccoli fermentatori. Dalla tabella 3. inoltre si nota che in fermentazione in beuta l'olio di arachide si dimostra come fonte di carbonio addirittura migliore del lattosio per la produzione di penicillina, nei fermentatori pur senza raggiungere i valori dati dal controllo, dà tuttavia ottimi risultati.

Diamo qui l'andamento delle fermentazioni in beuta e in fermentatori da 5 l. (°) con oli di arachide (Fig. 3). il pH sale fino o raggiungere il valore di 8 in fine di fermentazione sia in beuta sia in tank; l'andamento del peso secco molto simile in beuta e in fermentatore si comporta come nel caso dell'olio di lardo. L'utilizzazione dell'olio in beuta non si comporta come nei fermentatori. Mentre infatti nelle fermentazioni in beuta la curva dell'utilizzazione dell'olio ha un andamento piuttosto blando con un valore finale di olio residuo di oltre l'1,5 %, nei fermen-

(°) I grafici relativi alle fermentazioni fatte con olii vegetali come fonte di carbonio si riferiscono ad una serie di fermentazioni in beuta ad a tre fermentazioni in fermentatori da 10 litri eseguite con il ceppo 5120 C.

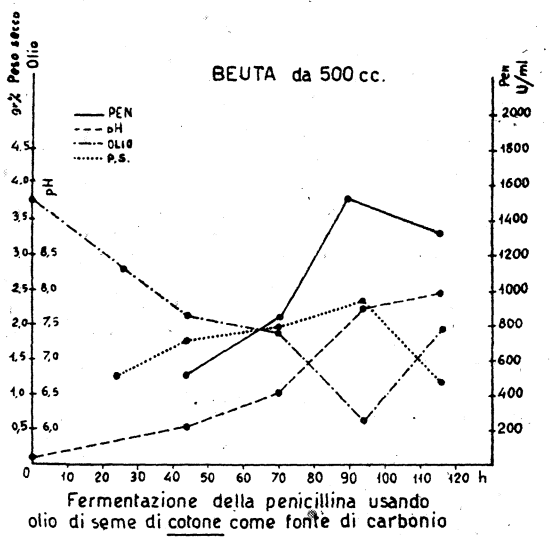


Fermentazione della penicillina usando olio di arachide come fonte di carbonio

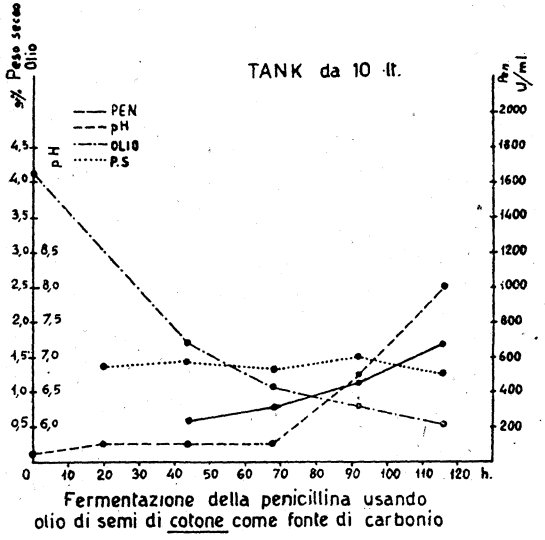


Fermentazione della penicillina usando olio di arachide come fonte di carbonio

Fig. 3.



Fermentazione della penicillina usando olio di seme di cotone come fonte di carbonio



Fermentazione della penicillina usando olio di semi di cotone come fonte di carbonio

Fig. 4.

tatori si nota una rapida utilizzazione nelle prime 44 ore di fermentazione, seguita da una lenta e graduale utilizzazione nelle successive 72 ore, fino ad un valore di olio residuo pari al 0,75 %, cioè la metà di quello riscontrato nelle fermentazioni in beuta. Anche per l'olio di arachide come per l'olio di lardo, il contenuto del tank da 3.000 litri è stato inviato alla filtrazione con successiva estrazione e cristallizzazione della penicillina. A questo proposito vale quanto già detto per l'olio di lardo.

L'olio di seme di soia e l'olio di oliva dettero dei risultati molto simili all'olio di arachide.

Olio di seme di cotone.—Si tratta di un olio tipicamente semi-siccativo. Le fermentazioni ottenute con quest'olio mostrano costantemente un andamento molto diverso se condotte in beuta o in tank agitati (Fig. 4). La produzione di penicillina nei fermentatori è la metà di quella che si ha in beuta. La curva del pH in beuta segue lo stesso andamento riscontrato per gli altri olii, soprattutto l'olio di arachide, mentre nei tank cresce molto lentamente per le prime 70 ore per poi riprendere l'andamento già riscontrato per gli altri olii. Il peso secco alto fin dall'età di 20 ore resta praticamente costante durante tutta la fermentazione in tank, mentre in beuta dopo aver raggiunto quasi il 2,5 % a 96 ore, cade a poco più dell'1 % in 20 ore, il che indica una rapida autolisi del micelio.

TABELLA 4

Valori massimi di penicillina prodotta con olii vegetali come fonte di carbonio a 120^h di fermentazione

	in beuta	in tank da 10 l.
Olio di arachide	1860	1400
Olio di semi di soia	1940	1240
Olio di oliva	1400	1340
Olio di seme di cotone	1540 (o)	660
Olio di vinaccioli	1100	—
Controllo 1	1400	1060 (+)
Controllo 2	—	1900 (x)

(o) Questo valore corrisponde a 96 ore di età della fermentazione.
(+) Antischiuma olio di paraffina col 6% di alkaterge C
(x) Antischiuma olio di vinaccioli col 6% di alkaterge C

Ciò viene confermato se si osserva la curva dell'utilizzazione dell'olio, in beuta; infatti alla caduta del peso secco corrisponde un aumento dell'olio residuo; questo aumento è forse dovuto alle sostanze grasse che derivano dalle cellule del micelio in autolisi. Nei fermentatori invece, dove il peso secco resta costante, l'utilizzazione dell'olio ha il solito andamento visto per i precedenti olii.

Diamo infine una tabella riassuntiva (tab. 4) dei valori massimi di penicillina prodotta con i diversi olii vegetali sperimentati e con i controlli.

CONCLUSIONI

Abbiamo esposto i risultati ottenuti senza cercare di dare una interpretazione del meccanismo che li ha provocati. Questo fa parte di un lavoro attualmente in corso.

Per il momento le conclusioni a cui siamo giunti possono così riassumersi:

1) Tutti i grassi e gli olii esaminati possono venire utilizzati da Pen. chrysogenum, sia pure in grado diverso, per la produzione di penicillina.

2) Tra i grassi animali l'olio di lardo è senz'altro la migliore fonte di carbonio per la produzione di penicillina.

3) Gli olii vegetali sono buone fonti di carbonio per la produzione di penicillina e generalmente migliori dei grassi animali.

4) L'andamento della fermentazione con olii come fonte di carbonio è generalmente simile a quello di una comune fermentazione con idrati di carbonio.

5) La filtrazione e l'estrazione della penicillina da terreni in cui l'olio di arachide o di lardo rappresenta la principale fonte di carbonio, non presentano difficoltà alcuna rispetto ai terreni a base di idrati di carbonio, e anche le rese in penicillina G. sono del tutto simili.

Antes de dejar esta tribuna deseo expresar públicamente los sentimientos de la mayor satisfacción y agrado del Director General del «Istituto Superiore di Sanità», de Roma, Prof. Domenico Marotta, y también del Prof. Chain, premio Nobel, Jefe del Centro Internacional de Química Microbiológica del mismo Instituto, por la invitación extendida

a dos miembros del Instituto romano de parte de ese noble Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Por mi parte, y por la de mi colega el Doctor Carilli, deseo consignar la expresión del mayor agradecimiento a los señores don José María Albareda, don Juan Casas, don Lorenzo Vilas y don Arnaldo Socías, por habernos hecho admirar las instalaciones y laboratorios científicos de este Consejo, y a los señores don Jacinto Megías y don Ricardo de Urgoiti por habernos enseñado las fábricas industriales. Al abandonar España llevaremos con nosotros una admiración muy justificada por la colaboración que ella aporta a la ciencia mundial y a la industria de los antibióticos en una rama tan útil y benéfica.

A todos, las gracias más efusivas.

BIBLIOGRAFIA

(1) **SOLTERO V.** e **JOHNSON M. J.**—1953. Applied Microbiology, 1, 52.

(2) **ROLINSON G. N.** e **LUMB M.**—1953. J. gen. Microbiol., 9, 385.

(3) **ROLINSON G. N.** e **LUMB M.**—1953. J. gen. Microbiol., 8, 265.

(4) **PERLMAN D.** e **LANGLYKKE A. F.**—1953. U. S. Patent 2, 641, 567, June 9.

(5) **CHAIN E. B.** e **GUALANDI G.**—1954. Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, english Edition, p. 5.

(6) **CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S., VAN DER SLUIS J.**—1954. Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, english Edition, p. 61.

(7) **BELOFF-CHAIN ANNE** e **DENTICE DI ACCADIA F.**—1953. Analyst, 77, 917, 423.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

ESTUDIOS SOBRE NODULO-BACTERIAS. II

por
Gregorio Fraile Ramos.

RESULTADOS

El crecimiento inicial de todas las plantas fué semejante; dentro de cada lote de leguminosas no se apreciaba diferencia entre las no inoculadas y las inoculadas, hecho conseguido por el detalle de que todas las semillas fueron plantadas en iguales condiciones de germinación.

A los quince días se procedió, después de un riego algo más intenso, a entresacar las plantas, reduciendo su número a la mitad, y dejándolas convenientemente separadas para la mejor expansión de sus raíces; en esta fecha no se apreció formación de nódulos en ninguna de las raíces de las plantas arrancadas; pero ya el experimento global presentaba grandes diferencias entre unas otras especies de leguminosas, pues, mientras las macetas sembradas con Pisum sativum crecían rápidamente, así como las de Phaseolus, las de trébol y alfalfa lo hacían lentamente y el lote de la soja tendía a secarse, y también el de Lupinus, aunque éste en menor grado.

A las cuatro semanas se procedió, también después de un riego más intenso para humedecer la vermiculita y evitar toda violencia, a comprobar la ausencia o no de nódulos en cada raíz de las distintas macetas, resultando que no había nodulación más que en las correspondientes o Pisum sativum y en las variantes inoculadas con Rhizobium bien caracterizados; la rapidez del ciclo de cultivo del Pisum, y la época en que nos encontrábamos fué lo que decidió a tomar estos lotes como objeto del experimento propiamente dicho, comprobando que

en las tres series las raíces de las plantas arrancadas presentaban nódulos en mayor o menor cantidad, excepto las dos primeras de cada lote correspondientes a los testigos sin inocular y a una de las inoculadas con un presunto rizobio que había sido aislado de nódulo de la leguminosa adecuada, pero incompletamente caracterizado en su aspecto bacteriológico, y que luego se identificó como Agr. radiobacter.

Las plantitas arrancadas de la tercera maceta de cada serie presentaban algunos nódulos, no obstante haber sido inoculadas con un germen tampoco bien caracterizado; efectivamente, la identificación bacteriológica de éste llegó a considerarlo como Rhizobium.

Las cuatro plantitas de las últimas macetas de cada serie (3.ª, 4.ª, 5.ª, 6.ª y 7.ª) mostraban en su sistema radical nódulos en bastante cantidad.

Se siguió cuidando el experimento total, esperando la época de floración para proceder a la extracción de las raicillas y comprobar de nuevo la ausencia o presencia de nódulos, y la floración llegó primero para el lote de Pisum sativum, observándose ya anteriormente que el aspecto y crecimiento de las plantas correspondía a los beneficiosos efectos de la nodulación, pues las cinco noduladas de cada serie presentaban manifiestas diferencias con las dos primeras no noduladas, que empezaron a marchitarse sin llegar a la floración.

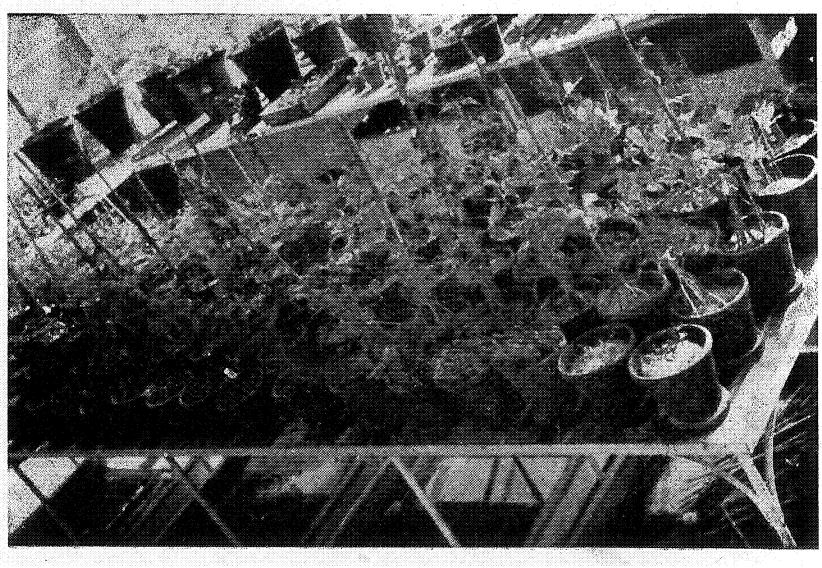
Este fué el momento elegido para, previa fotografía de las tres series, proceder, después de inundarlas, a extraer las raíces y fotografiarlas.

Simultáneamente se comprobó de nuevo el estado de la nodulación de los restantes lotes del experimento total, siendo nulo para todas las macetas de soja, con plantas ya marchitadas, también ausentes los nódulos para todas las de Lupinus, no obstante seguir el crecimiento sin marchitez. Nodulación paralela a la de Pisum para el lote de Phaseolus y para el de Trifolium; los lotes de Medicago mostraron nodulación a partir de la cuarta maceta de cada serie, resultando sin ellos las tres primeras de cada.

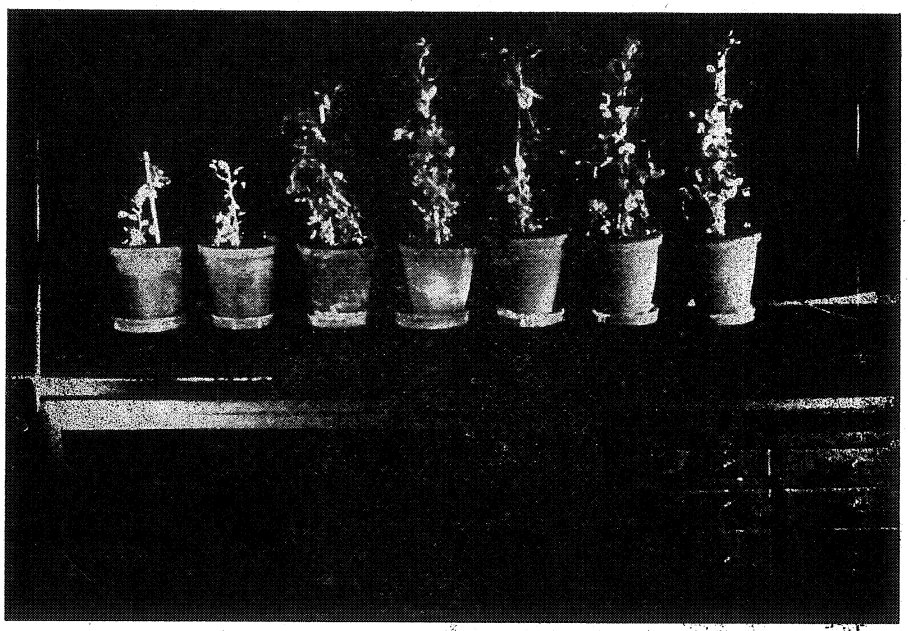
El estado de crecimiento de todo el experimento en total se apreciará en las fotografías obtenidas y las diferencias en la especie Pisum sativum en otras fotografías parciales.

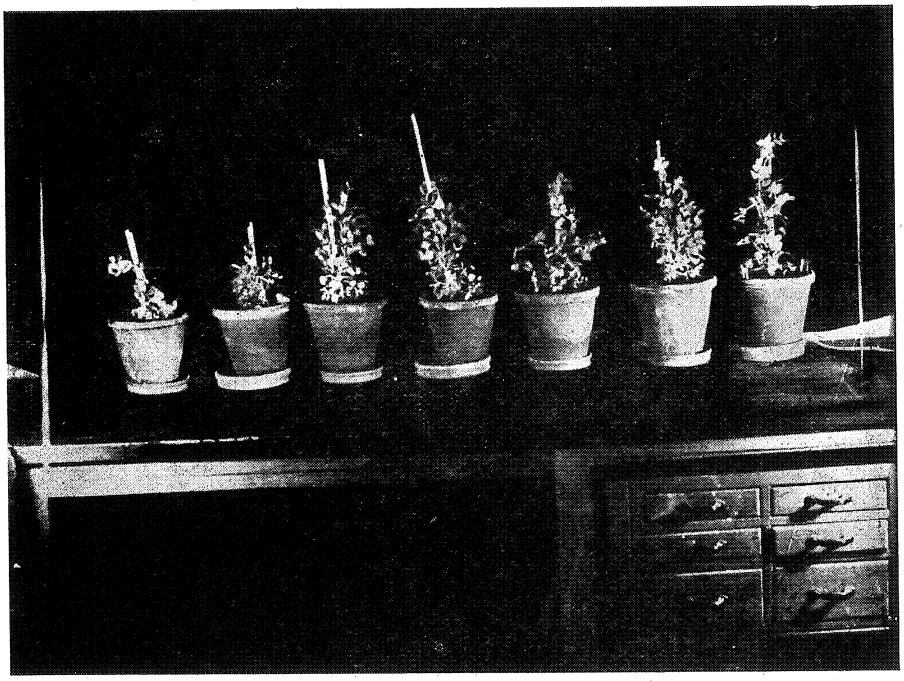
Después de haber aislado las estirpes correspondientes a todas las raíces noduladas se siguió cuidando el experimento para ser objeto de selección entre las noduladas, las de propiedades fijadoras para poder

Dos aspectos del invernadero durante el experimento.



Aspecto relativo del crecimiento de los cultivos de **Pisum Sativum.**





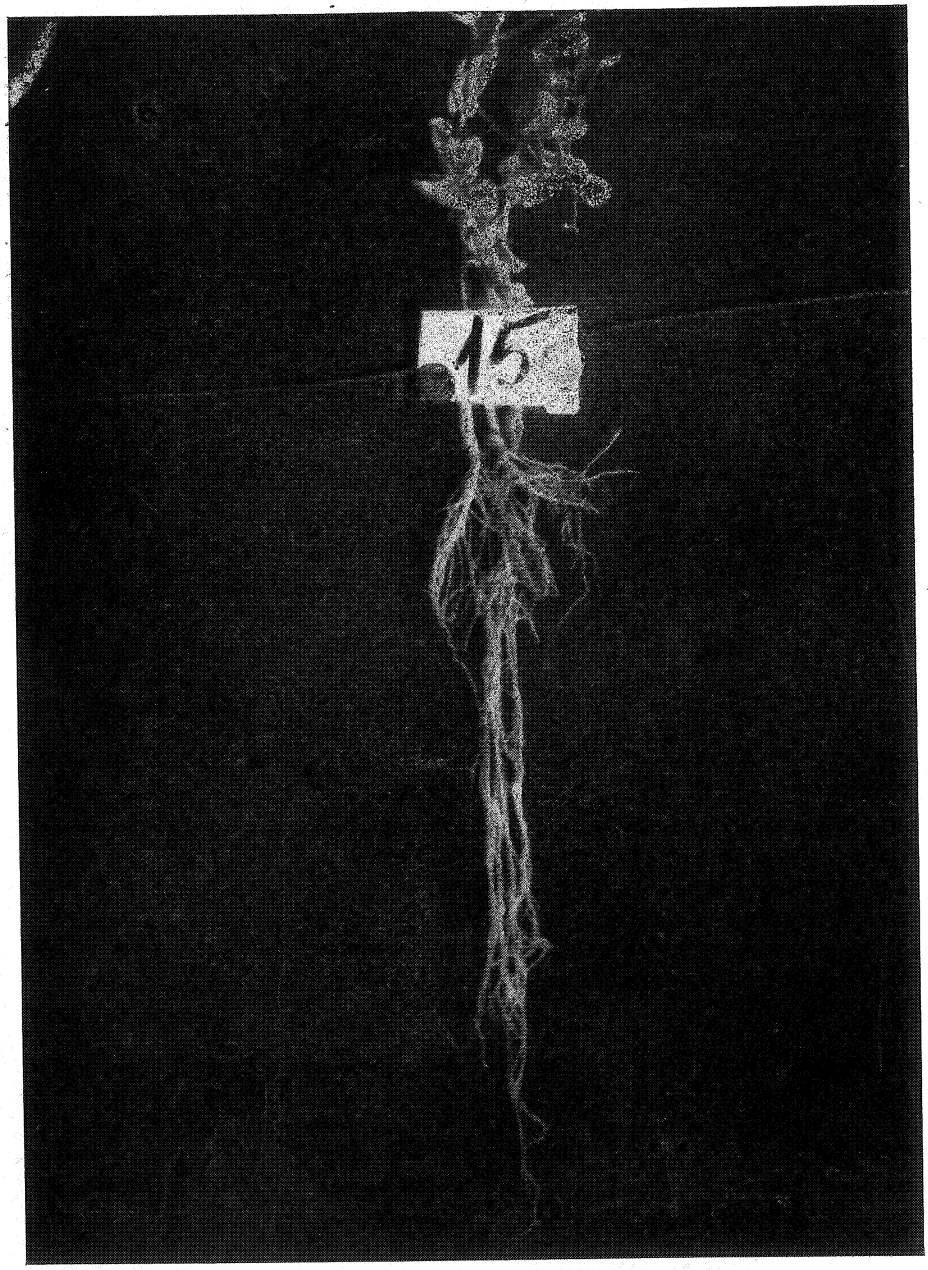
atender a las demandas que se nos hagan de estirpes eficaces, previa determinación del nitrógeno fijado, lo cual será objeto de otro trabajo.

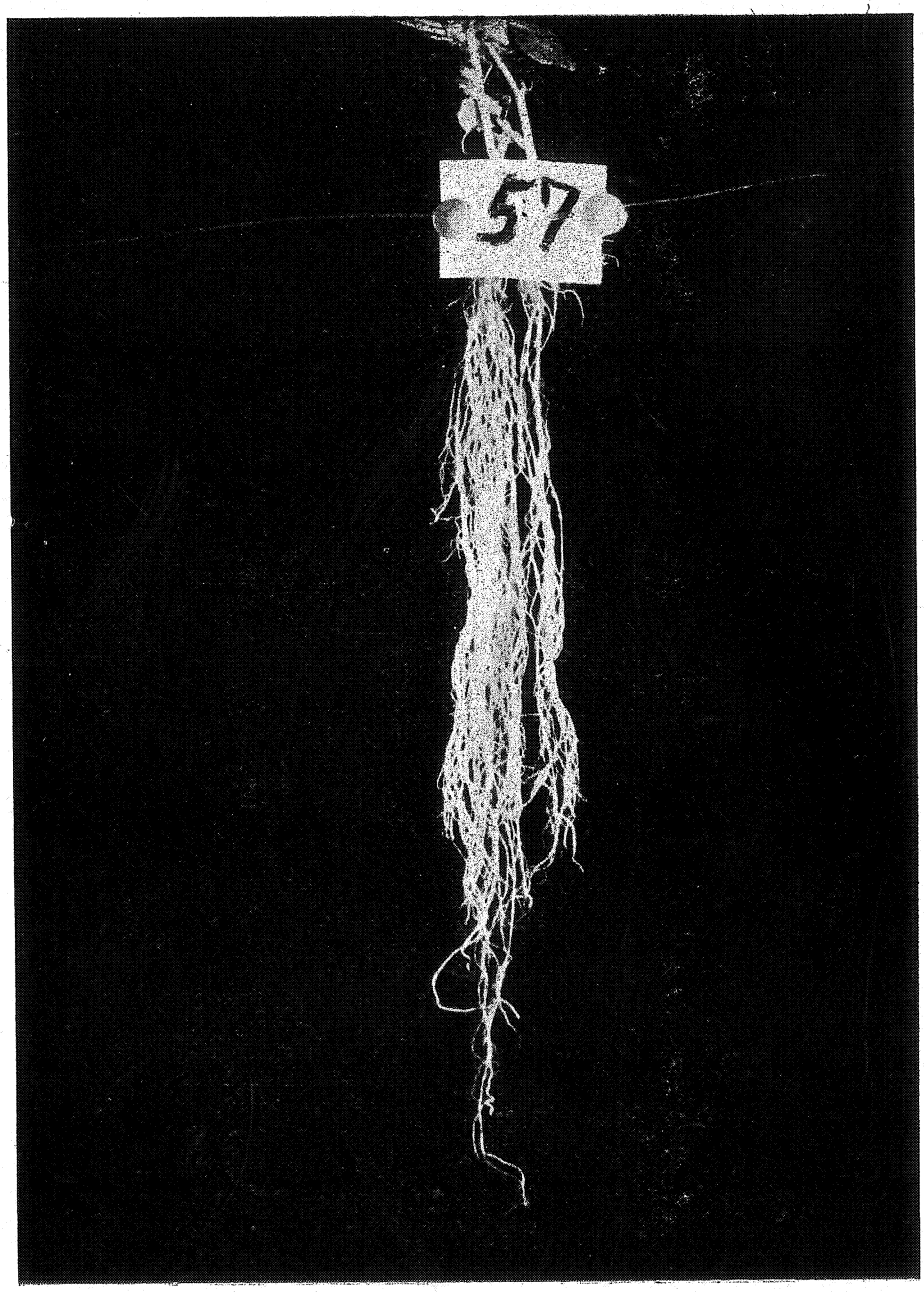
En orden a los resultados obtenidos, no ha sorprendido lo referente a la soja, por ser desconocidas las estirpes empleadas al no haber sido aisladas en este laboratorio; pero sí lo correspondiente al lote del Lupinus inoculado con estirpes de nuestra colección y que, no obstante apreciarse diferencia en el crecimiento entre las inoculadas y las no inoculadas, la ausencia total de nódulos en las raíces de todas las macetas de esta especie y en diferentes épocas ha sido absoluta; este asunto se estudiará para aclarar repitiendo el experimento y modificando las condiciones que hayan podido frustrar la aparición de nódulos o para descartar las estirpes inoculadas como no infectivas.

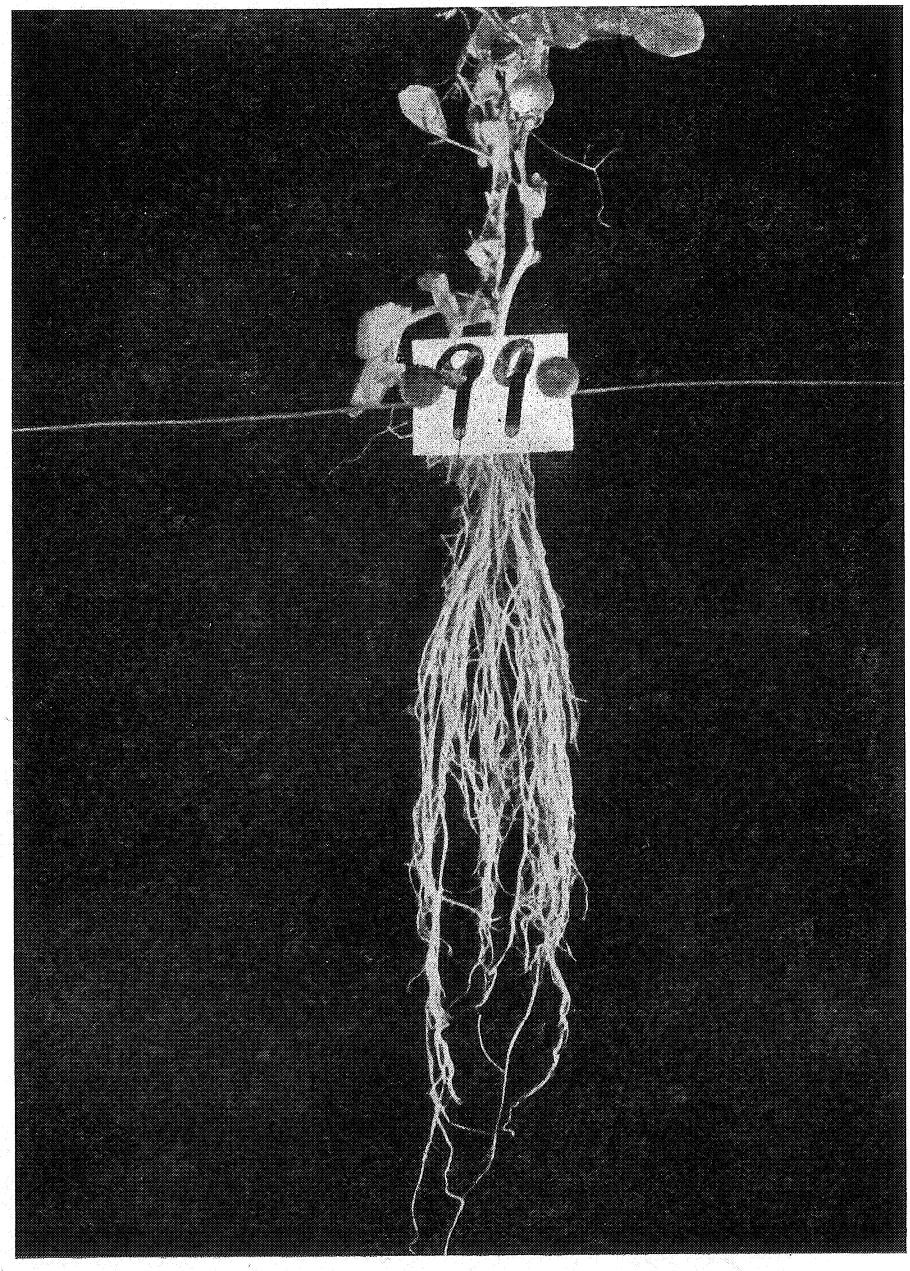
El resto del experimento se ha comportado tal como se suponía, es decir, con ausencia total de nódulos, escaso crecimiento y pronta marchitez en todas las no inoculadas o testigos, ausencia también total de nódulos en las cuatro especies, Trifolium Phaseolum, Pisum y Medicago, en las correspondientes a las inoculadas con estirpes que resultaron Agr. radiobacter. En las terceras macetas de estas mismas especies se obtiene nódulos para Trifolium, Phaseolus y Pisum, y ausencia para Medicago, lo que prueba que existe un 50 por 100 de probabilidades de no ser Rhizobium cuando la estirpe es aislada intencionadamente por aplastamiento del nódulo y no es bien identificada, pero que, a veces, este porcentaje es absoluto, como en el caso de la alfalfa, en la cual ninguna de las dos estirpes aisladas de nódulos fueron verdaderos rizobio, sino radiobacter, como se comprobó después al identificarlas bacteriológicamente.

A continuación se exponen las fotografías de las raíces de los tres lotes de Pisum; en ellas se apreciará que no hay nódulos en las de las tres macetas no inoculadas o testigos; tampoco existen en las tres inoculadas con estirpe que resultó radiobacter y buena nodulación en las restantes.

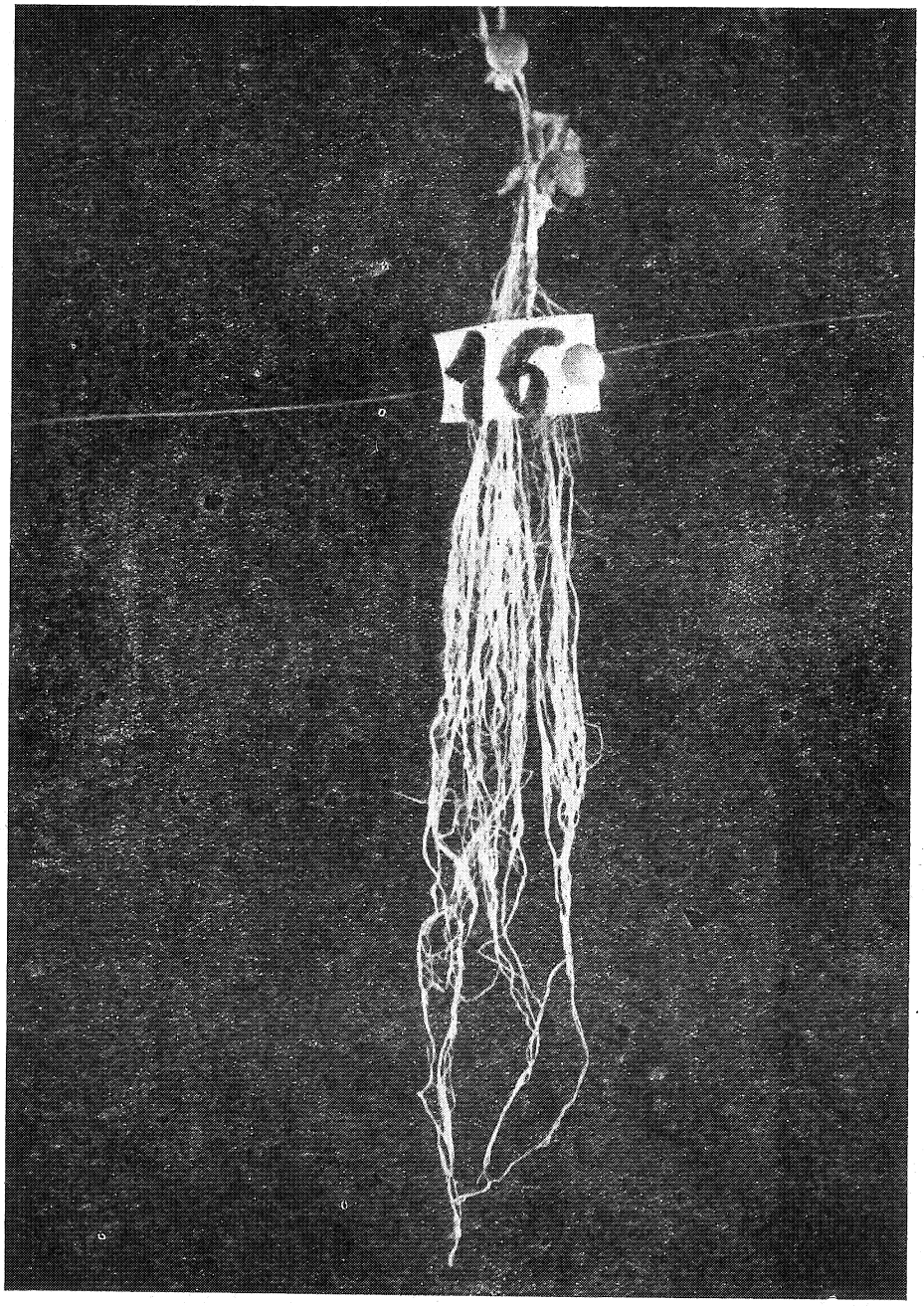
Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum, *que no fueron inoculadas (testigos). Macetas 15, 57 y 99. Ausencia de nódulos.*

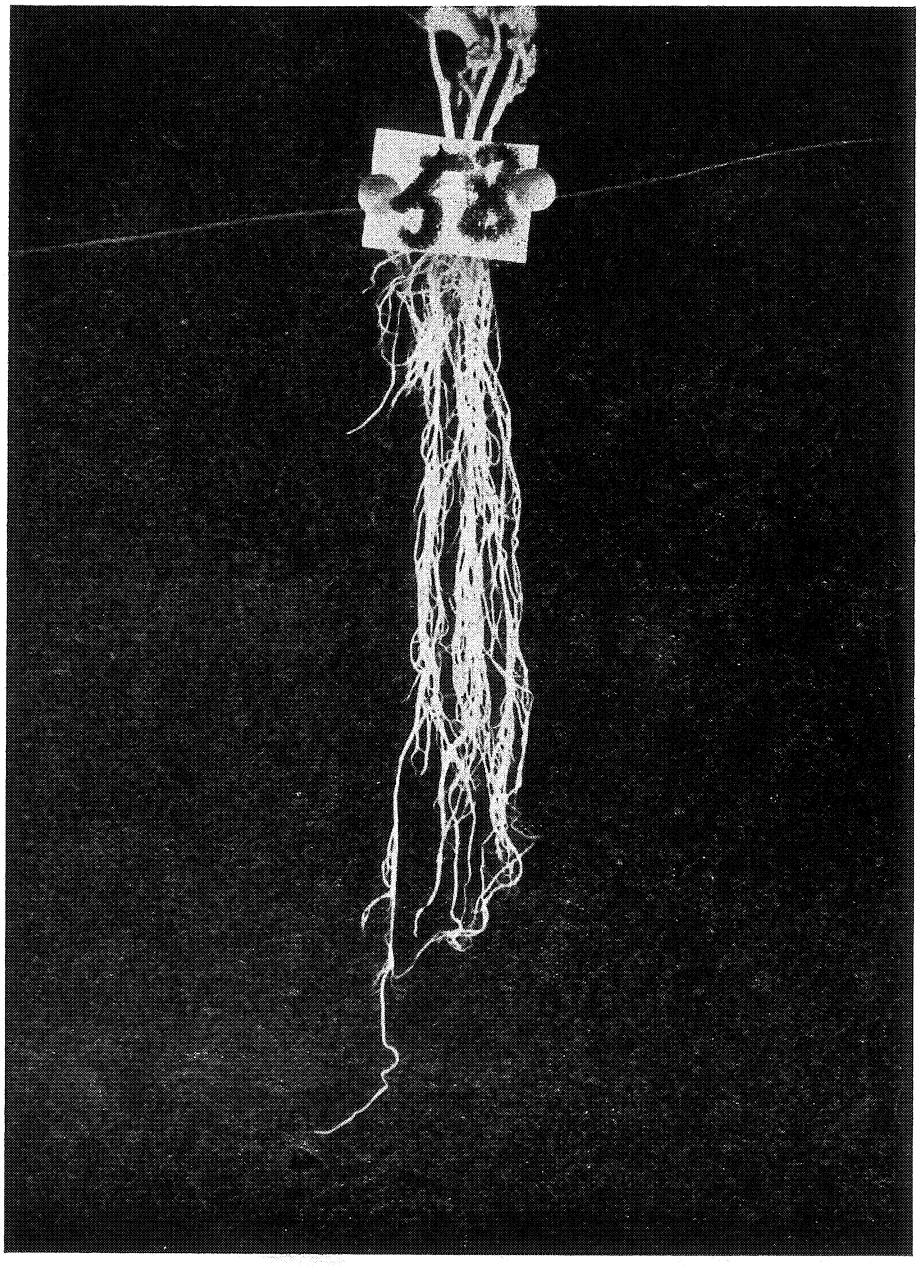


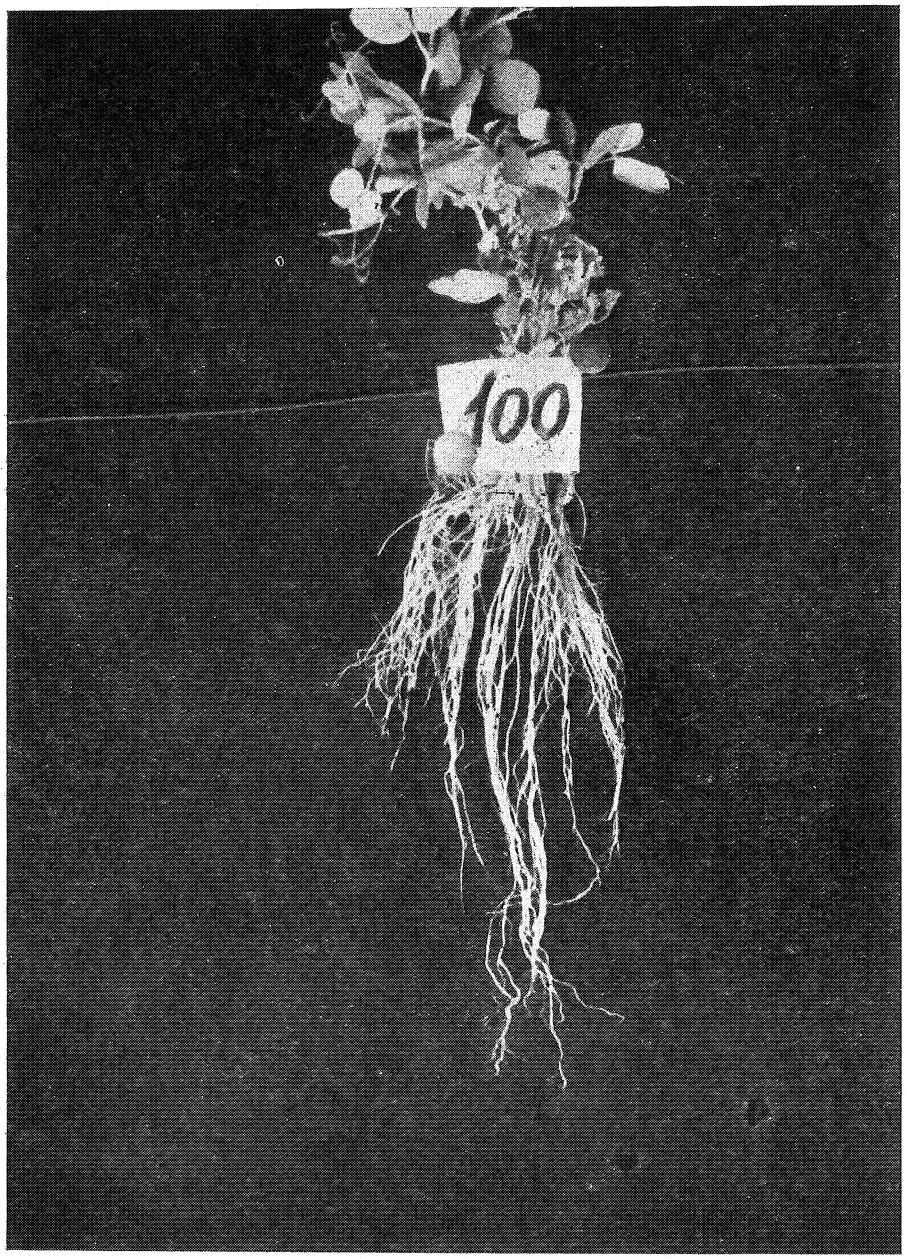

57


99

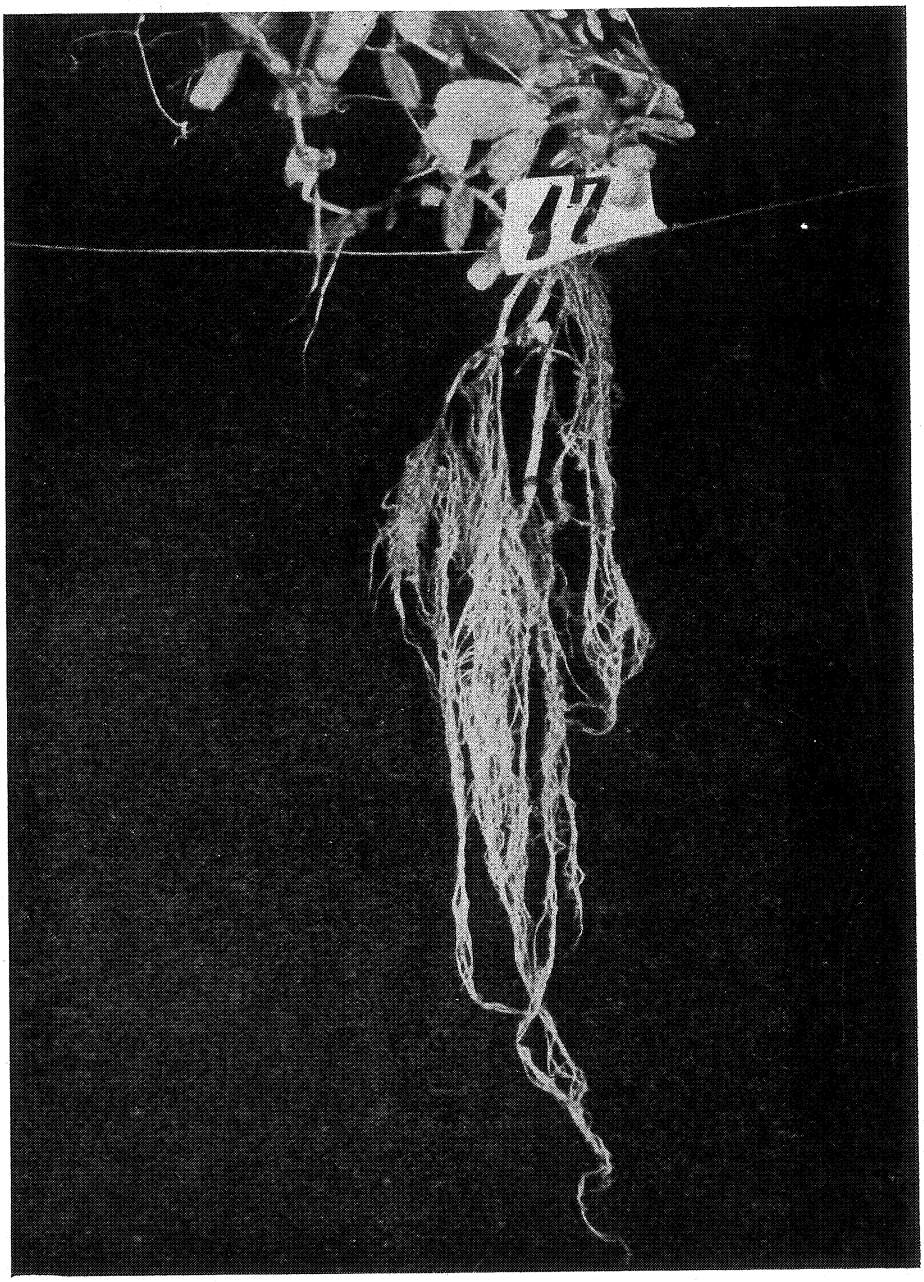
Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum, *que fueron inoculadas con bacteria que resultó* Agrobacterium Radiobacter. *Ausencia de nódulos. Macetas 16, 58 y 100.*

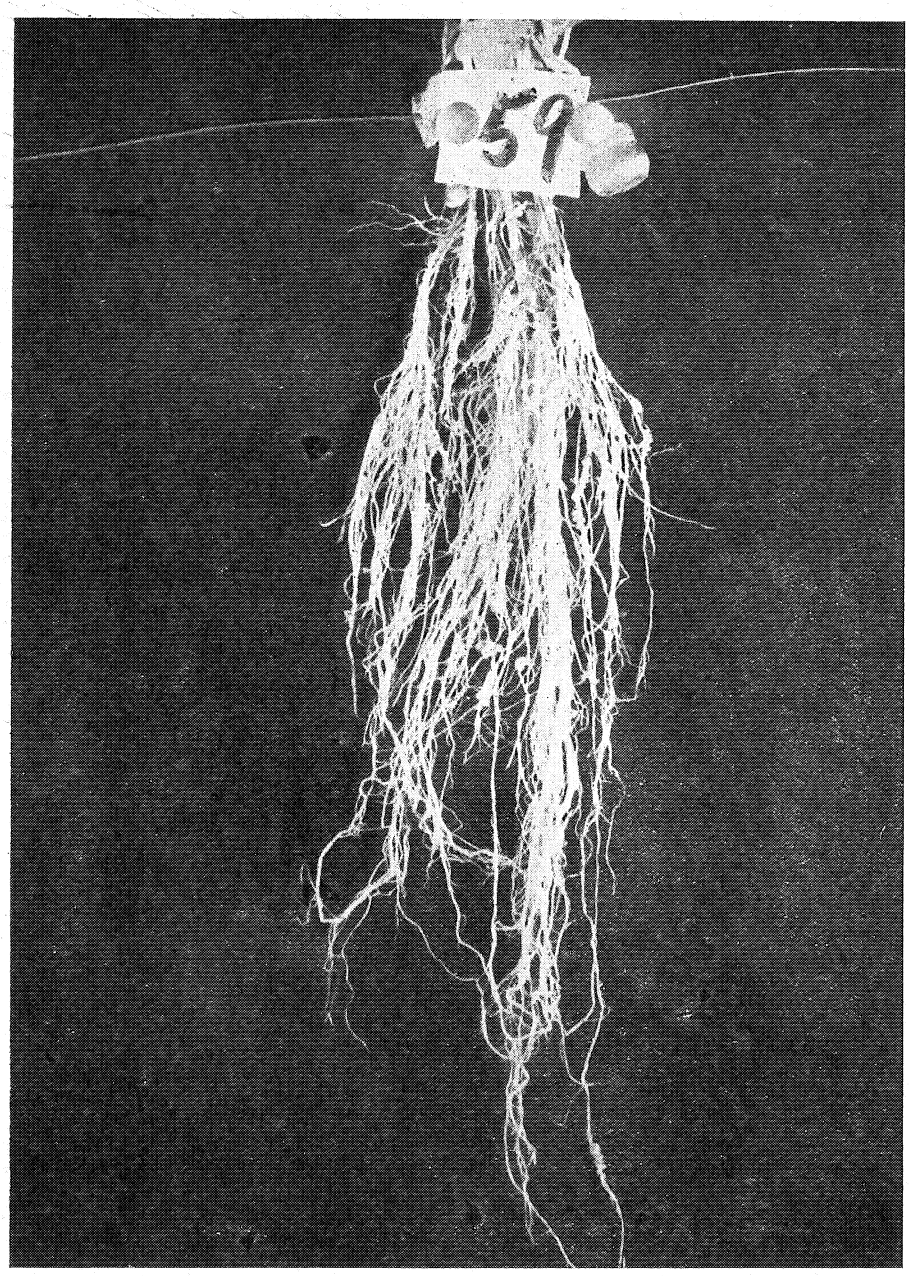


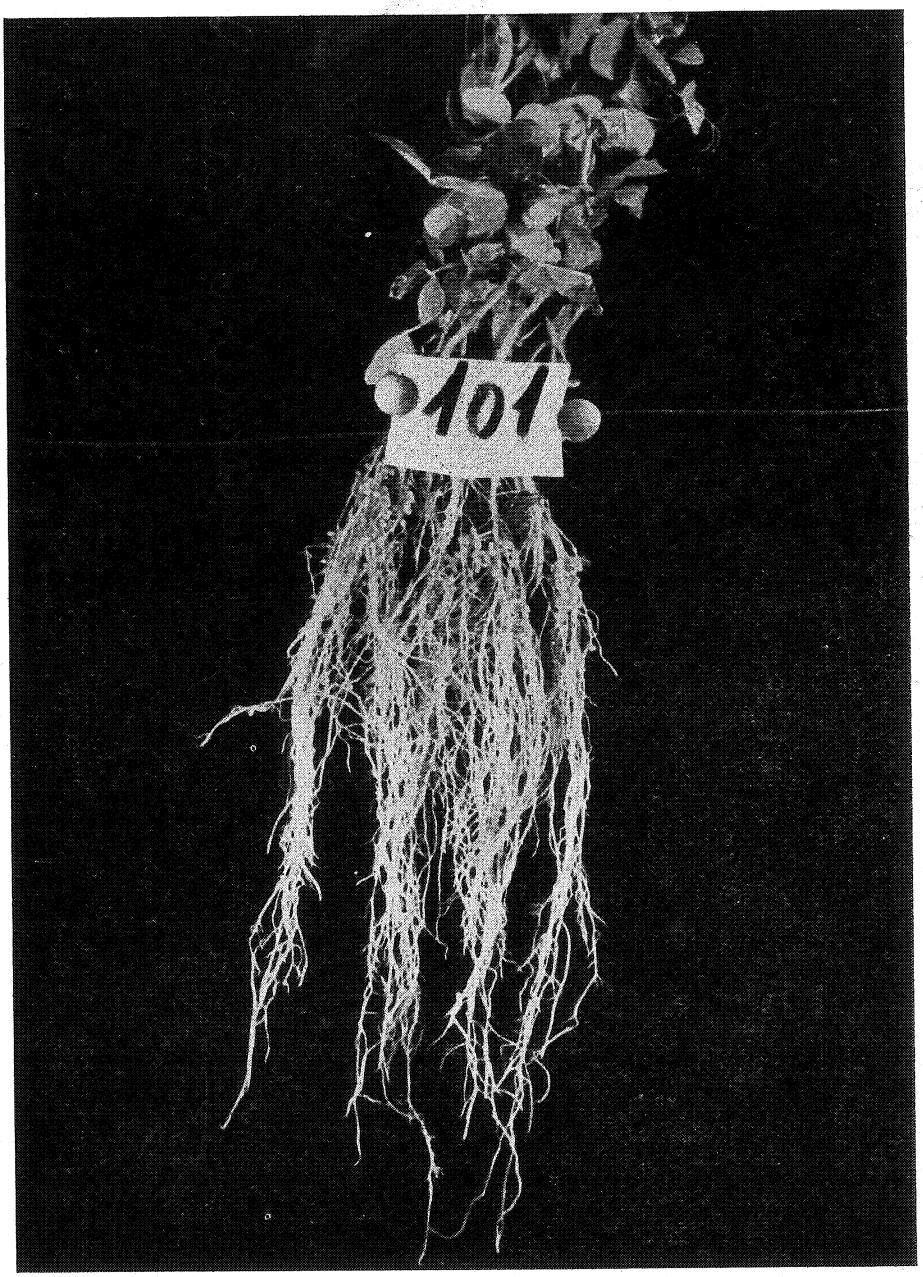



100

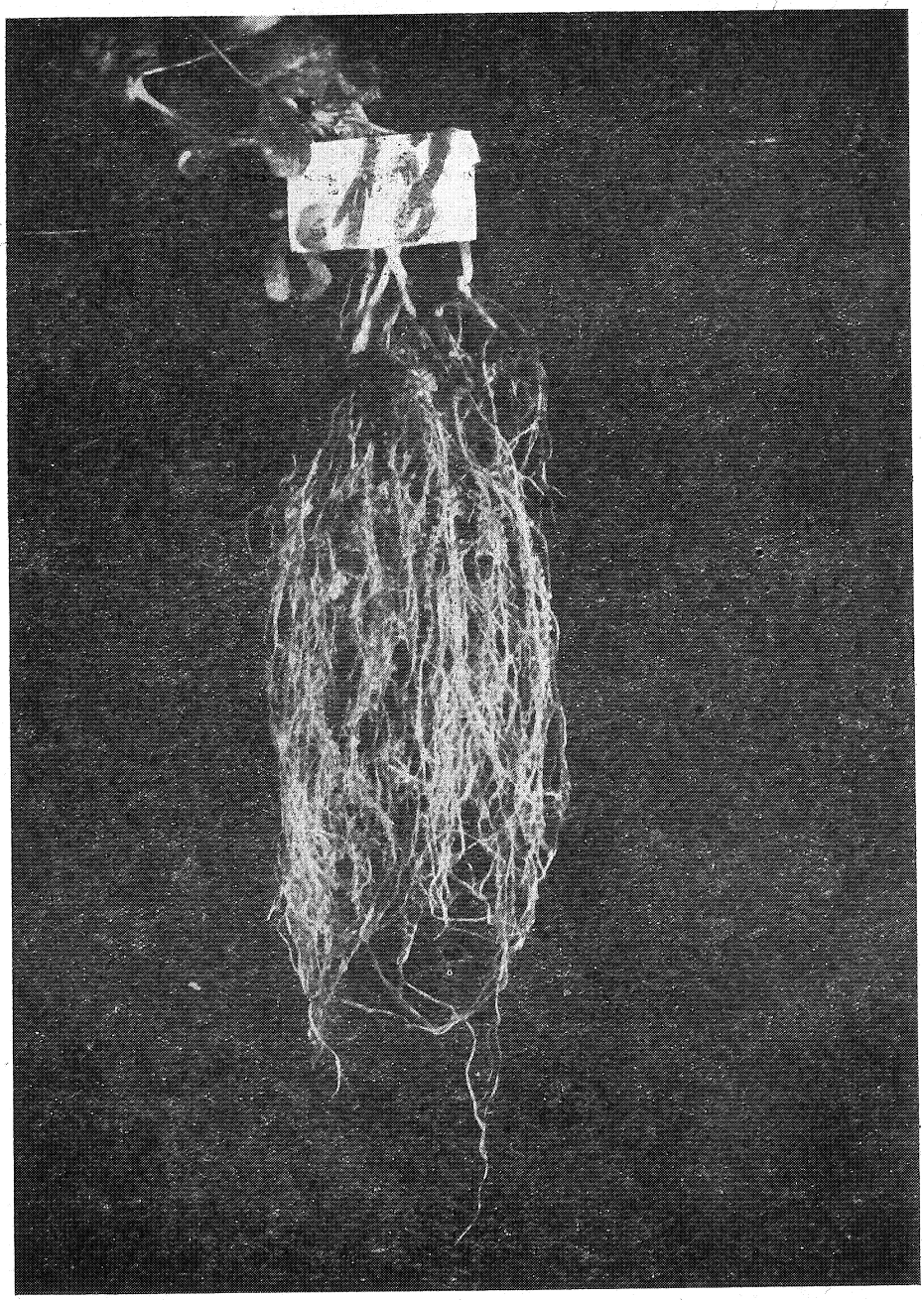
Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum. *Inoculadas con bacterias, aunque no completamente identificadas, resultaron* Rhizobium. *Macetas 17, 59 y 101.*

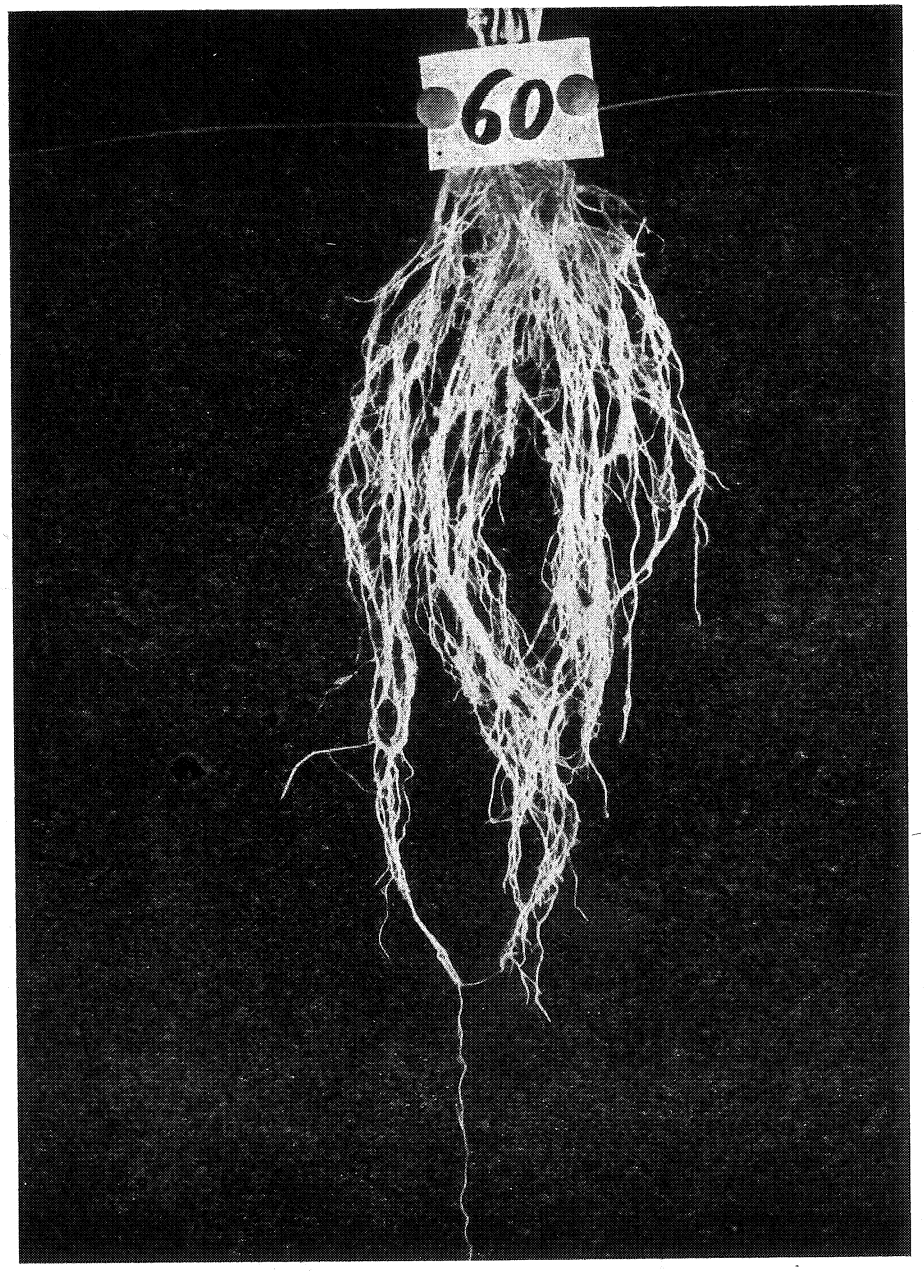


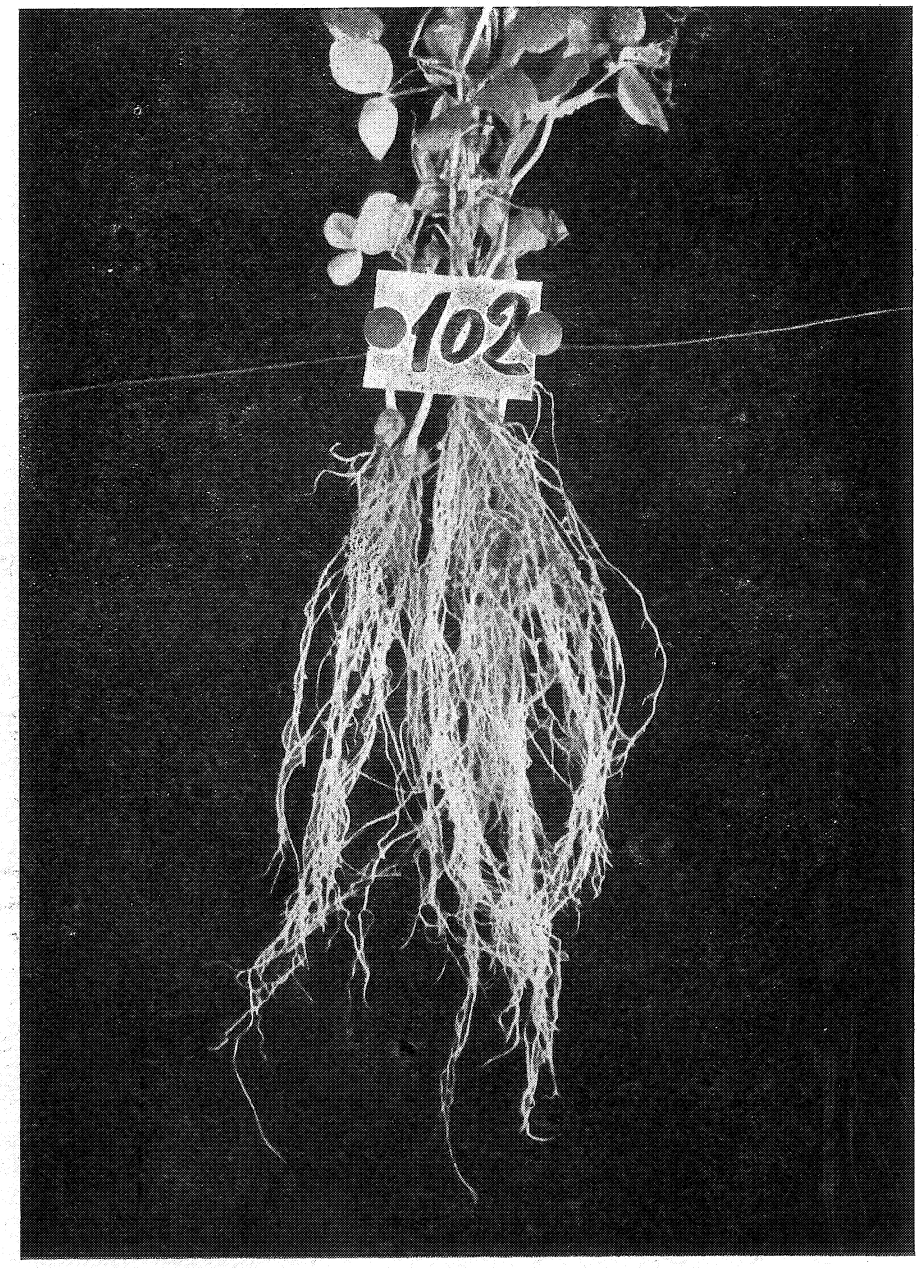

59


101

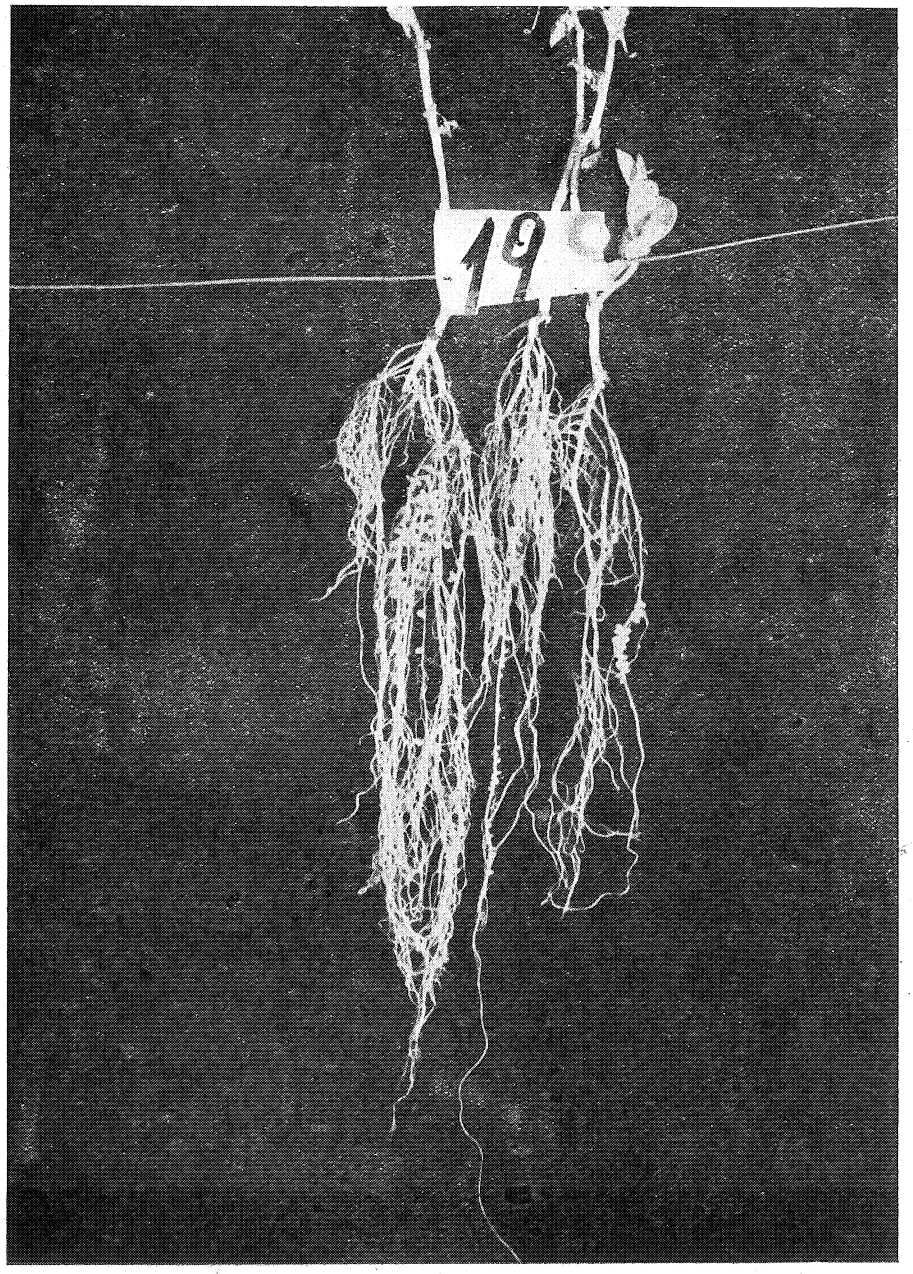
Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum. *inoculadas con* Rh. Leguminosarum *aislado de* Vicia Faba, *y bien identificado, empleando para la inoculación resiembras de bacterias de febrero de 1952 (cinco meses de antigüedad). Macetas 18, 60 y 102.*

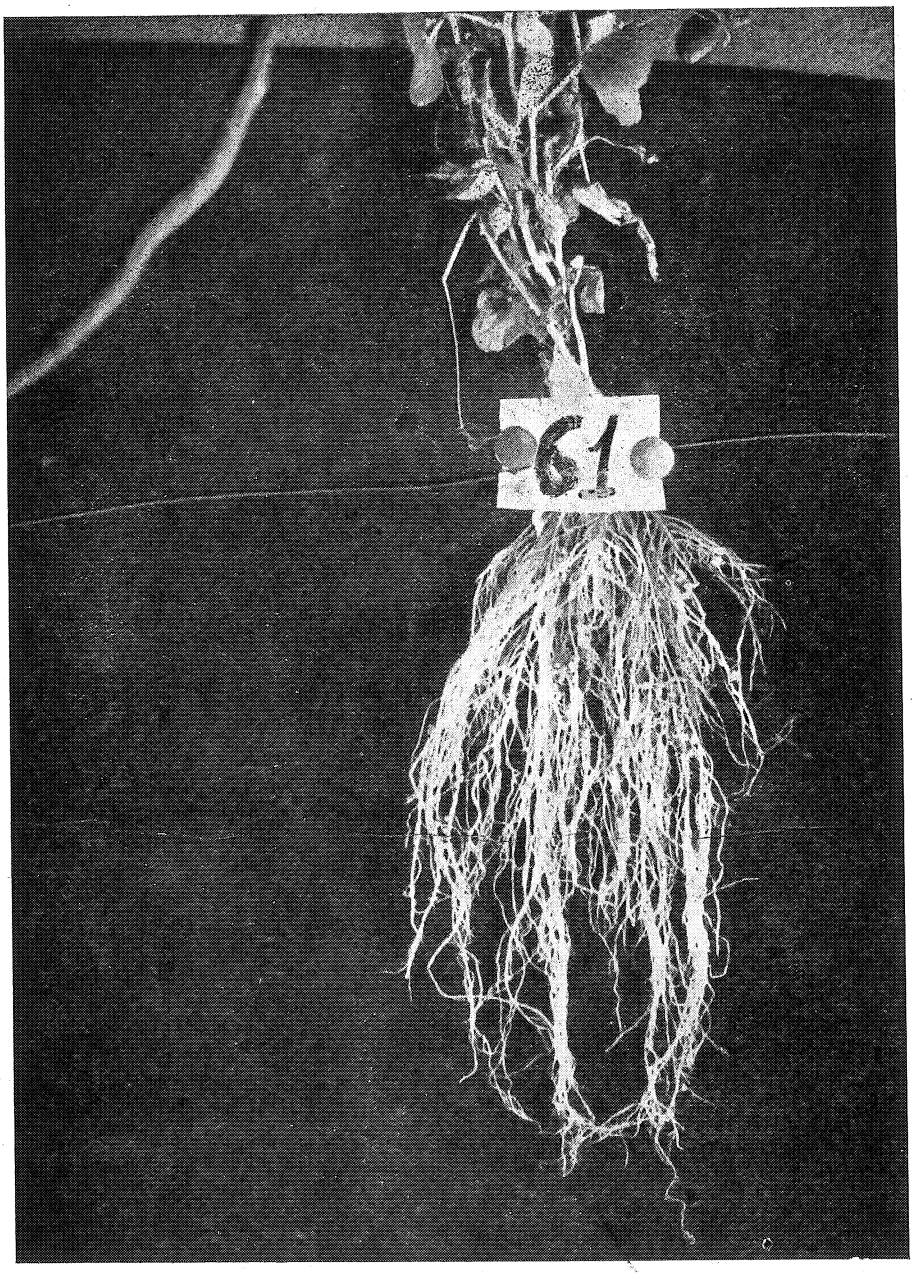


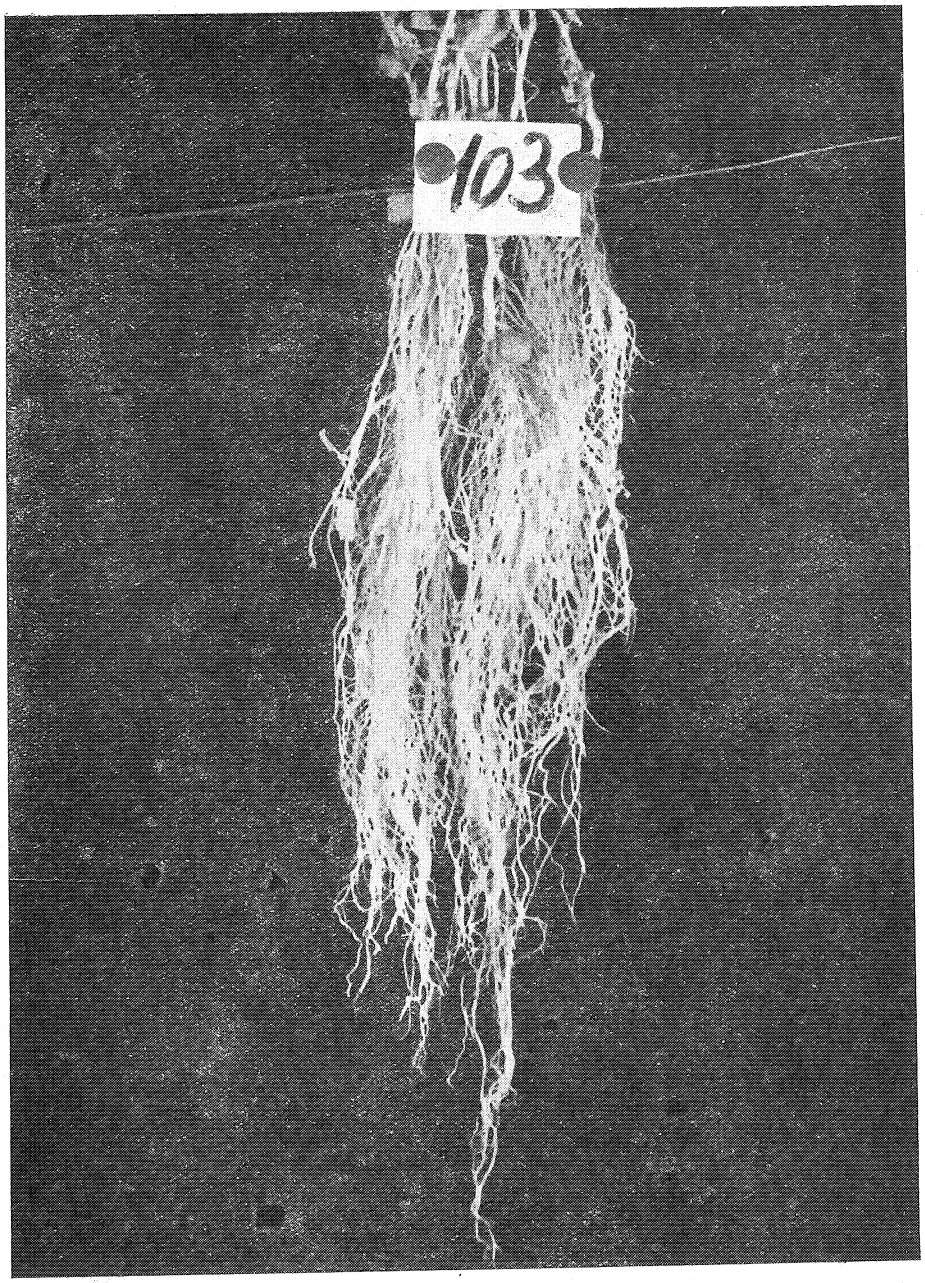

60


102

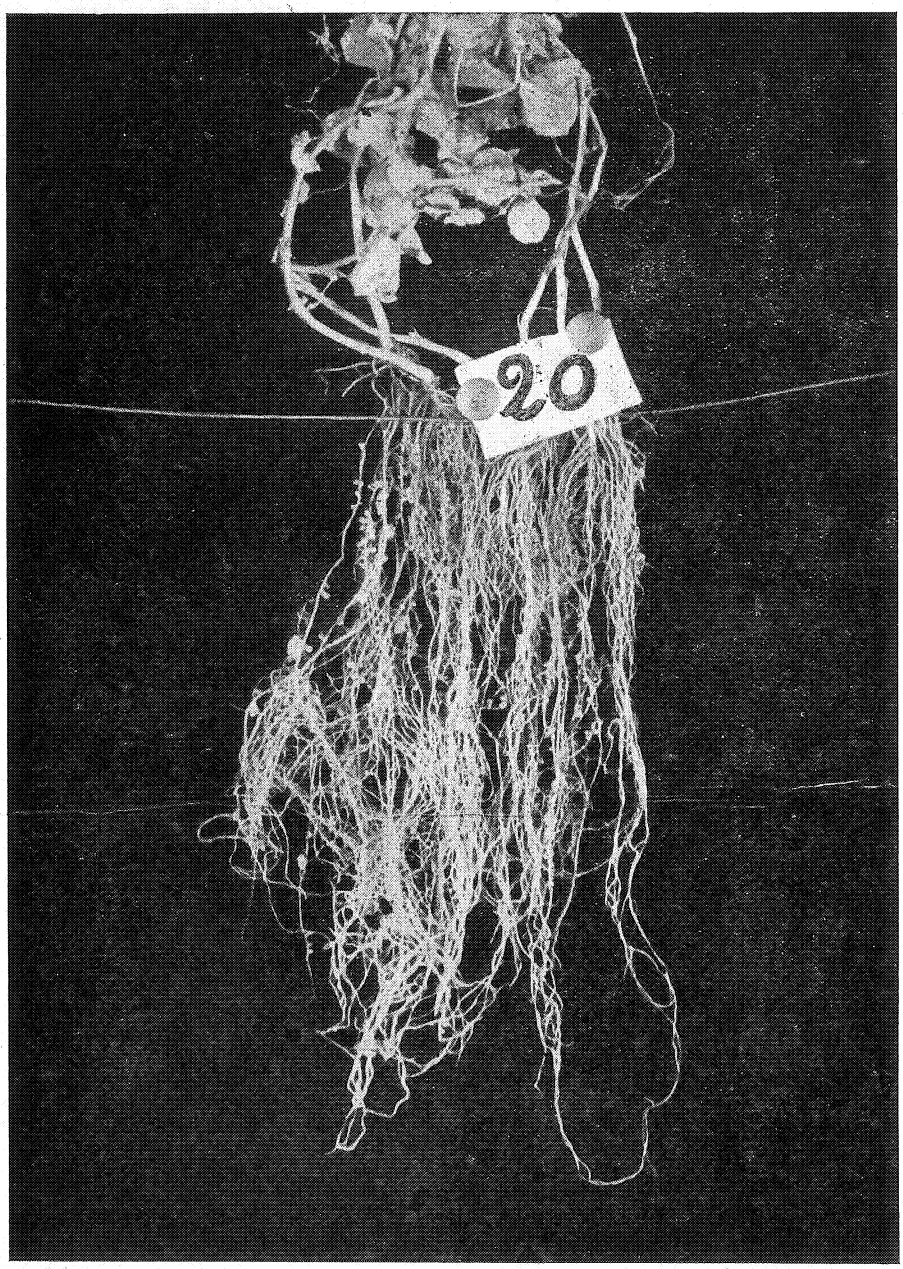
Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum, *inoculadas con* Rh. Leguminosarum, *aislado de* Vicia Faba, *y completamente identificado, empleando en la inoculación bacterias recientemente resembradas. Macetas 19, 61 y 103.*

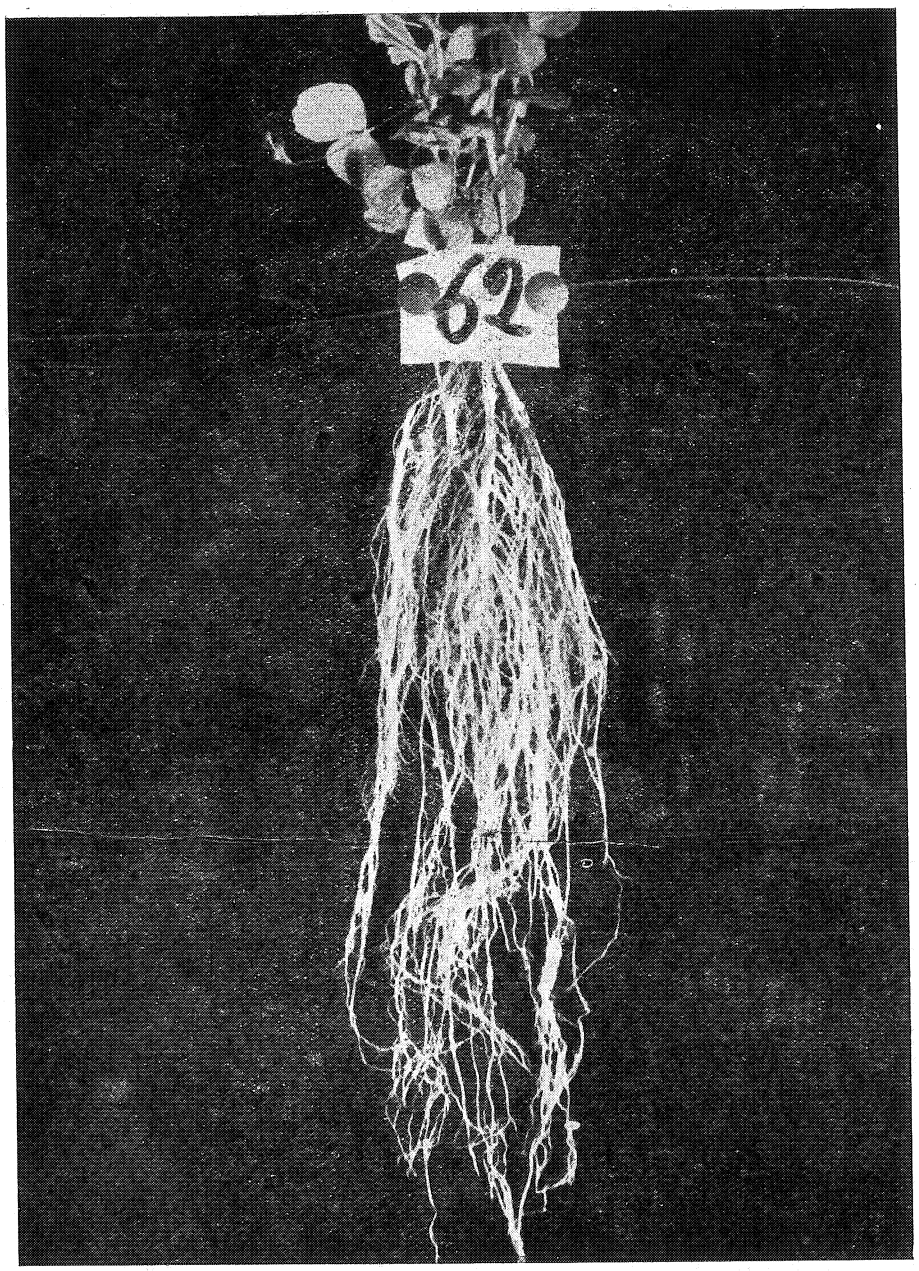


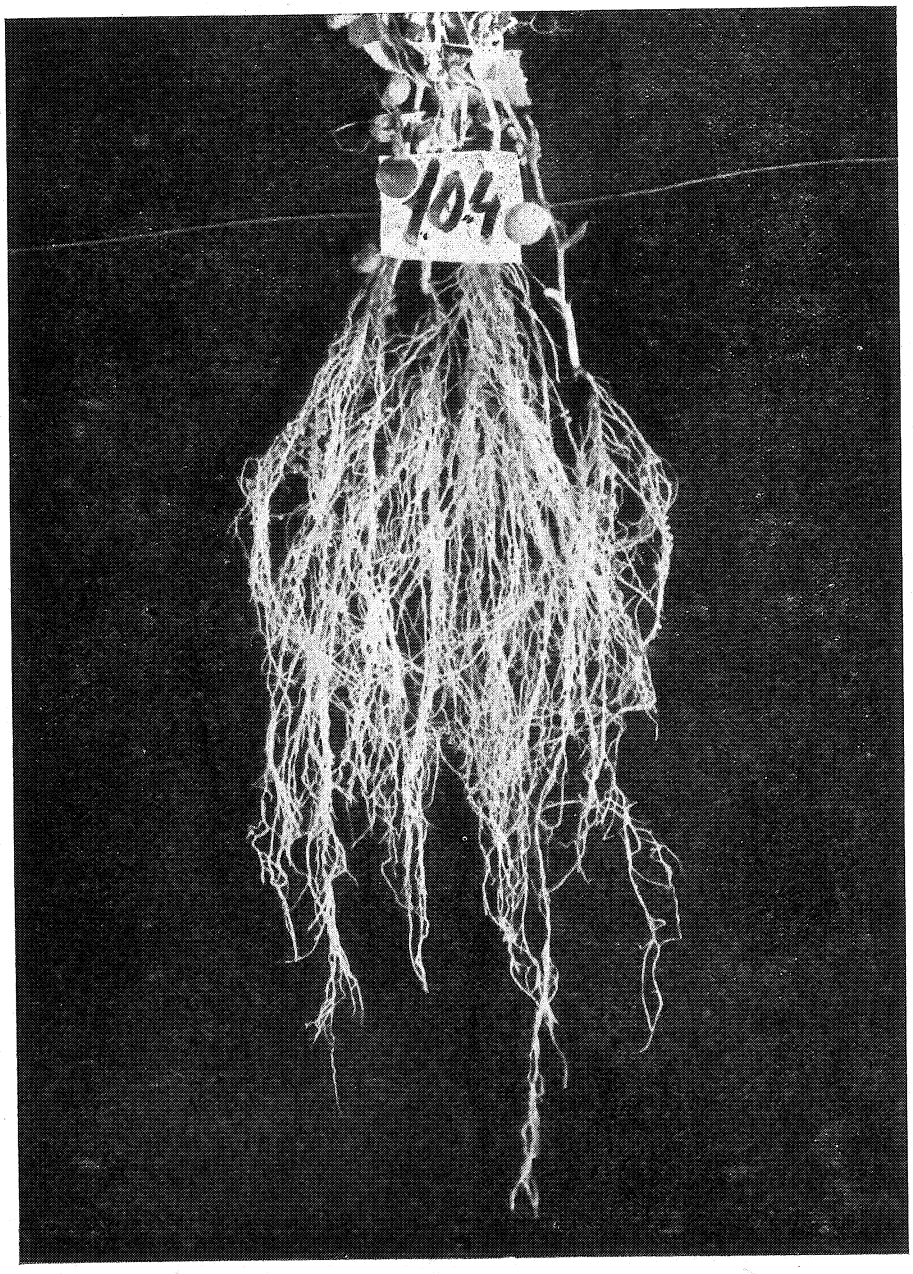

61


103

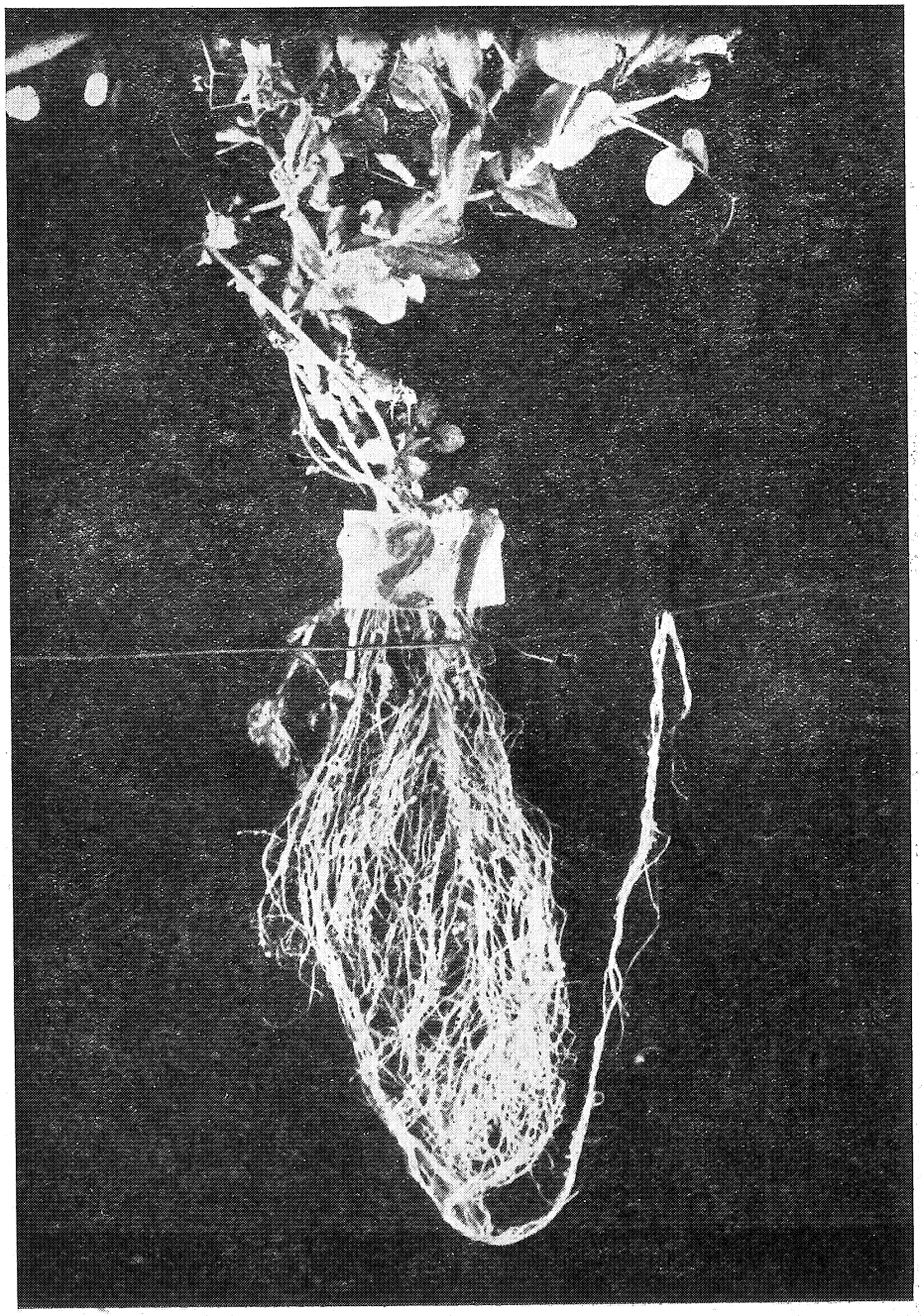
Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum, *inoculadas con* Rh. Leguminosarum *aislado de* Pisum *y completamente identificado bacteriológicamente. Se empleó en la inoculación suspensión de bacterias resembradas en febrero 1952. Macetas 20, 62 y 104.*

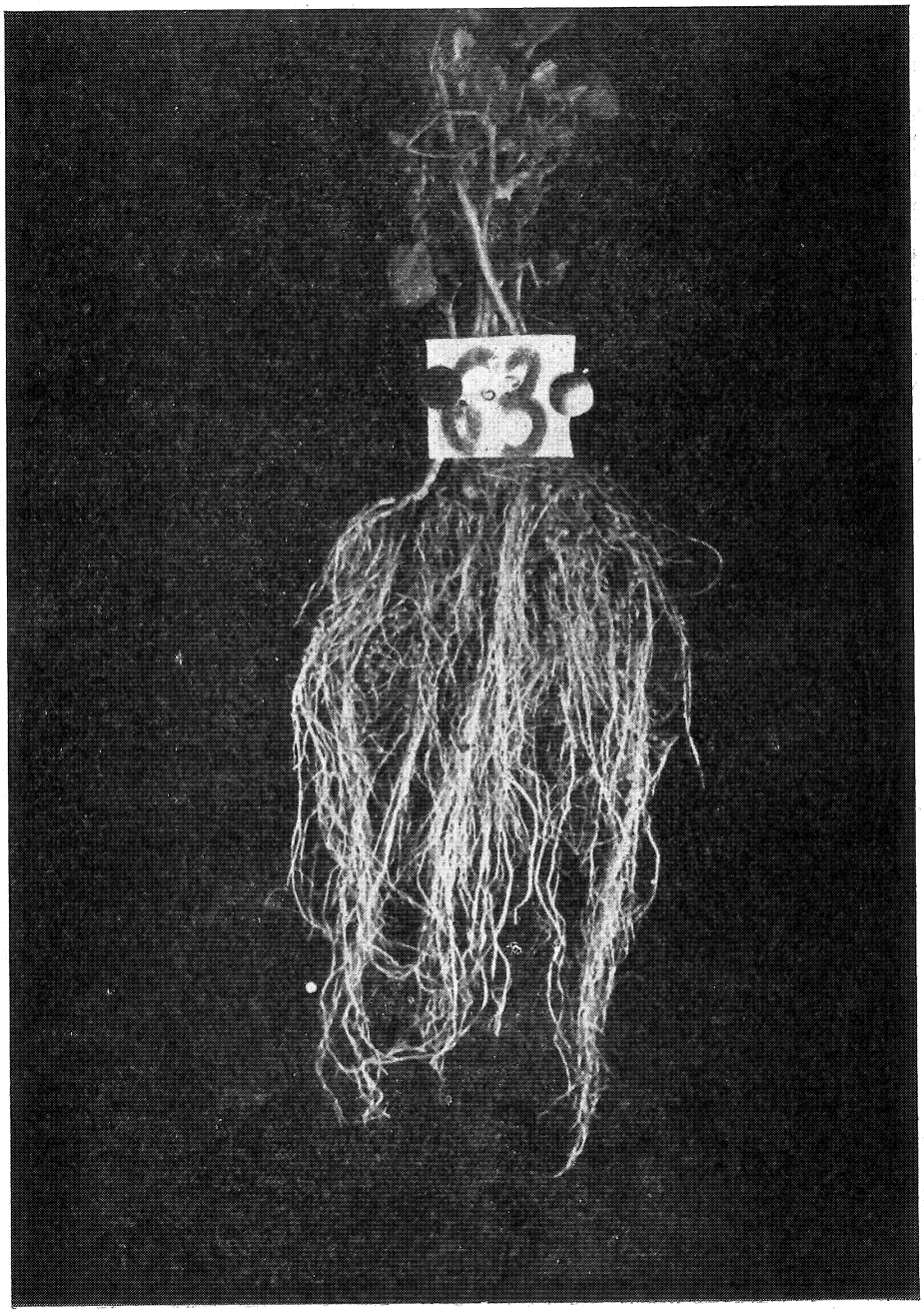


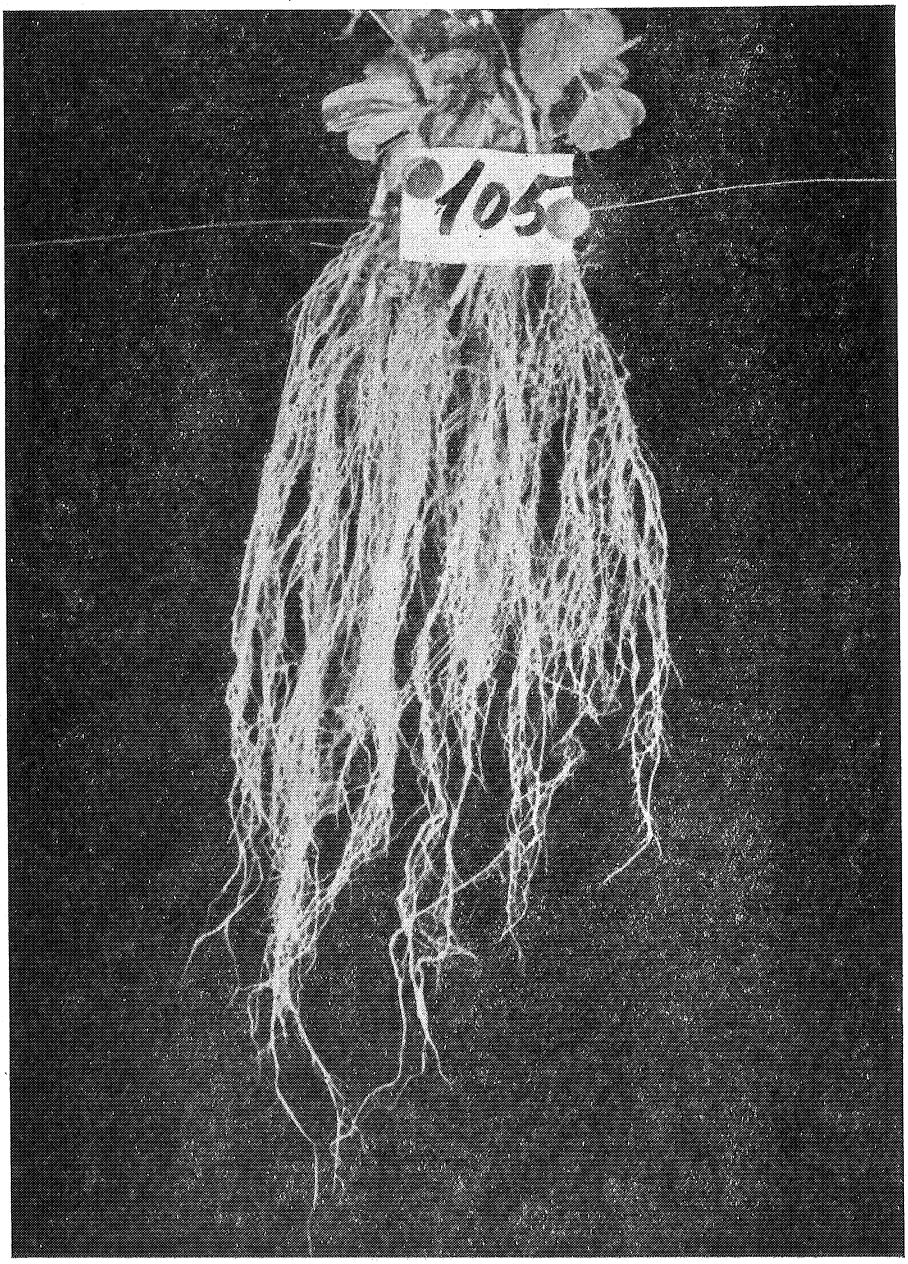

62


104

Fotografías del sistema radical de las plantas de Pisum Sativum, *inoculadas con* Rh. Leguminosarum, *aislado de* Pisum, *y completamente identificado, empleándose en la inoculación bacterias recientemente resembradas. Macetas 21, 63 y 105.*



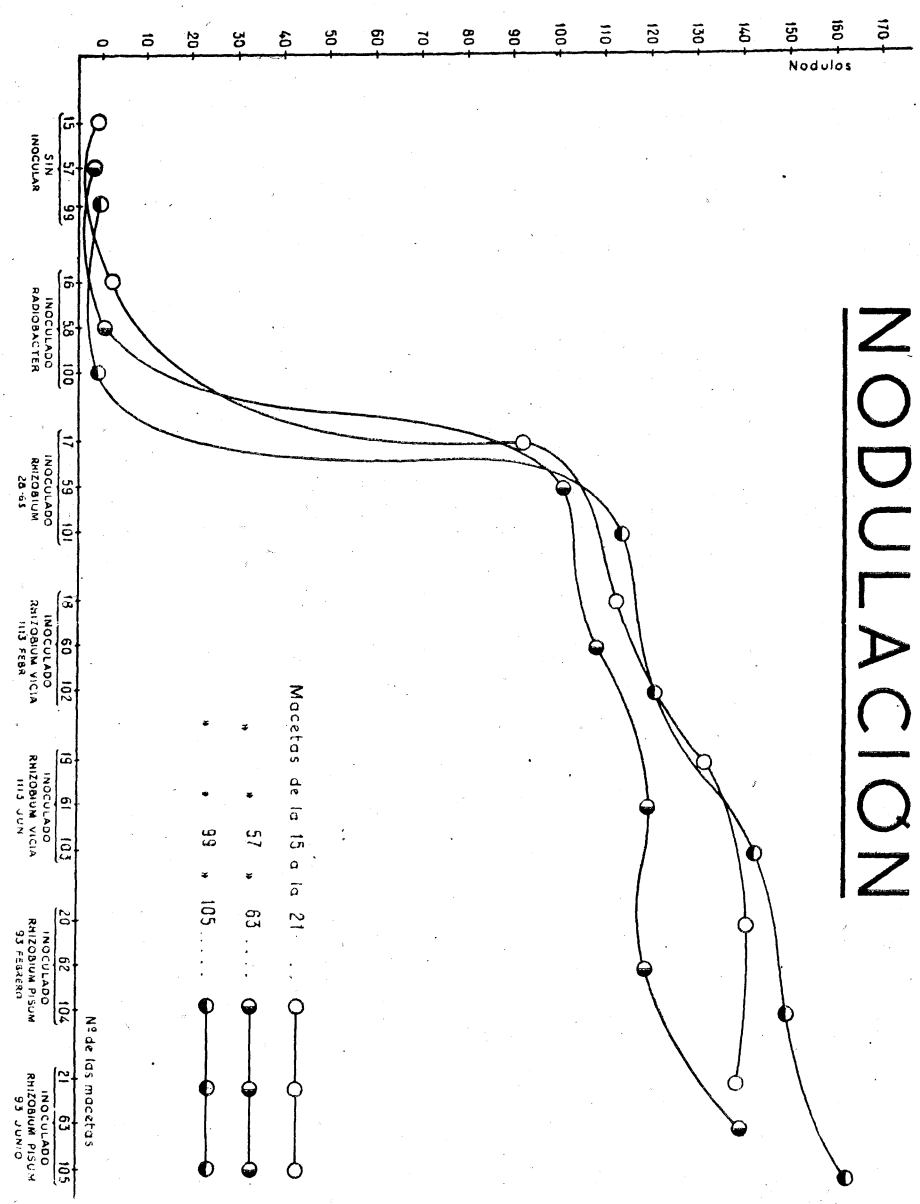



105

La tabla siguiente expresa el número de nódulos obtenidos en las raíces de cada maceta:

	Maceta	Nódulos
LOTE 1.º	15	0
	16	0
	17	92
	18	112
	19	132
	20	140
	21	138
LOTE 2.º	57	0
	58	0
	59	102
	60	108
	61	120
	62	118
	63	129
LOTE 3.º	99	0
	100	0
	101	114
	102	120
	103	141
	104	150
	105	163

La expresión gráfica de esta tabla figura a continuación.



De todas las raíces noduladas se aislaron las respectivas estirpes de Rhizobium, cuya caracterización bacteriológica figura en los cuadros 10 (I, II, III).

CUADRO 10 (I)

CARACTERES CULTURALES, BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS DE LAS ESTIRPES DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM, AISLADAS DE LAS RAÍCES CORRESPONDIENTES A LAS MACETAS DEL LOTE 1.º, DE PISUM SATIVUM INOCULADAS CON RHIZOBIUM ESPECÍFICO

Estirpes	173	183	193	203	213
origen o procedencia	Maceta 17 del experimento	Maceta 18 del experimento	Maceta 19 del experimento	Maceta 20 del experimento	Maceta 21 del experimento
Número de nódulos.	92	112	132	140	138
Nódulo elegido... ...	Superior	Superior	Superior	Superior	Superior
Bacteroides...	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados
Fecha aislamiento ..	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952
Medio empleado ...	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7
Crecimiento...	Rápido, 4 días	Rápido, 4 días	Rápido, 4 días	Rápido, 4 días	Rápido, 4 días
Estría o colonias ...	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa
Morfología	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos

Cristal violeta	C. peq. poco teñ.	C. peq. poco teñ.	C. peq. poco teñ.	C. peq. poco teñ.	C. peq. poco teñ.
Medio rojo congo ...	No absorbe	No absorbe	No absorbe	No absorbe	No absorbe
Medio glicerofos. ...	No pardea	No pardea	No pardea	No pardea	No pardea
Medio nitratado.. ...	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +
Caldo 79 pH12	No crece	No crece	No crece	No crece	No crece
Leche tornasolada ...	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero
Glucosa	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Sacarosa...	+	+	+	+	+
Xilosa	0	0	0	0	0
V. P. y R. M.	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas
Producción indol ...	No	No	No	No	No
Resiembras...	Todas las estirpes en: Sep. 1952, Nov. 1952 y Enero 1953.				

CUADRO 10 (II)

CARACTERES CULTURALES, BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS DE LAS ESTIRPES DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM, AISLADAS DE LAS RAÍCES CORRESPONDIENTES A LAS MACETAS DEL LOTE 2.º, DE PISUM SATIVUM INOCULADAS CON RHIZOBIUM ESPECÍFICO

Estirpes	593	603	613	623	633
origen o procedencia	Maceta 59 del experimento	Maceta 60 del experimento	Maceta 61 del experimento	Maceta 62 del experimento	Maceta 63 del experimento
Número de nódulos.	102	108	120	118	129
Nódulo elegido... ...	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
Bacteroides...	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados
Fecha aislamiento ..	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952
Medio empleado ...	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7
Crecimiento...	Rápido 4 días	Rápido 4 días	Rápido 4 días	Rápido 4 días	Rápido 4 días
Estría o colonias ...	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa	Blanca-mucosa
Morfología	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos	Cocos y bacilos

Cristal violeta	Col. peq. p. teñ.	Col. peq. poco tñ.	Col. peq. poco tñ.	Col. peq. poco tñ.	Col. peq. poco tñ.
Medio rojo congo ...	No absorbe	No absorbe	No absorbe	No absorbe	No absorbe
Medio glicerofos. ...	No pardea.	No pardea	No pardea	No pardea	No pardea
Medio nitratado.. ...	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +
Calto 79 pH12	No crece	No crece	No crece	No crece	No crece
Leche tornasolada ...	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero
Glucosa	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Sacarosa...	+	+	+	+	+
Xilosa	0	0	0	0	0
V. P. y R. M.	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas
Producción indol ...	No	No	No	No	No
Resiembras...	Todas las estirpes en: Sep. 1952, Nov. 1952 y Enero 1953.				

CUADRO 10 (III)

CARACTERES CULTURALES, BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS DE LAS ESTIRPES DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM, AISLADAS DE LAS RAÍCES CORRESPONDIENTES A LAS MACETAS DEL LOTE 3.º, DE PISUM SATIVUM INOCULADAS CON RHIZOBIUM ESPECÍFICO

Estirpes	1.013	1.023	1.033	1.043	1.053
origen o procedencia	Maceta 101 del experimento	Maceta 102 del experimento	Maceta 103 del experimento	Maceta 104 del experimento	Maceta 105 del experimento
Número de nódulos.	114	120	141	150	163
Nódulo elegido... ...	Inferior	Inferior	Inferior	Inferior	Inferior
Bacteroides...	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados	Vacuolados
Fecha aislamiento ..	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952	Fin de jul. 1952
Medio empleado ...	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7	79 M pH 7
Crecimiento...	Rápido 4 días	Rápido 4 días	Rápido 4 días	Rápido 4 días	Rápido 4 días
Estría o colonias ...	Blanca-mucosa Cocos y bacilos	Blanca-mucosa Cocos y bacilos	Blanca-mucosa Cocos y bacilos	Blanca-mucosa Cocos y bacilos	Blanca-mucosa Cocos y bacilos

Cristal violeta	C. peq. poco teñ.	C. peq. poco ten.	C. peq. poco ten.	C. peq. poco ten.	C. peq. poco ten.
Medio rojo congo ...	No absorbe	No absorbe	No absorbe	No absorbe	No absorbe
Medio glicerofos. ...	No pardea	No pardea	No pardea	No pardea	No pardea
Medio nitratado.. ...	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +	Nitritos +
Caldo 79 pH12	No crece	No crece	No crece	No crece	No crece
Leche tornasolada ...	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero	Alc. y suero
Glucosa	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Sacarosa...	+	+	+	+	+
Xilosa	0	0	0	0	0
V. P. y R. M.	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas	Negativas
Producción indol ...	No	No	No	No	No
Resiembras...	Todas las estirpes en Sep. 1952, Nov. 1952 y Enero 1953.				

Las correspondientes a la tercera serie fueron colocadas rápidamente en sus respectivas macetas, no para seguir su cultivo, sino para investigar la posible relación de su permanencia en el material soporte durante más tiempo, con el incremento o no en nitrógeno.

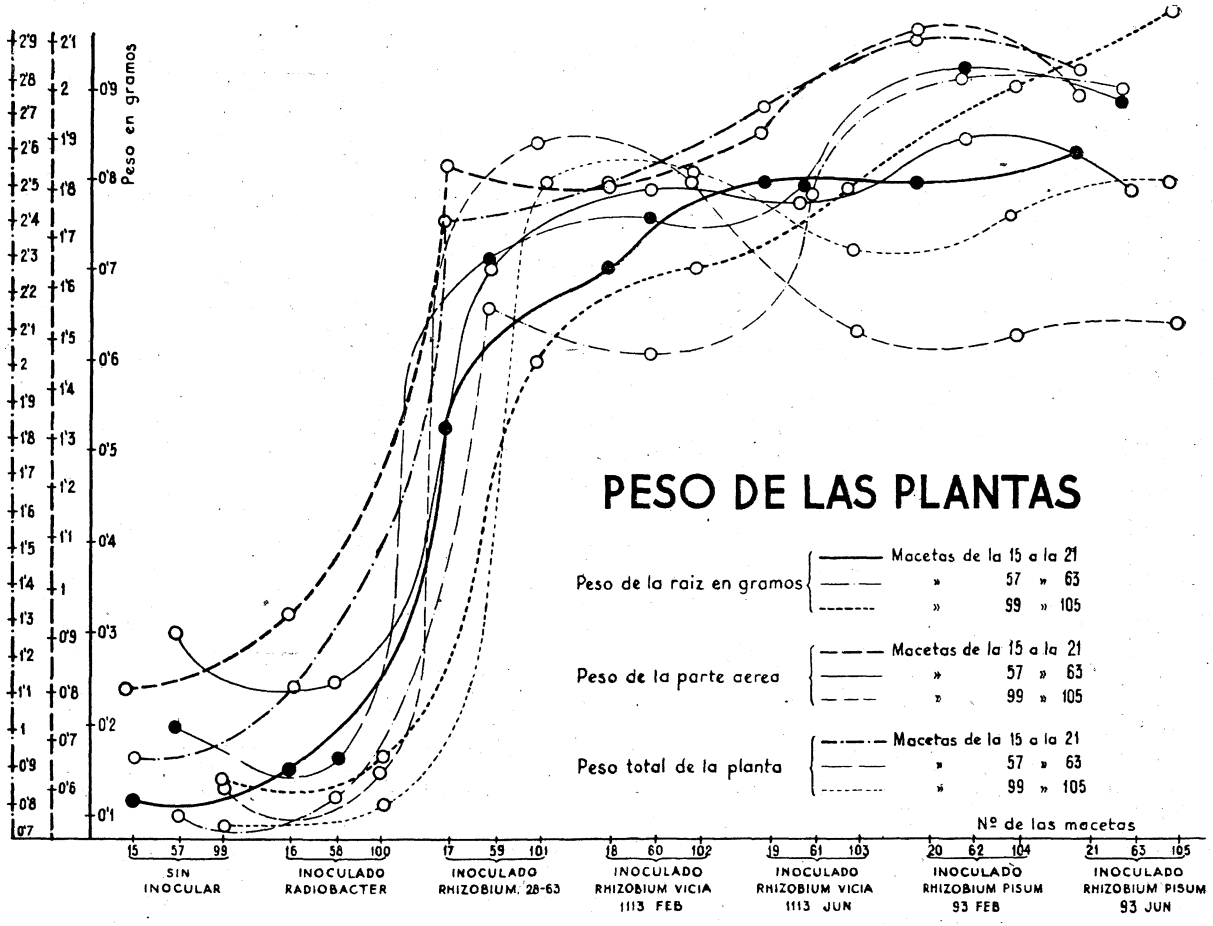
En este estado se dejaron un mes, sin nuevos riegos, sino dejando las macetas en el Laboratorio.

Las plantas de las otras dos series, macetas 15 al 21 y 57 al 63, se desecaron en estufa a 90-100 grados hasta peso constante, y un mes más tarde se desecaron también las de la otra serie.

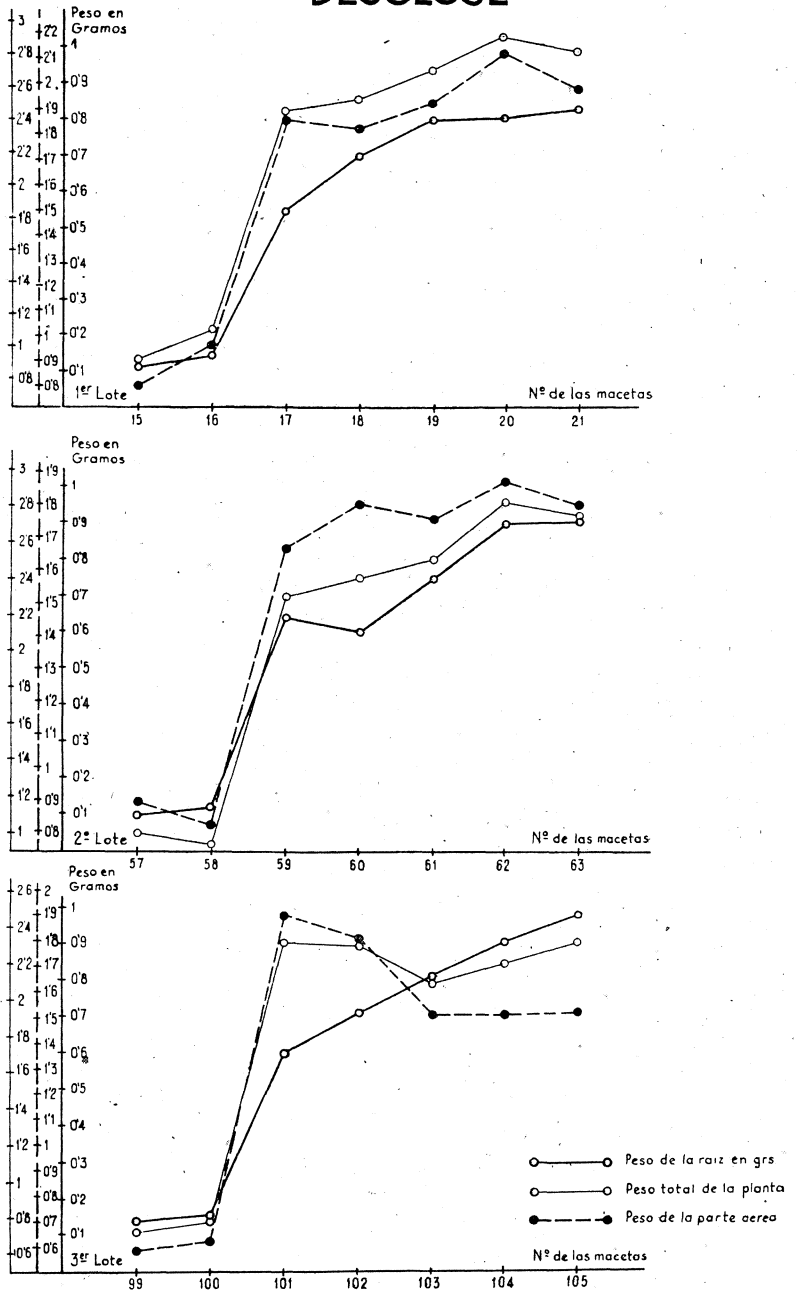
El cuadro de los pesos obtenidos, separadamente de raíces y parte aérea, es el que sigue:

Planta de la maceta	Peso de la raíz Grs.	Peso de la parte aérea Grs.	Peso total de la planta Grs.
15	0,120	0,800	0,920
16	0,150	0,950	1,100
17	0,550	1,850	2,400
18	0,700	1,800	2,500
19	0,800	1,900	2,700
20	0,800	2,100	2,900
21	0,825	1,975	2,800
57	0,100	0,900	1,000
58	0,120	0,800	0,920
59	0,650	1,650	2,300
60	0,600	1,800	2,400
61	0,750	1,750	2,500
62	0,900	1,900	2,800
63	0,900	1,800	2,700
99	0,140	0,600	0,740
100	0,160	0,640	0,800
101	0,600	1,900	2,500
102	0,700	1,800	2,500
103	0,800	1,500	2,300
104	0,900	1,500	2,400
105	0,980	1,520	2,500

A continuación figuran los gráficos representativos de la diferencia de peso en las plantas; el primero comprendiendo las tres series, y otros desglosando estos pesos para cada una de ellas:


PESO DE LAS PLANTAS
Peso en gramos
Peso de la raiz en gramos
Macetas de la 15 a la 21
» 57 » 63
» 99 » 105
Peso de la parte aerea
Macetas de la 15 a la 21
» 57 » 63
» 99 » 105
Peso total de la planta
Macetas de la 15 a la 21
» 57 » 63
» 99 » 105
Nº de las macetas
15 57 99
SIN INOCULAR
16 58 100
INOCULADO RADIOBACTER
17 59 101
INOCULADO RHIZOBIUM. 28-63
18 60 102
INOCULADO RHIZOBIUM VICIA 1113 FEB
19 61 103
INOCULADO RHIZOBIUM VICIA 1113 JUN
20 62 104
INOCULADO RHIZOBIUM PISUM 93 FEB
21 63 105
INOCULADO RHIZOBIUM PISUM 93 JUN

PESO DE LAS PLANTAS
-DESGLOSE-



Una vez pesadas las plantas, ya desecadas, se pulverizaron para determinar el Nitrógeno en el conjunto de raíz y parte aérea.

Los resultados de los análisis efectuados se exponen en las tablas siguientes y en las gráficas que van a continuación:

VALORES DE NITRÓGENO DE CADA SERIE.

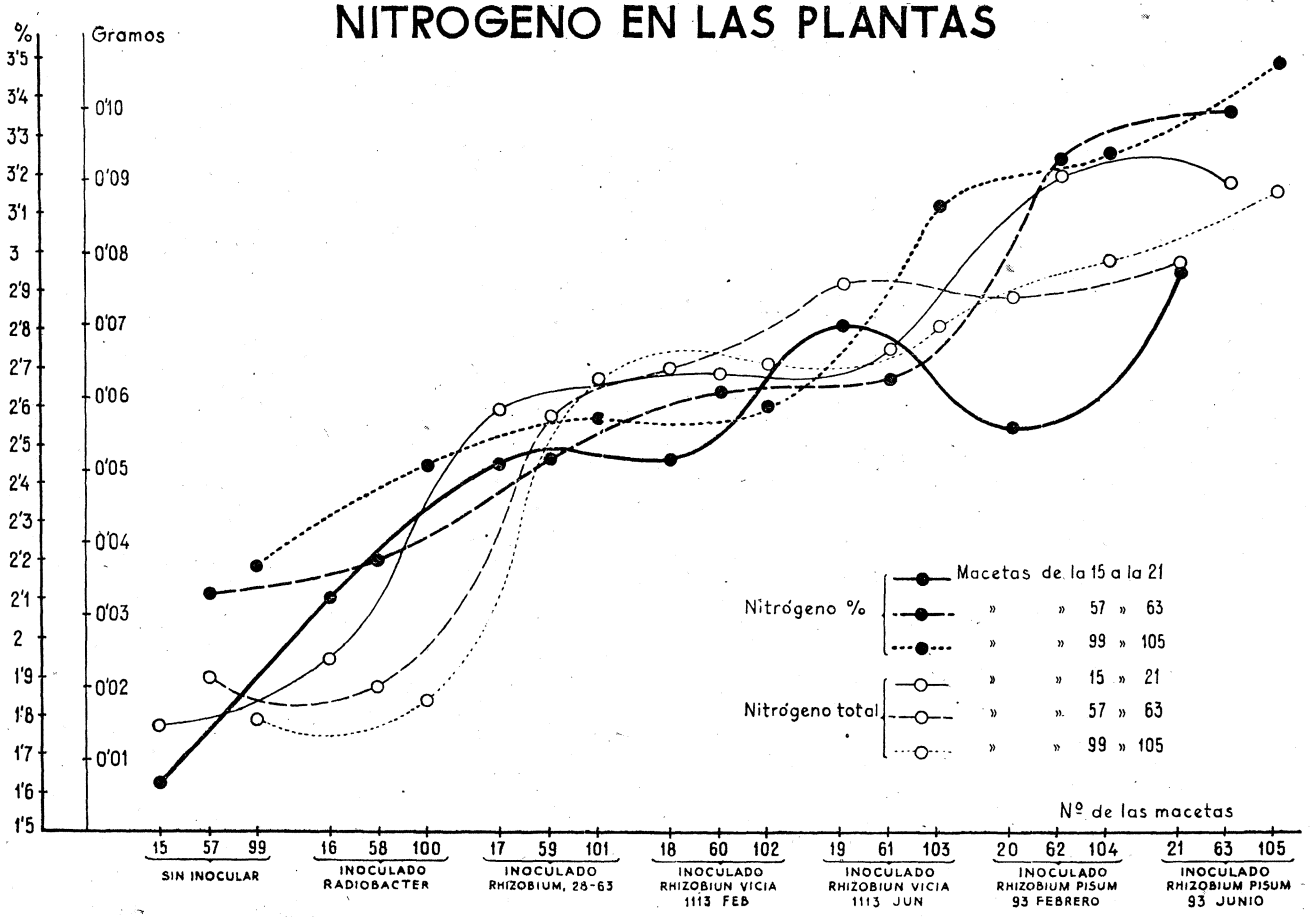
Planta de la maceta	Nitrógeno por 100	Nitrógeno total Grs.
Número 15	1,64	0,015
16	2,12	0,023
17	2,48	0,059
18	2,48	0,064
19	2,83	0,076
20	2,54	0,073
21	2,95	0,078
57	2,12	0,021
58	2,18	0,020
59	2,48	0,057
60	2,66	0,063
61	2,66	0,066
62	3,25	0,091
63	3,37	0,090
99	2,18	0,016
100	2,48	0,019
101	2,59	0,063
102	2,60	0,065.
103	3,13	0,071
104	3,25	0,078
105	3,49	0,087

VALORES MEDIOS DE NITRÓGENO DE LAS TRES SERIES

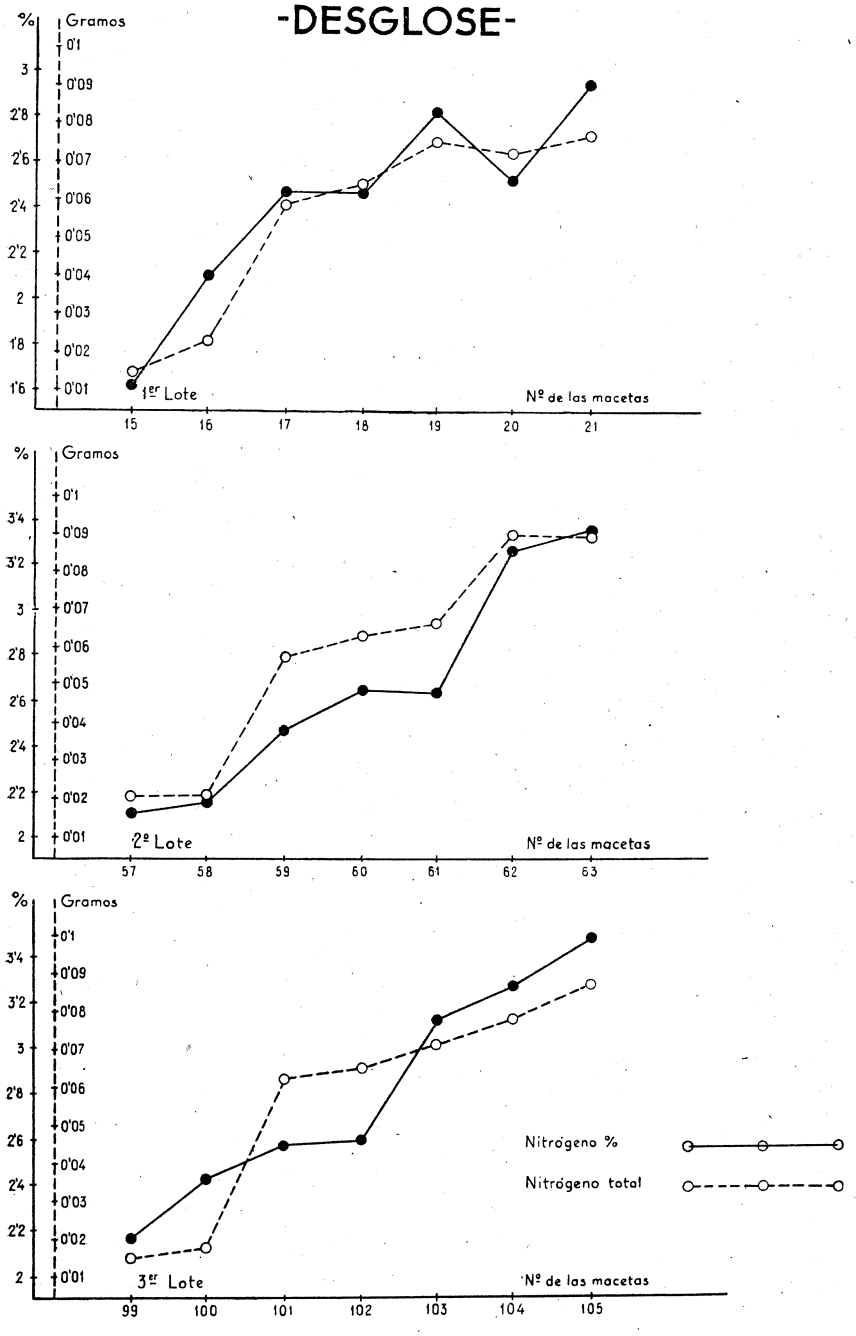
Macetas	Nitrógeno — Gramos	Media — Mgrs.
15-57- 99	0,015 - 0,021 - 0,016	17,3
16-58-100	0,023 - 0,020 - 0,019	20,6
17-59-101	0,059 - 0,057 - 0,063	59,6
19-60-102	0,064 - 0,063 - 0,065	64,0
19-61-103	0,076 - 0,066 - 0,071	74,3
20-62-104	0,073 - 0,091 - 0,078	80,6
21-63-105	0,078 - 0,090 - 0,087	81,6

A continuación se expresan estos resultados gráficamente, en total para las tres series, y por separado cada una de éstas:

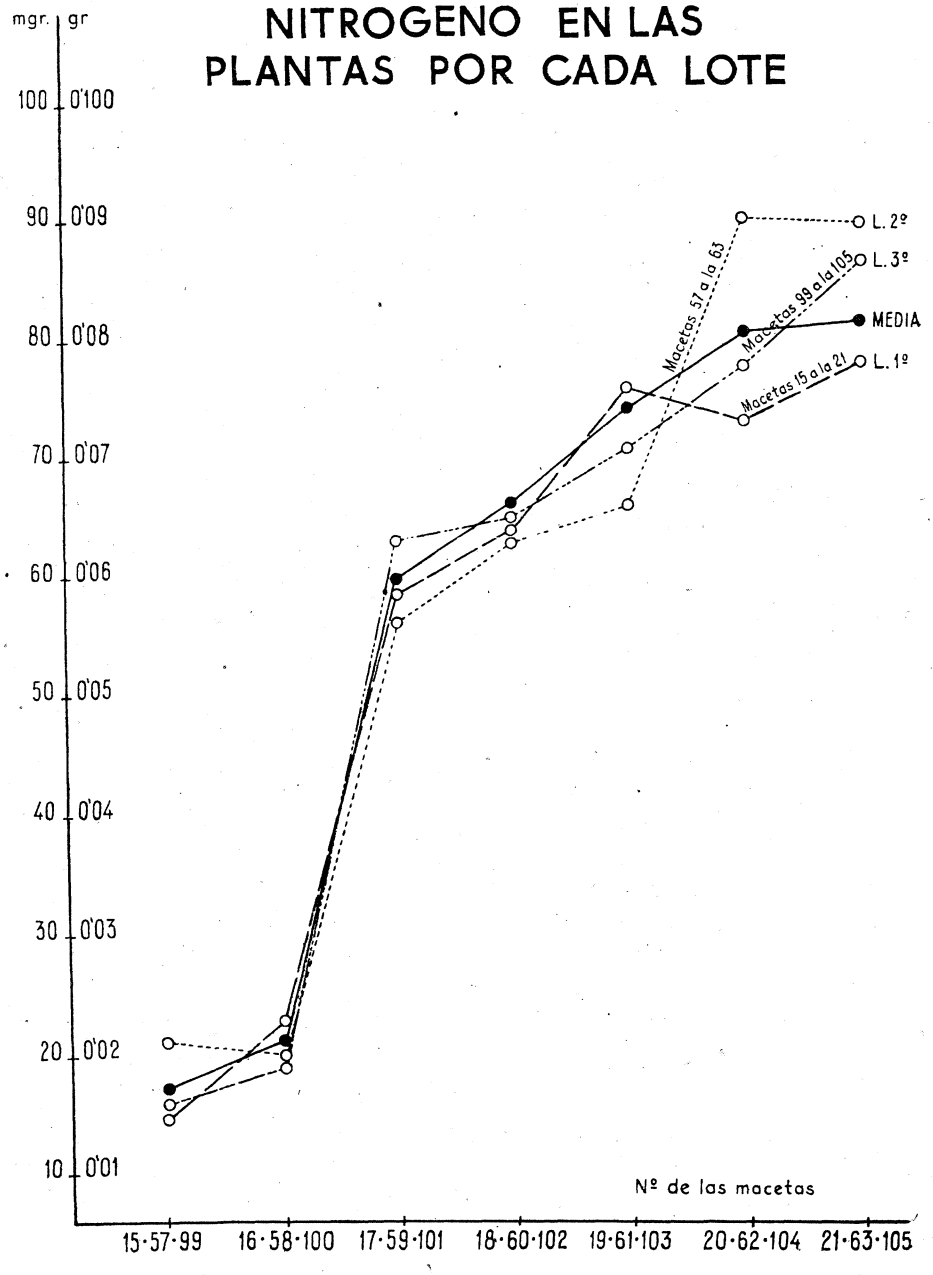
NITROGENO EN LAS PLANTAS



NITROGENO EN LAS PLANTAS
-DESGLOSE-



NITROGENO EN LAS PLANTAS POR CADA LOTE

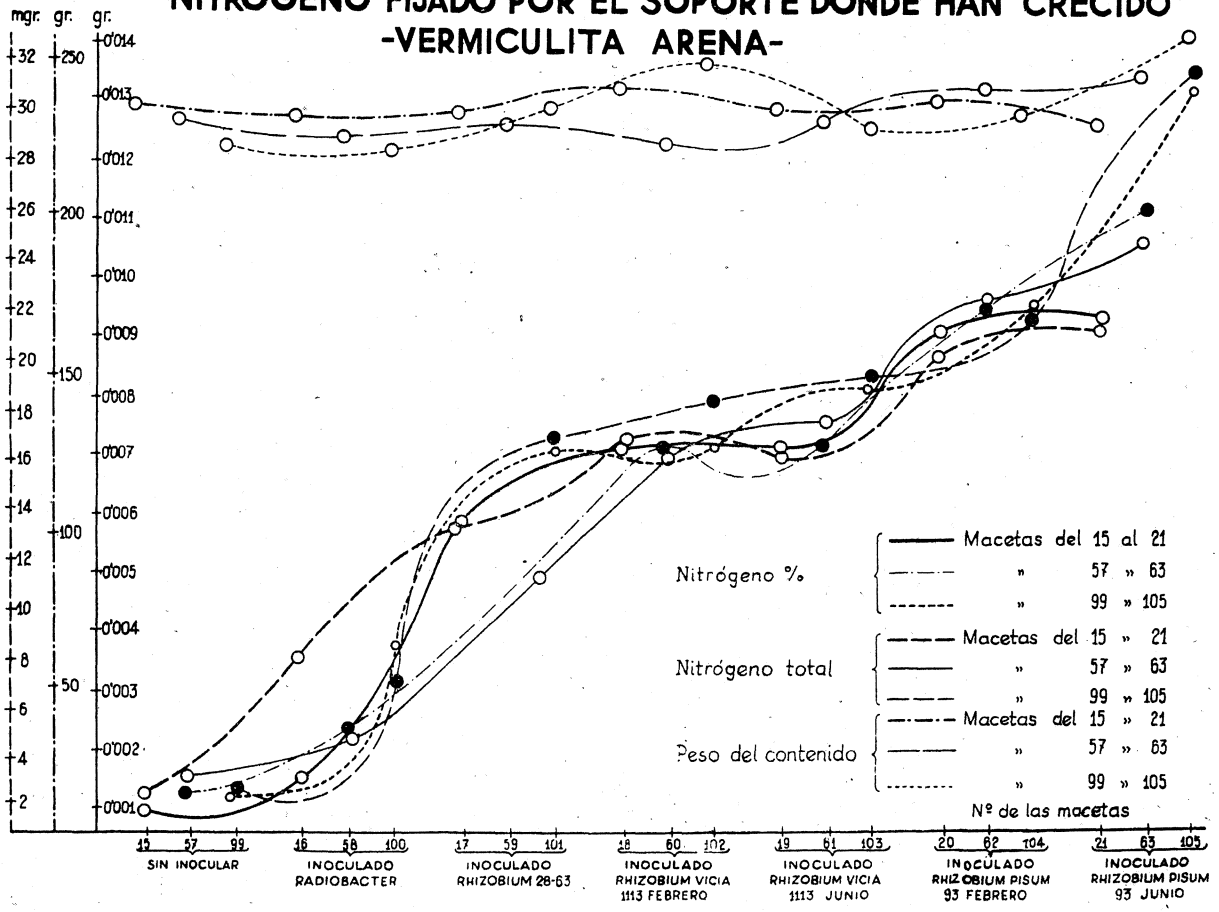


Se determinó el enriquecimiento del contenido de las macetas donde han crecido las plantas (vermiculita-arena), y en la siguiente tabla se dan las cantidades de N. por 100, y referidas al peso del contenido de la maceta, se obtiene el N fijado.

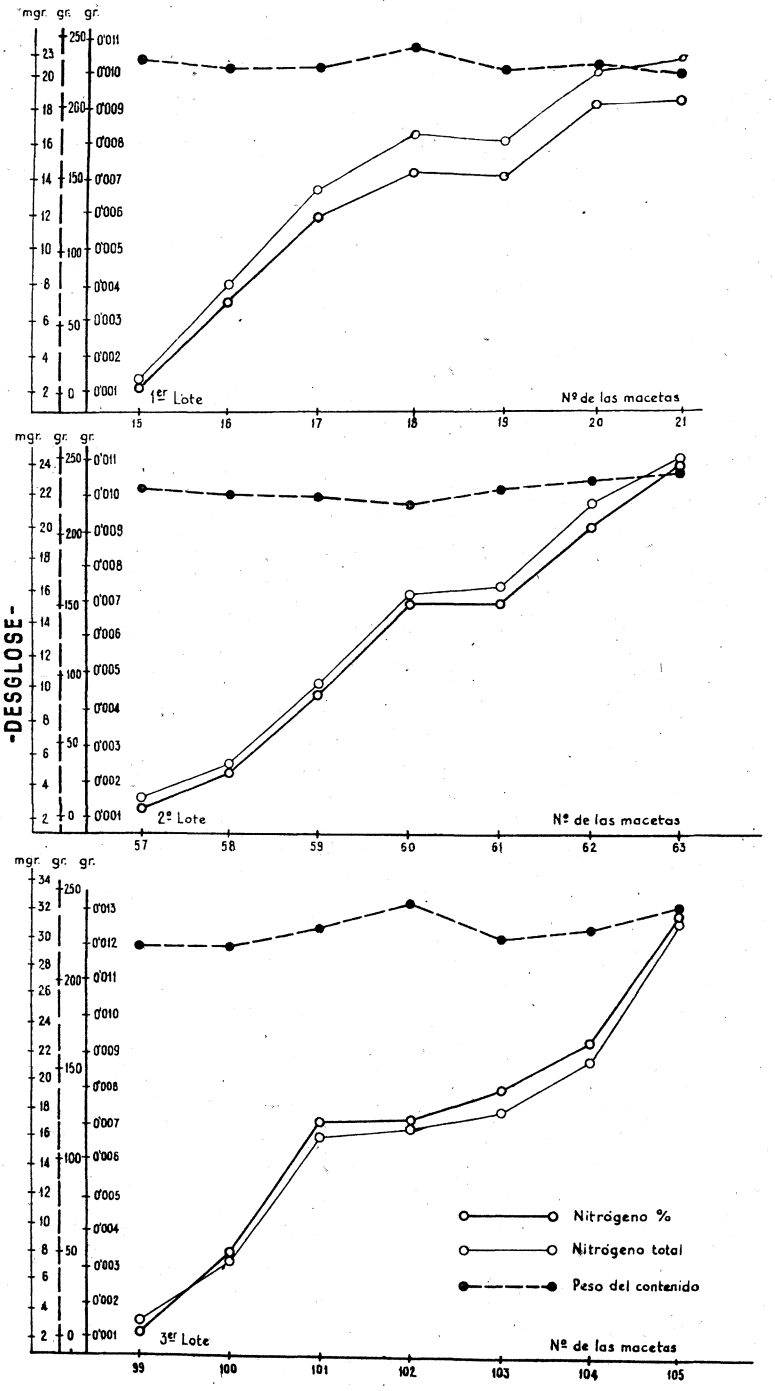
Maceta	Nitrógeno por 100 — Gramos	Peso del contenido — Gramos	N.º total — Mg.
15	0,0010	235	2,35
16	0,0035	230	8,05
17	0,0059	230	13,57
18	0,0071	238	16,89
19	0,0071	230	16,33
20	0,0091	233	20,20
21	0,0093	225	20,95
57	0,0013	230	2,99
58	0,0023	225	5,17
59	0,0046	225	10,35
60	0,0071	220	15,62
61	0,0071	230	16,33
62	0,0093	235	21,80
63	0,0110	240	24,40
99	0,0012	220	2,64
100	0,0035	220	7,70
101	0,0071	230	16,33
102	0,0071	245	17,39
103	0,0080	225	18,00
104	0,0093	230	21,38
105	0,0130	240	31,20

La interpretación gráfica de este cuadro también se expone a continuación:

NITROGENO FIJADO POR EL SOPORTE DONDE HAN CRECIDO
-VERMICULITA ARENA-



NITROGENO FIJADO POR EL SOPORTE DONDE HAN CRECIDO
VERMICULITA ARENA
-DESGLOSE-



CONSIDERACIONES

Por el resultado global obtenido, se hace bien patente que en las macetas inoculadas con gérmenes aislados de sus respectivas plantas leguminosas específicas, por la técnica de aplastamiento de los nódulos, sólo se obtienen estirpes infectivas, o sea, verdaderos rizobios, en menos de un 50 por 100, y ausencia infectiva en el resto, debido a que el germen inoculante no es infectivo por tratarse de radiobacter, hecho corroborado después, por completa identificación bacteriológica. También refiriéndonos al bloque total del experimento señalamos la ausencia total de nodulación en las tres series del lote correspondiente al Lupinus, y al haber empleado estirpes con caracteres bacteriológicos determinados, se podrá, en sucesivas investigaciones, juzgar de la influencia de algunos de estos caracteres en la inhibición del poder infectivo o virulencia (véase el cuadro correspondiente a Rhizobium lupini, estirpes 1115 y 1215). Obsérvese que estas estirpes han sido aisladas de raíces encasamente noduladas, y de nódulos situados en la parte inferior de la raíz; además se ve que el comportamiento al Gram es variable en las dos estirpes, y ambas presentan fuerte reducción de los nitratos, aunque no en tal grado que éstos desaparezcan del medio.

El empleo de estas estirpes con los mismos caracteres, o de otras, en que existan unos y falten otros, será muy útil para tratar de hallar si existe alguna relación entre algunos de estos caracteres y la inhibición del poder infectivo de los Rhizobium.

Creemos que estas estirpes no nodulantes son tales Rhizobium y no Agrobacterium radiobacter, porque los caracteres típicos de este último, tales como colonias grandes pigmentadas en el centro cuando se cultiva en medio con cristal violeta, o pardeamiento del medio con glicerofosfato, o el crecimiento a pH alto en caldo 79 M, no los presentan las estirpes empleadas.

Respecto a las macetas de los lotes de Soja, como dichos gérmenes no han sido aislados en este laboratorio, desconocemos su antigüedad, aunque en la identificación hecha se encuentra también un comportamiento variable al Gram, y reducción fuerte de los nitratos.

Los lotes correspondientes a Trifolium, Phaseolus y Medicago, ya se ha dicho que se muestran en cuanto a nodulación y crecimiento de acuerdo con los caracteres de inóculo que llevan y seña-

laremos que, en el lote de Medicago, las macetas inoculadas con gérmenes aislados de nódulos de raíz de alfalfa, sin la práctica de seccionarlos, resultan no infectivos para las tres series de este lote, con lo que se corrobora que algunas veces pueden obtenerse un cien por cien de gérmenes que no son genuinos Rhizobium.

El resumen de resultados obtenidos en el lote de Pisum, a la vista de los cuadros y gráficas expuestos anteriormente, son los siguientes:

El número de nódulos, salvo ligeras variaciones, no parece estar muy influído por la antigüedad de la resiembra, ni por pertenecer la estirpe inoculante a la especie de la planta inoculada (Pisum), o bien sólo a su grupo de inoculación cruzada (Vicia).

El desarrollo o crecimiento de las plantas es incrementado por la nodulación en todas las que lo fueron con gérmenes infectivos, pero también es prácticamente independiente de la edad de las resiembras y de la especificidad absoluta, o sólo de grupo, de bacteria y leguminosa.

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, los pesos de las plantas desecadas también son prácticamente iguales para todas las noduladas con estirpes infectivas, con gran diferencia a las no noduladas, llegando éste a ser en algunas hasta de tres veces superior en las inoculadas con Rhizobium que las no inoculadas (testigos) o inoculadas con germen avirulento (Radiobacter).

Por el contrario, las curvas de nitrógeno por 100 que contienen las plantas muestran notable diferencia, beneficiándose más las inoculadas con estirpes recientemente resembradas y, dentro de éstas, las de completa correlación de grupo y especie.

Como consecuencia de estas diferencias de nitrógeno por 100 o relativo, aún con pesos de plantas prácticamente iguales, las cantidades de N total en las plantas resultan lo suficientemente claras para establecer las diferencias de nitrógeno fijado.

El nitrógeno contenido en el soporte donde las plantas han crecido también presenta, según el examen de los gráficos y cuadros correspondientes, iguales diferencias, mostrando un incremento paralelo al nitrógeno de las plantas, o sea con relación a la edad de la resiembra y a su absoluta especificidad con la leguminosa.

Aunque no muy notable, se encuentra también diferencia en el nitrógeno del lote que ha permanecido más tiempo en contacto con las raíces, y las que lo estuvieron sólo durante el crecimiento.

Se observará que el soporte donde han crecido las plantas no inoculadas o testigos, y las que fueron inoculadas con gérmenes que resultaron no ser Rhizobium, es decir, de todas las no noduladas, se encuentra también alguna de nitrógeno, hecho explicable, porque aunque se ha procurado al principio del experimento trabajar en condiciones de uniformidad y esterilidad para todas las macetas, la presencia en el invernadero de otros cultivos o experimentos, fumigaciones de algunos de los componentes de la solución nutritiva u otras interferencias, pueden ser el origen de esa exigua cantidad de nitrógeno que, teóricamente, no debiera existir, pero que aunque estando presente su cantidad no llega a ser ni una tercera parte del de algunas de las macetas inoculadas con Rhizobium.

CONCLUSIONES

1.ª De los resultados de este experimento se deduce que más del 50 por 100 de los casos en que no se logra éxito en la inoculación de semillas (cuando el germen empleado se aisló de nódulo específico, por aplastamiento, es decir, sin seccionar éste y sin seguir completa identificación bacteriológica), es debido a que la batería empleada en la inoculación no es verdadero Rhizobium, sino Agrobacterium radiobacter.

2.ª Aunque, aparentemente, no se aprecian entre las plantas inoculadas con verdaderos Rhizobium diferencias notables de crecimiento, nodulación y peso, existe marcada diferencia para las distintas variantes que integran el experimento en lo que se refiere a la efectividad o fijación del nitrógeno por la planta y por el soporte donde han crecido, encontrándose los valores más altos cuando entre la bacteria inoculante y la planta leguminosa hay completa especificidad, por proceder el Rhizobium de un nódulo de la misma especie que la que se inocula.

3.ª Hay marchitez, escaso crecimiento, ausencia de nódulos y, prácticamente, no fijación de nitrógeno en los testigos no inoculados, o en los inoculados con bacterias que no resultaron ser genuinos Rhizobium; y

4.ª El pase por plantas de Pisum sativum, de distintas estirpes de Rhizobium de su grupo, unifica y exalta algunos de sus caracteres culturales y bioquímicos, tales como la escasa reducción de los

nitratos, menor acción sobre la glucosa y disminución del plazo de crecimiento sobre medio de cultivo, según se desprende del examen y comparación de los cuadros números 3 y 4, estirpes 1.113 y 93 y del cuadro número 10 en sus tres partes.

BIBLIOGRAFIA

ALBRECHT and **McCALLA.** 1937. «A new culture medium for rizobia». **J.Bact.** 33: 80.

ALBRECHT and **McCALLA.** 1937. «Longevity of legume bacteria in water». **J. Am. Soc. Agron.** 29: 76.

ALLEN, O. N., and **BALDWIN.** 1931. «The direct isolation of rhizobia from soil». **J. Am. Soc. Agron.** 23: 28.

ALLEN, O. N., and **BALDWIN.** 1931. «The effectiveness of rhizobia as influenced by passage through hostplant». **Wis Agr. Exta. Sta. Res. Bull.,** pág. 56: 106.

ALLEN, I. O. N. 1950. «Esperiments in Soil Bacteriology».

ALMON, LOIS, and **BALDWIN.** 1933. «The stability of cultures of Rhizobium». **J. Bact.** 26; 229.

ANDERSON. 1929. «El uso de colorantes bacteriostáticos en el aislamiento de Rh. leguminosarum». **Soil Sc.** 28: 305.

APPLEMAN and **SEARS.** 1946. Studies on lyophiled cultures of Rh. leguminosarum». **J. Bact.** 52: 209.

BRYAN. 1938. «Identification of Phitomonas, Azotobacter and Rhizobium or Achromobacter upon initial». **Soil Sc.** 45: 185.

BURTON and **ALLEN** 1949. «Inoculation of crimson clover, with mixtures of rhizobia strains». **Proc. Soil Sci. Soc. Am.** 13: 275.

CABALLERO. «Flora analítica de España».

DEMOLON et **DUNEZ.** 1938. «Symbiose bacterienne et cultures des legumineuses». **Ann. Agron.** 8: 220.

DEMOLON et **DUNEZ.** 1938. «Observations agronomiques sur la simbiose bacterienne des legumineuses». **Comt. red. Acad. Sac. Paris.** 206: 701.

DEMOLON et **DUNEZ.** 1945. «Symbiose bacterienne et phisiologie des leguminoses». **Conte Red. Acad. Sci. Par.** 221: 586.

DEMOLON et **DUNEZ.** 1947. «Observations sur le bactg. du Bacillus radicicola». T. Fourth Intern Cong. Microbiology. Copenhagen, Abstracts of Comunications.

DEMOLON, ROZOWSKA, ROSA et **JACOBELLI, GISELE.** 1950. «Observations biochimiques sur le developpement du Bacterium radicicola (Rizobium leguminosarum). **Compt rend. Acad. Sci. Paris.** 230: 1.015.

DEMOLON. «Conferencia pronunciada en el Instituto de Ingenieros Civiles sobre la simbiosis bacteriana y el cultivo de leguminosas». Madrid.

DUNHAN and **BALDWIN.** 1931. «Double infection of leguminous plants with good and poor strains of rhizobias». **Soil Sc.** 32: 235.

ERDMAN and **BURTON.** 1938. «Strein variation and host specifity of Rh. leguminosarum on new pea varieties». **Proc. Soc. Am. Soil Sc.** 3: 160.

FOOTE Y PETTERSON. 1929. «La fermentación de glucosa y xilosa por las bacterias nodulares». **Soil. Sc.** 28: 249.

FRED, E. B., BALDWIN, I. L., and **McCOY, ELISABETH.** 1932. «Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants».

GEORGI and **ETTINGER.** 1941. «Utilizatio of carbohydrates and sugar acids by the rhizobia». **J. Bact.** 41: 323.

HILDEBRANDT. 1950. «Some important galls and wilts o of plants and the incinting bacteria». **Bact. Rev.** 14: 259.

HOFER. 1935. «Methods for distinguihing between legume bacteria and their most common contaminant». **J. Am. S. Ag.** 27: 228.

HOFER. 1941. «A characterization of Bacterium radiobacter». **J. Bact. 41: 193.**

HOFER, and **BALDWIN.** 1932. «The growth of rhizobia upon rich nitrogenous media». **J. Bact.** 23: 65.

KLECZKOWSKA, NUTMAN and **BOND.** 1944. «Note on the ability of certain strains of Rhizobium from peas und and clover to infect each othe's host plants». **J. Bact.** 48: 673.

LEONARD. 1931. «Bacillus radiobácter in referece to commercia legume inoculanns». **J. Bact.** 21: 35.

REID, FRED and **BALDWIN.** 1935. «The effects storage on rhizobia». **J. Bact.** 29: 75.

INSTITUTO PROVINCIAL DE SANIDAD DE LA CORUÑA
SECCION DE BACTERIOLOGIA

EL ASPECTO ESTRUCTURAL, BIOQUIMICO Y GENETICO DEL BACTERIOFAGO. REVISION DE CONJUNTO. I.

por
Federico Beato y González.

I. INTRODUCCION

En estos últimos años se ha desarrollado una intensa labor investigadora en relación con los virus bacterianos, ya que se han considerado y se consideran como un material de estudio del máximo valor. Aunque el fago y susceptibles bacterias nos abastecen del más simple sistema célula huésped-virus para la investigación del mecanismo de absorción y los innumerables aspectos que el problema nos plantea, las relaciones huésped-virus están muy lejos de ser un proceso de sencillo mecanismo. Muchos fenómenos que han sido observados en el fago y su célula huésped no han podido ser hasta el presente satisfactoriamente explicados y el modo de reproducción del fago queda todavía en el misterio; todo esto significa una falta de conocimientos en relación con la bioquímica celular, con la genética bacteriana del mecanismo de reproducción en los virus y de la inmunidad celular frente a ellos. Un interés verdaderamente notable ha suscitado recientemente el estudio del bacteriófago, y éste ha sido abordado ampliamente en todos sus aspectos. Por todo ello, nos ha parecido sería interesante llevar a cabo una amplia revisión del problema, tan complicado, por una parte, por la enorme riqueza bibliográfica, y por otra, lo mucho que de especulativo hay todavía en él, todo lo cual hace esta revisión poco fácil. El problema se ha enriquecido en estos últimos años con hechos verdaderamente importantes y decisivos, se han aclarado muchos aspectos, tanto en la estructura, como en el metabolismo y genética del fago. Con ello el problema adquiére una categoría de la más alta ca-

lidad científica y pensamos que bien merece la pena de una puesta al día.

Twort (1) describió en 1915 una curiosa modificación degenerativa que había observado en los cultivos de un estafilococo procedente de la linfa de ternero. Logró transmitir esta modificación de un cultivo de organismo susceptible a otro colocando en la superficie de una placa de agar una gota de un filtrado muy diluído, producto de suspensión que hubiera sufrido aquella alteración degenerativa. En 1917, D'Herelle (2) publicó la primera serie de sus observaciones sobre las propiedades líticas de los filtrados de las mezclas de cultivos procedentes de las heces de enfermos afectos de disentería bacilar. Con estos estudios preliminares logró demostrar la presencia de una lisis rápida y generalizada en un cultivo en caldo de b. disentérico cuando éstos se desarrollan activamente, cultivo al cual se había añadido determinada cantidad de filtrado de cultivos mezclados anteriormente. Demostró, además, la transmisión del agente lítico en una larga serie de cultivos de la bacteria suceptible, mediante la adición a cada nuevo cultivo de un filtrado del anterior, después de ocurrida la lisis. Pero si seguimos la historia del desarrollo del bacteriófago, observamos que en aquella época, 1920-29, los investigadores dejaron ya determinada una serie de datos relativos al comportamiento del fago como agente lítico. Atraviesa el filtro que se opone al paso de las bacterias; actúa sobre las bacterias susceptibles de tal forma que determina su lisis, durante la fase del desarrollo bacteriano activo; el agente lítico puede propagarse indefinidamente junto con los cultivos de las bacterias sobre las que actúa; se observó que un agente lítico es más activo contra determinadas especies o tipo de bacterias, o en contra de algunas especies o tipos que están relacionados entre sí; en cambio, con respecto a razas con las cuales no une relación alguna, se muestra falto de acción, es decir, el fago sería muy específico; se observó la aparición de variantes resistentes en el cultivo bacteriano que sufre la lisis; estas variantes, en cambio, suelen ser susceptibles a la acción de otros bacteriófagos.

Las hipótesis en relación con la naturaleza del bacteriófago han sido muy variables. Se habla de la naturaleza ultramicroscópica del virus; de un enzima con poder de crecimiento; de un estado en la vida de las bacterias; de un enzima producido por el mismo germen que conduciría a su propia destrucción y la producción de más enzima. Para Twort, el material era producido por el germen. Para D'Herelle, el fago es un

parásito, un virus que parasita las bacterias, se desarrolla y las lisa. Para otros investigadores, como Gildmeister (3), Otto y Munter (4), Bordet (5), el fago sería producido por las bacterias. En 1922, Bail (6) propone la teoría según la cual el bacteriófago sería producido por el mismo germen. En esa misma época, Lisbonne y Carrere (7) comunican haber obtenido un principio Shiga-fágico, al poner en contacto un coli o Proteus X19 con b. Shiga. Suponían que se había producido como resultado de un antagonismo bacteriano, pero posteriormente fué reconocida la existencia del fago en el coli original, antes de ponerlo en contacto con el b. Shiga. Posteriormente, en el 24, Gildmeister y Herzberg (8) obtuvieron la prueba de que una raza coli 88 conserva su poder lisogénico en ausencia de fago libre. Estos investigadores comprueban cómo algunas colonias de este germen contenían fago y otras no. Bordet (5) estudia muy cuidadosamente los gérmenes de Lisbonne y Carrere y observa que «clones» derivados de una sola célula producían bacteriófagos; prepara un suero frente a este fago y comprueba que la lisogenia era mantenida cuando la bacteria se desarrollaba en presencia de suero antifago. El suero neutralizaba al bacteriófago sin abolir su poder de producción. Ahora bien, la facultad a producción de fago, escribe Bordet (5) en el 25, está inscrita en la herencia de la bacteria, cualidad que es únicamente la continuación de una puramente individual fisiología. La bacteriofagia es una hereditaria malnutrición, una autolisis, una transmisible exageración del fenómeno autolítico, que ya se manifiesta en la misma bacteria normal. El fago contribuiría a la transmisión de determinadas propiedades, pero no sería el productor de ellas. El fago —esto es fundamental— no es nunca segregado, sino liberado por la lisis bacteriana. En el 28, Bordet y Renaux (9) emitieron la avanzada idea de que la bacteria lisogénica podía ser el origen del fago. Pero, como es sabido, y de ello hablaremos más tarde, en una bacteria lisogénica el fago se desarrolla del profago, que es ontogénicamente primitivo, ya que en el ciclo de desarrollo de un fago virulento éste es derivado de su ácido nucleico. Por otra parte, como el fago sólo se desarrolla en el interior de la bacteria, la hipótesis es probablemente de que el material genético del fago o profago no es únicamente primitivo ontogénicamente, sino también filogenéticamente. El profago puede derivarse por mutación del material genético de su actual huésped o de un antecesor. La hipótesis de que el fago sea un residuo de la degradación de un parásito

bacteriano es difícil de aceptar, pues desconocemos la existencia de dicho parásito, si exceptuamos al mismo fago. En el 31 describe Bordet (9a) que el virus invisible de D'Herelle no existe. La acción lítica, a la cual se ha dado el nombre de bacteriófago, representa la exageración patológica de una función que pertenece a la fisiología de la bacteria. Para Bordet la lisis no sería el factor importante en bacteriofagia; la bacteria podría lisar por variadas razones y este fenómeno sería la reproducción de una partícula específica que se multiplica en el interior de la bacteria; aparentemente, ni la herencia bacteriana, ni el poder lisogénico, son concebidos como asociados a específicas partículas dotadas de continuidad genética. La lisis de una bacteria por un fago virulento sería, pues, la exageración de una característica normal, fisiológica, hereditaria. Concebido así el bacteriófago, como el resultado de un proceso normal, exagerado, Bordet admite que el bacteriófago vive y se multiplica mientras produce fago. Por otra parte, Bordet considera que la bacteria lisogénica es capaz de producir un determinado elemento, sin que ello perjudique a la bacteria, es dicir, segregaría bacteriófago, hecho que en la actualidad no es aceptado.

Ahora bien, ¿cómo es perpetuado, producido, liberado? Este problema es abordado en 1929 por Burnet y Mckie (10); estos autores estudian una raza lisogénica de S a l . e n t e r i d i t i s con carácter permanente. La permanencia conduce a asumir la presencia de bacteriófago o de su «anlage» en cada bacteria. ¿Qué es el anlage? Los autores rompen bacterias lisogénicas con un fago extrínseco no relacionado; ninguna partícula infecciosa correspondiente al fago producido por lisogenia era liberada. Cuando un gran número de bacterias lisogénicas eran tratadas con agua destilada, algunos fagos eran liberados, y encontraron que el 0,1 por 100 de las bacterias contenían fago. Estos autores llegaron a la conclusión de que las bacterias lisogénicas contienen en su constitución hereditaria unidades potencialmente capaces de liberar fagos. El principio lítico o su causa (anlage) es un normal constituyente de la bacteria lisogénica. Las unidades bacteriófagos están fisiológicamente coordinadas en la constitución hereditaria de la bacteria. El fago es liberado únicamente si el «anlage» es activado; lo esencial del proceso parece tener lugar enteramente en el interior de la bacteria. Es decir, las bacterias, según Burnet y Mckie, no contienen partículas infecciosas. Ellas liberan fago únicamente bajo la influencia de una acti-

vación. Pero la activación y liberación puede corresponder a dos tipos completamente diferentes de procesos: desenmascaramiento de un preexistente virus en latencia o desarrollo de un fago procedente de algo que no es fago. En 1936, Burnet y Lush (11), investigando un coco lisogénico, observan que cuando el germen era roto por un fago no relacionado, el fago liberado no correspondía a la lisogenia del germen.

En 1928, Wollmann (12), discutiendo la transmisión de las propiedades bacterianas por el medio ambiente, y que él ha considerado como una paraherencia, expresa el punto de vista de que tal transmisión puede ser debida a los genes; así, la naturaleza del futuro principio transformante es predicha. Wollmann comparó el fago con genes letales y determina la existencia de verdaderos virus, que serían gérmenes parásitos extraños a su huésped, y elementos de origen celular capaces de transmitir bien hereditariamente o a través del medio. Estos puntos de vista fueron muy criticados por Bordet y Renaux (9), que hacen notar que si el fago tenía realmente propiedades hereditarias materializadas, resulta muy difícil comprender cómo ellos podían ser responsables de un proceso de lisis. La concepción de Wollmann resultaba entonces muy avanzada y, como más adelante hemos de ver, ha sido recientemente puesta de actualidad, quedando entonces sin aceptar u olvidada. En 1936, Burnet y Lush (11) discuten el origen de la resistencia inducida hacia el fago por la infección con otro fago, observando que el carácter cambiado es transmitido indefinidamente a su descendencia, y hacen notar que el cambio podía venir, bien de una constitución genética alterada de la bacteria o directamente inducida por el asociado fago en cada división. Esta diferencia puede desaparecer si, de acuerdo con la hipótesis de Wollmann, el fago es mirado como un gene reintroducido en el interior de la formación genética del organismo.

Wollmann (13), en un trabajo posterior, defiende con entusiasmo su teoría génica del fago. Descubre la ausencia de partículas infecciosas en la bacteria lisogénica, lisogeniza el b. megatherium con lisocima y ninguna partícula infecciosa es liberada (Wollmann y Wollmann) (14). Según la teoría de éstos, cada bacteria lisogénica produciría un fago en cada división. La teoría del gene ha sido muy fructífera, permitiendo el descubrimiento de la fase no infecciosa en el ciclo de vida del bacteriófago. Los Wollmann (15) observaron que el fago absorbido sobre un bacilo sensitivo, megatherium o subtilis, no era puesto de manifiesto

después de la ruptura de la bacteria por la lisocima, a pesar de que el bacilo infectado es capaz de producir posteriormente fago. Existe fago, dicen, en dos fases distintas: la madura partícula infecciosa y la latente, forma no infecciosa. Años más tarde, Doermann (16) redescubre el fenómeno y desarrolla un preciso y elegante experimento que prueba la corrección de las observaciones de los Wollmann y su interpretación.

La comprobación de la multiplicación del fago en bacterias lisogénicas y no lisogénicas conduce a los Wollmann a la conclusión de ambos: el fago puede estar presente en forma criptofágica. Entre la penetración de un fago y la aparición del fago después de la lisis hay una fase inactiva; las partículas fago no serían las descendientes directas del preexistente fago. El bacteriófago en un b. lisogénico son producidos de estructuras que no son una partícula fago. El bacteriófago no está presente como tal en la bac. lisogénica, sino que es mantenido hereditariamente. Los Wollmann (15) se expresaron en el sentido de que la solución del problema concerniente a la lisogenia habría de venir de experimentos con una sola célula, pero su trabajo fué trágicamente interrumpido en 1943 al ser éstos detenidos en el Instituto Pasteur y deportados a Alemania. Hemos dicho que, ya en el 1929, Burnet y Mckie (10) habían demostrado que únicamente una pequeña proporción de bacterias en la Salmonella lisogénica contenía fagos. Posteriormente, Burnet y Lush (11) llegan a la conclusión de que, probablemente, la liberación de fagos está siempre asociada con la destrucción de la bacteria de la cual es derivado. En 1938, Northrop (17), partiendo de la idea de que algunos virus y fagos son proteínas, inicia el estudio de la kinética de producción del fago, creciendo en poblaciones de bacterias. El aumento en fagos o concentración de virus en presencia de células vivas era considerado en un todo análogo a la formación de enzimas por células, tanto como al crecimiento de los cultivos bacterianos. Más tarde, Lwoff y Gutman (18) utilizan una sola célula lavada de b. megatherium lisogenica, la cual era aislada en microgota, en pequeña contidad de medio, y probada a intervalos de tiempo. Encuentran que la bac. lisogénica podía crecer y dividirse sin liberar fago; la liberación del fago no es necesaria consecuencia de la multiplicación y crecimiento bacteriano. Cuando una sola célula aislada era llevada a dividirse 19 veces, cada bacteria hija aislada daba lugar a un «clone» lisogénico. Como no aparecía liberado el fago, la lisogenia era mantenida en ausencia de fago extrínseco. Cuando microclones de b. me-

gatherium lisogénicos, creciendo en microgotas, son cuidadosa y constantemente vigilados por una razonable longitud de tiempo, la lisis de alguna bacteria puede ser observada. Cuando esto sucede, el fago es encontrado en la gota; alrededor de 100 fagos por bacteria lisada.

Al aumentar nuestros conocimientos de estos agentes, especialmente en los últimos años, se ha hecho evidente que los bacteriófagos son análogos a los virus de las plantas y de los animales. Los fagos serían organismos de dimensiones exiguas que penetran en una bacteria, se reproducen en ella y destruyen finalmente a su huésped, con lo que se origina una generación de nuevos fagos, que hoy se les denomina con frecuencia virus bacterianos. Han sido clasificados, medidos y aislados en grupos, aunque nadie los había visto, ya que sólo recientemente se logró su visualización con ayuda del microscopio electrónico. El descubrimiento del bacteriófago hizo, como bien sabemos, concebir la esperanza de utilizar los virus bacterianos como recurso antibacteriano, lo que, sin embargo, no tuvo realidad.

Ahora bien, mientras que los virus de los vegetales y de los animales se multiplican dentro de las células del organismo multicelular, los fagos actúan sobre organismos unicelulares. Los bacteriólogos participan con los virus de animales y plantas de las siguientes características comunes:

Ellos tienen similar tamaño.

Ellos solamente se reproducen en el interior de una célula viva.

Ellos pueden destruir la célula huésped o pueden continuar su existencia en estado latente.

Su huésped puede ser múltiple o limitado a una sola especie.

Ellos pueden cambiar por mutación o adaptación su especificidad a un determinado huésped.

La presencia de un fago puede ser interferido por otro, con infección.

Son antigénicos, produciendo anticuerpos neutralizantes.

Estas semejanzas son elemento básico para recomendar la investigación del fago, ya que ella puede ayudar al progreso y aclaramiento de muchos problemas que hoy se nos plantean en relación con los virus animales. Por otra parte, estos agentes ofrecen numerosos motivos para un trabajo de investigación; se cultivan de manera fácil y económica en pequeñas o grandes cantidades; se pueden titular muy rápidamente y con relativa precisión; las conducciones para su estudio se pueden vigilar más estrechamente que en los casos que se refieren a tejidos complejos, y, final-

mente, los huéspedes bacterianos y los virus se pueden examinar directamente con el microscopio electrónico.

Pero una pregunta se nos viene a nuestra mente: el bacteriófago ¿es un virus? Los virus han sido definidos por Luria (19) como una unidad exógena, submicroscópica, capaces de multiplicarse en el interior de la célula viva específica. El bacteriófago es formado siempre en el interior de su huésped; él, por tanto, debe ser considerado como endógeno. Cuando el fago es formado en una bacteria lisogénica, entonces puede ser perpetuado en su profago durante años y años. ¿Puede el fago ser descrito como exógeno? Si el profago es filogenéticamente endógeno, el denominado fago moderado producido por una bacteria lisogénica deberá ser descrito como endógeno. Si nosotros ahora enfrentamos el bacteriófago con las células y bacterias comprobamos una serie de diferencias fundamentales; así, si las bacterias contienen ambos tipos de a. nucleico, el DNA (dexosiribonúcleico) y el RNA (a. ribonucleico), el bacteriófago sólo contiene un tipo. Las bacterias se reproducen esencialmente de la totalidad de sus constituyentes, el fago es producido o reproducido de su a. nucleico o del profago (caso de la bact. lisogénica). Las bacterias son capaces de crecer y sufrir la fusión binaria; las partículas fago son incapaces de crecer por fisión. El fago nunca es producido directamente por división de una preexistente partícula fago. Parece ser que los materiales que constituyen el fago no pueden ser replicados entonces en la forma de una partícula fago organizada. Así, pues, las células y bacterias, poseyendo ambos tipos de a. nucleico, no son producidas de un a. nucleico y son capaces de crecer y sufrir fisión binaria. El fago posee únicamente un tipo de a. nucleico, es posiblemente reproducido de un a. nucleico y es incapaz de crecer y sufrir fisión binaria. Por tanto, el fago se diferencia de las bacterias no sólo por su tamaño, sino también, como hemos de ver, por su constitución química y modo de reproducción; serán pequeñas partículas infecciosas, parásitos obligados, algunas veces patógenos. Está claro que un fago virulento como el T2 se conduce como un parásito, mientras que el profago se conduce como un gene.

II. EL BACTERIOFAGO COMO ENTIDAD ESTRUCTURAL

1. Las características físicas de la partícula fago.

a) **Tamaño y morfología.**—Quizá el más inesperado encuentro reciente en virus es su complejidad de forma revelado por el microscopio electrónico (Ruskd) (20), (Luria y Anderson) (21). Los estudios más amplios y completos que en relación a su morfología se han llevado a cabo en la partícula fago, lo han sido en un grupo de virus bacterianos que atacan a un determinado tipo de Esch. coli, raza no móvil designada como B. Siete tipos de virus, denominados T1 a T7, descritos por Demerec y Fano (22), revisados ampliamente por Delbruck (23) (ver cuadro adjunto). Los primeros fagos, visibilizados en 1941 al microscopio electrónico, aprecian una configuración parecida a los espermatozoides o a un renacuajo. Algunos se hallaban libres en el campo visual, otros estaban adheridos a la superficie exterior de las bacterias. Luria, Delbruck y Anderson (24) comprueban que el número de partículas visibles en el lisado es aproximadamente el mismo que el título obtenido por el contaje de las placas. Estos siete virus fueron revisados y estudiados por Delbruck (23), utilizando el microscopio electrónico. Sus características son las siguientes:

T1: Cabeza redonda, 45 a 50 mα de diámetro, de uniforme opacidad, formando una placa de tamaño medio. Cola muy fina, de 150 mα de larga y de 15 mα de gruesa. Aparece a veces ligeramente curvada (trabajos de Wyckoff (25) y Luria y Williams) (26).

T2: Cabeza grande, de 65 por 80 mα, oval o en forma de un vástago corto, con un extremo cónico o redondeado. Forma placa pequeña. Cola recta y fina, 120 mα de largo por 20 mα de gruesa, terminando en una parte más levemente ensanchada. Estructuras oscuras dentro de su cuerpo (trabajos de Hook y colaboradores) (27).

T4 y T6: Son indiferenciables del T2; en los tres son observados «ghosts» en viejas suspensiones y en preparaciones lavadas con agua destilada (ruptura osmótica), y en preparaciones tratadas con hidrato sódico o con vibraciones sónicas o irradiadas con luz ultravioleta (UV). Estos «ghosts» parecen ser membranas vacías.

T5: Cabeza redonda, de 100 mα de diámetro, cola distinta. Forma placas pequeñas.

EL SISTEMA BACTERIOFAGO T

Nombre	Tamaño de placa	Morfología.	Agrupación serológica	Agrupación resistencia cruzada	Período de latencia Minutos	Tamaño de ruptura	Adsorción
T1	Media	Cabeza esférica. Densa. 50 m. α diám.. Tallo 120 m. α.	I	A	13	180	Media
T5	Pequeña	Cabeza esférica. 90 m. α diám. Tallo 70 × 15 m. α.	II	A	40	300	Lenta
T2	Pequeña	Cabeza ovoide, 60 × 80 m. α con interna diferenciación. Tallo 100 × 20 m. α.	III	B	21	120	Rápida
T6	Pequeña	Como T2	III	C	25-5	200 300	Rápida
T4	Pequeña	Como T2	III	D	23-5	300	Rápida
T3	Grande	Esférica, 45 m. α diám.	IV	D	13	300	Media
T7	Grande	Como T3	IV	D	13	300	Media

T3: Cabeza redonda, 45 mμ de diámetro, no contiene cola. Forma placa grande.

T7: Cabeza redonda, no lisa, de 51mμ. La cabeza parece contener una estructura bilobular. Las partículas, sin embargo, parecen ser esencialmente homogéneas, sin material periférico. Cola no visible. Forma placa grande (trabajos de Kerby y colaboradores) (28). Recientemente, Williams y Fraser (29), en sus trabajos sobre morfología del fago T7, han observado con el miscrocopio electrónico dos tipos de cabeza del fago, de aspecto tridimensional, un dodecaedro rómbico y un prisma con extremo bipiramidal. No debemos olvidar que todas las preparaciones vistas en el microscopio electrónico habían sido radicalmente secas. Para Anderson y colaboradores (30), la partícula fago es comparada a una jeringa cuyo bulbo está ligado con el a. dexosiribonucleico (DNA), fácilmente a ser inyectado cuando el extremo se pone en contacto a la célula huésped. Parece ser que el extremo de la cola es precisamente lo que se une a la bacteria, hecho que Anderson (30) ha puesto en evidencia, utilizándose el microscopio electrónico.

b) **Propiedades osmóticas de la partícula fago.**—Cuando es irradiado con UV un concentrado del fago T2, la suspensión se hace viscosa y pierde su característica de dispersar el azul Tyndall, así como su infecciosidad. En el microscopio electrónico tal suspensión así tratada parece contener los denominados «ghosts», o sea partículas de fago de forma y tamaño normal, pero careciendo de estructura interna en la cabeza. De este experimento (Anderson) (31), se obtiene la conclusión de que la cabeza de estos fagos está rodeada de una membrana cuyas estructuras internas son fácilmente alejadas. Los fagos T2, T4 y T6, que aparecen en las microfotografías electrónicas con su membrana, pueden ser desintegradas por el denominado shock osmótico, el cual es producido incubando los virus en una solución 4M NaCl, seguido por una rápida dilución de la suspensión en agua destilada. En el microscopio electrónico pueden ser observadas las partículas fágicas que han perdido su densa estructura interna, en el interior de la membrana de su cabeza. Por otro lado, cuando la concentración salina es gradualmente reducida por sucesivas adiciones de agua, los virus sobreviven. De todo esto se deduce que la membrana de la cabeza de estos virus bacterianos tiene propiedades osmóticas. Estos «ghosts» no contendrían desosipentosa, ya que la partícula infecciosa contiene el 37 por 100 de DNA y se supone que el material tan fácilmente

alejado de la cabeza del fago será fundamentalmente y quizá únicamente el a. nucleico de la partícula. Así, cuando el virus es colocado en solución concentrada de ClNa y posteriormente en agua destilada, se produce un fenómeno análogo al hinchamiento osmótico y hemolisis de los hematíes expuestos a concentraciones reducidas de sal. Sin embargo, ya que la súbita dilución es esencial para la destrucción de la partícula virus, el fenómeno denominado «shock osmótico» resulta distinto del fenómeno hemolisis. En la actualidad no puede ser determinado si el escape del a. nucleico es por la cola o por algún orificio que se origine en la cabeza. Ahora bien, los distintos fagos son heterogéneos con relación a su sensibilidad al shock osmótico; así, las partículas de los fagos T2 y T4 que sobreviven a un inicial shock son más resistentes que los de la población original. Los virus tratados por intensas vibraciones sónicas ejercen el mismo efecto (trabajos de Anderson y colaboradores) (32).

c) **Estabilidad de la partícula fago.**—Muchos son los factores que afectan a la estabilidad de la partícula fago: temperatura, presión, acción química, irradiación y ambiente iónico son las más importantes. En relación a este aspecto del problema, el estudio más detallado ha sido llevado a cabo por Adams (33). Este autor observó que los siete fagos son relativamente estables en caldo. Hasta la temperatura de 50° la inactivación de los fagos es difícilmente mesurable. Por encima de los 50°, la inactivación es clara. Diluídos en soluciones de ClNa, los fagos son inactivados en una mesurable proporción a la temperatura de la habitación. Por ejemplo, a 20° en 0,1N de ClNa, alrededor de un 78 por 100 del fago T7 es inactivado en 60' y a 30° el 95 por 100 de este fago —en dicha solución— es inactivado durante el mismo tiempo. Las proporciones en que el fago es inactivado no son significativamente distintas, si el anión es cloruro, citrato o fosfato. Cuando la concentración del ión Na es aumentada de la 0,1N, la inactivación decrece rápidamente. En una concentración 1N, el fago T5 se estabiliza. La inactivación del fago T5 y la de otros fagos puede ser prevenida por cualquier catión bivalente de más baja concentración que la estabilizante concentración del ión sodio. Se ha demostrado que todo catión metal bivalente tiene un efecto de protección sobre el fago, excepto el plomo y el mercurio. El Ca ejerce un considerable efecto protectivo en una concentración 10^{-4} M. La significación de estos efectos de los cationes sobre la estabilidad del fago no esta bien determinada.

Los efectos del pH sobre la inactivación del fago T5 han sido estudiados por Adams (33), y sobre el T7 por Kerby y colaboradores (28). Entre un pH 5.5 a 7.5 la proporción de inactivación parece ser independiente de la concentración de iones H, pero debajo de 5 y por encima de 9, la inactivación está grandemente acelerada. Los 7 fagos T son rápidamente inactivados con gases líquidos. Esta inactivación es más bien del orden físico que del químico. La proporción de inactivación no es afectada por el gas O, N, o CO_2, que, con la suspensión del fago, es agitado. La kinética de esta inactivación es de primer orden. Esta inactivación puede ser prevenida por la adición de pequeñas cantidades de proteínas, y entre ellas la gelatina es la que ejerce un efecto protector más evidente.

2. *La composición química de la partícula fago.*

El análisis químico de la partícula fago exige su purificación previa, siendo el más simple y utilizable método el de la centrifugación de lisados a baja y alta velocidad, controlada con el microscopio electrónico o por la ultracentrífuga. En todos los virus un contenido de proteínas es encontrado, que va acompañado por la presencia del a. nucleico. El ácido nucleico consiste en una combinación de nucleótidos; cada nucleótido contiene una base de purina o pirimidina, ligada a una molécula de pentosa, que, a su vez, lo está a una de a. fosfórico. La pentosa es una ribosa en los nucleótidos del a. nucleico, derivado de la levadura, y una desosirribosa en el a. nucleico extraído de la glándula tipo. Cada fracción de a. nucleico extraída de cualquier origen contiene o pentosa o desosipentosa, y el componente a. nucleico se denomina a. ribonucleico (RNA) y a. desosiribonucleico (DNA). Dos diferencias fundamentales son:

A. ribonucleico (RNA)	A. desosiribonucleico (DNA)
El azúcar es una pentosa: la d-ribosa (C_5 H_{10} O_5).	El azúcar en una desosipentosa: la d-desosiribosa (C_5 H_{10} O_4).
Los nucleótidos son: guanina y adenina (purina), citosina y uracilo (piridina).	El uracilo es sustituído por su derivado metilado: la timina, y, además, puede contener la 5-metilcitosina.
Se encuentra en el nucleolo y en el citoplasma.	Se localiza en la cromatina nuclear.

Interviene en la síntesis de las proteínas.	Interviene en la mitosis y en la división celular.
Renovación rápida.	Renovación lenta.

Recientemente, Watson y Crick (33a) han propuesto un nuevo esquema estructural para la sal del ác. desosiribonucleico. Dos cordones en espiral estarían enrollados alrededor del mismo eje. Las dos cadenas químicas están mantenidas juntas por bases purina y pirimidina, que, a su vez, estarían apareadas por enlaces H. La estructura es tal, que únicamente los específicos pares adenina-purina y guanina-citosina enlazan. Esto implica que la proporción de las bases en los dos pares es igual a uno. La molécula del DNA es muy grande (peso molecular entre 580.000 y 1.000.000), tiene forma muy alargada y probablemente adapta una configuración en espiral. Parece ser, pues, que el DNA interviene en la mitosis y su función está directamente ligada con la reproducción celular, mientras que el RNA gobierna la síntesis proteica en el citoplasma y determina primariamente los procesos de crecimiento.

Las proteínas de los virus parecen contener la estructura de las proteínas en general; es decir, aminoácidos en cadena formando el polipéptido. En líneas generales, nuestros conocimientos de la estructura de las proteínas y a. nucleicos son demasiado inadecuados para permitirnos una interpretación de las actividades biológicas de una núcleo-proteína, en términos de su estructura química. Un número de proteínas están asociadas con grupos simples de no proteínas (grupos prostéticos) que, algunas veces, son iones metales y, otras, compuestos orgánicos. En las proteínas con actividad enzimática, los grupos prostéticos pueden ser necesarios para su actividad. La unión de la proteína y a. nucleico es todavía materia de controversia. Los enlaces entre los grupos ácidos y básicos del a. nucleico y de la proteína son probablemente intrincados. Es dudoso que nosotros podamos hablar con justificación de núcleo-proteína como entidad química. Sin embargo, a pesar de nuestra ignorancia en relación a la función química de los núcleo-proteínas, algunas ideas sobre su posible papel biológico han sido derivadas de los conocimientos obtenidos de su distribución y relativa cantidad en la materia viva. Las núcleo-proteínas han sido encontradas en los núcleos celulares, en las unidades citoplásmicas, así como en los virus, lo cual hace pensar en su intervención para la formación del nuevo material biológico formado.

Ahora bien, la purificación del fago es relativamente fácil, ya que

los lisados bacterianos no contienen otros elementos de tamaño comparables a las características de la partícula fago. La diferencial centrifugación ha sido principalmente empleada. Los colifagos estudiados están compuestos de cerca de un 50 por 100 de a. nucleico, tipo DNA, y otra mitad de proteína, junto con pequeñas cantidades de RNA y un material lipoide ester soluble. Recientes trabajos, utilizando técnicas de alejamiento de indicios de restos bacterianos por precipitación serológica (trabajos de Cohen y Arbegast) (34), parecen demostrar que tanto los lípidos como el RNA no son esencial constituyente del fago.

Por otra parte, lo complejo de la estructura del fago indica el alto grado de diferenciación que la núcleo-proteína fágica puede exhibir dentro de cada partícula. Recientes trabajos indican que una parte, y posiblemente la totalidad de la proteína de algunos fagos grandes, forman una capa exterior que no participa en la reproducción del fago (trabajos de Hershey y Chase) (35). Además, la cuantitativa composición de un bacteriófago parece que varía con el medio en que la bacteria se desarrolla. Por ello, una detallada comparación de las diferencias cuantitativas en su composición entre diferentes fagos no puede ser muy demostrativa, ya que tenemos una falta de conocimientos en relación al posible significado de tales diferencias. Así tenemos que los trabajos de Evans (36) con el T6 obtiene una mayor cantidad de adenina que de guanina, lo contrario de lo observado en la bacteria infectada. La composición aminoácida de la fracción proteínica del fago difiere también de la del huésped. Ya anteriormente, Polsen y Wyckoff (37) comprobaron que el contenido en aminoácidos del T4 era muy semejante al de la célula huésped E. coli; sin embargo, había una clara diferencia en el contenido del RNA, tipo que predominaba en la bacteria.

Ahora bien, una unidad infecciosa purificada y seca, obtenida de un colifago grande, pesa alrededor de 10^{-15} gr., de acuerdo con el peso calculado de la partícula. Esto, sin duda, refleja la alta eficacia de este método de titulación. El contenido en fósforo de una partícula fágica T2 es, aproximadamente, de 5×10^5 átomos por unidad infecciosa, correspondiendo a 2×10^5, 5×10^5 nucleótidos por partícula (trabajos de Hershey y colaboradores) (38). Por otra parte, el DNA de los fagos T2, T4 y T6, del E. coli, contiene una no frecuente pirimidina: la hidrosilmetilcytosina, en lugar de la cytosina (trabajos de Cohen y Wyatt) (39). La nueva pirimidina no ha sido aislada nada más que de estos fagos y pu-

diera representar un único constituyente de ellos. El fago T2 contiene 32,0 moléculas de adenina; 33,2 de tymina; 17,9 de guanina, y 17,0 de el nuevo pirimidina, por 100 moléculas de nucleótidos. Esto representa un notable avance, no solamente en nuestros conocimientos sobre el ácido nucleico, sino también en la realización del grado de especificidad del proceso químico, que es afectado en la síntesis del virus, y nos dice hasta qué nivel un virus infectante puede actuar sobre la maquinaria sintética de la célula bacteriana; pero sobre esto hemos de insistir más ampliamente en otra parte de esta revisión.

En relación a la composición química de los «ghosts», los recientes trabajos de Herriott (40) demuestran que contienen indicios de pH y cerca de 3,5 a 4 por 100 de triptofano y escasa tirosina. La solución de tirosina causa un marcado decrecimiento en las propiedades líticas de los «ghosts», pero la desosiribonucleasa no ejerce efecto alguno. Todo esto indica que el a. nucleico y otras posibles estructuras de este virus no son esenciales para la específica absorción y para la lisis del huésped. Esto limita el sitio donde radicarían dichas propiedades, que sería en la porción proteína del virus. Por último, hemos de hacer resaltar la ausencia de polisacárido en los fagos estudiados, especialmente en el T2, estudio llevado a cabo por Hook y colaboradores (27). Es notable este hecho en virus de relativa y compleja estructura y ello aumenta la significación de la clasificación serológica de los fagos. Es bien sabido cómo reacciones cruzadas anormales y sin sentido son debidas a similares polisacáridos antígenos, que pueden estar ampliamente distribuídos sin plan alguno en animales, plantas y bacterias. Otras tentativas a fin de identificar compuestos de fago han sido realizadas utilizando análisis enzimáticos. Así la desosiribonucleasa no inactiva los virus bacterianos aunque aleja parte del a. nucleico. Muchos virus bacterianos son resistentes a todos los enzimas ensayados (trabajos de Kalmanzon y Bronfenbrenner) (41).

3. El bacteriófago como antígeno.

Si, como es bien sabido, las propiedades específicas de los virus, ya estén en estado extracelular como intracelular, dependen fundamentalmente de su estructura química y de la organización del material virus, los métodos serológicos serán un medio precioso para el estudio de los virus. Sabemos cómo la presente metodología de la físico-química y quí-

mica de las proteínas, incluyendo análisis elementales y de aminoácidos, difusión, sedimentación, medida de absorción de la luz y la electroforesis, nos dice muy poco acerca de las bases estructurales de la especificidad biológica de las proteínas. Esta especificidad puede depender de detalles de organización y plegamiento de la cadena polipéptida, detalles que desaparecen en el curso del análisis químico y que no son revelados por los métodos físico-químicos. Los análisis serológicos representan una técnica mucho más fina. Un antígeno es un reactivo químico capaz de distinguir aquellos detalles de organización de la cual ha de depender su especificidad funcional. Cada virus contiene antígenos específicos distintos de los del huésped sobre el cual él se desarrolla. Los anticuerpos antivirales no solamente permiten el reconocimiento e identificación de un particular virus, sino también el reconocimiento y medida del material virus en el interior del huésped, aunque este material no sea posible extraerlo en estado infeccioso. Los métodos serológicos permiten reconocer semejanzas y diferencias entre las razas de virus. Ello nos da un muy útil criterio para la clasificación de los virus y nos abastece de una muy valiosa información epidemiológica. Como es bien sabido, cuando un antígeno es mezclado con su homólogo antisuero, las reacciones observadas dependen de las propiedades físicas del antígeno y de la multiplicidad de las funciones antigénicas que él posee. Los tipos de reacciones antígeno-anticuerpo pueden ser divididos en tres grupos: 1.º Reacciones en que son observados cambios en el estado de dispersión del antígeno, tales son la precipitación o aglutinación. 2.º La reacción de fijación del complemento, en la cual utilizamos un tercer elemento, constituyente normal del suero sanguíneo del cobaya, el complemento. La fijación del complemento queda demostrada con la utilización de un sistema indicado «r», constituído de hematíes de carnero y suero antihematíes de carnero. 3.º El tipo de reacción afecta a cambios en la infecciosidad del virus como resultado de su combinación con el anticuerpo. Esta es la llamada reacción de neutralización. La pérdida de la actividad del virus, como resultado de su combinación con el anticuerpo, sugiere que alguna porción esencia de la partícula virus suspende su funcionamiento al combinarse con el anticuerpo.

Ahora bien, los fagos son generalmente buenos antígenos. En ellos existe una rigurosa autonomía serológica. Algunos bacteriófagos son mejores antígenos que otros. Las reacciones fago-anticuerpo son, en esen-

cia, similares a las observadas en otros sistemas antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos específicos poseen la capacidad de neutralizar o inactivar la actividad del fago cuando el antisuero preparado se mezcla en proporciones adecuadas con él, causa aglutinación o precipitación de los elementos reaccionantes. Dos fagos activos sobre la misma bacteria son, con frecuencia, serológicamente distintos. El suero antifago, previamente agotado por la bacteria huésped, retiene su plena actividad hacia el fago, con el cual el suero fué preparado. En ningún caso los fagos están relacionados serológicamente con la bacteria huésped. La especificidad serológica es muy constante en los bacteriófagos; las reacciones serológicas revelan agrupamiento e individuos aislados entre los virus que actúan sobre los mismos huéspedes o huéspedes afines. Por ejemplo, los siete fagos de la serie T ha sido observado que pertenecen a cuatro grupos serológicos distintos: T1, T2 T4 T6, T3 T7, T5. Los anticuerpos frente al T2 neutralizan al T2 más que al T4 y T6, pero tienen alguna acción sobre los tres. El antisuero T4 neutraliza al T4 en forma más intensa que al T2 y T6. Si el antisuero T2 es absorbido con T4, aleja una gran parte del título anticuerpo; sin embargo, le queda todavía un resto que reacciona con el T2, pero escasamente con el T4 y T6. Esto prueba que el T4 y T6 tienen un componente antigénico común con el T2. Por contraste, el T2 y T6 son fácilmente distinguidos al ser probados con su antisuero correspondiente. Todo esto nos desmuestra cómo lo mismo que en los gérmenes y en los tejidos los virus contienen antígenos específicos tipo y específico de grupo.

Las reacciones cruzadas generalmente se presentan únicamente entre los bacteriófagos que son similares en otras características, como, por ejemplo, en morfología. Por ello, la serología nos da una conveniente base para la clasificación del fago. Así vemos que por la reacción inmunológica el T1 y T5 no guardan relación el uno con el otro, ni con los otros miembros del grupo T2, T4, T6 y los mismos con el T3 y T7. Lo interesante es que estas diferencias y semejanzas tienen paralelo en la morfología de los fagos. El T2, T4, T6 tienen forma de raqueta y son morfológicamente idénticos. T3 y T7 son esféricos y no tienen cola. El T1 y T5 tienen cola, pero las cabezas son esféricas y de muy diferentes tamaños. Se hace notar cómo dos métodos de clasificación independientes, el morfológico y serológico, dividen los siete virus del coli B en los mismos cuatro grupos. Esto nos demuestra la bondad y calidad de estos métodos de clasificación.

Es interesante comparar el agrupamiento por reacciones serológicas con el agrupamiento según resistencia cruzada. Las reacciones indicadas por las dos propiedades no se corresponden, indicando que la resistencia cruzada no proporciona base para demostrar las relaciones naturales entre fagos. La reacción de aglutinación puede ser observada utilizando concentradas suspensiones de fagos, particularmente si él es una partícula grande. La reacción de neutralización es la más importante, especialmente porque los métodos de titulación del fago permiten precisos estudios cuantitativos del proceso de neutralización. Cuando se mezcla fago con suero inmune, se reduce el número de partículas activas, según se determina por titulación; la reducción es proporcional a la potencia del antisuero, pero independiente del total volumen del fago (ley de porcentaje de Andrew y Elford) (42). Esta ley se mantiene verdadera en tanto que la cantidad de fago presente es pequeña, comparada con la del anticuerpo. Otro segundo hecho fundamental es que la neutralización específica del fago por su antisuero es irreversible. El fago por el suero no es reactivado por dilución. Algunos pueden ser reactivados por vibraciones sónicas (trabajo de Anderson y Doerman) (43) y por tratamiento del complejo con papaína (Kalmanzon y Bronfenbrenner) (41); esto indica que la partícula fago está revestida por el anticuerpo, pero no destruída. La constante proporción de inactivación es una característica de la actividad de un determinado antisuero frente al fago. Un buen antisuero puede inactivar el 99 por 100 de una suspensión de fago, en la dilución 1/100. El antisuero no tiene acción sobre virus absorbidos o que se hallan en el interior de la célula. La presencia del antisuero inhibe vigorosamente la absorción del virus sobre la célula bacteriana. Las partículas residuales del fago, no totalmente inactivadas por el suero, son absorbidas sobre las bacterias a la velocidad corriente y se multiplican como si el suero no estuviera presente. Sin embargo, otras partículas fágicas que sobreviven al tratamiento por el anticuerpo son modificadas. Ellas son absorbidas menos rápidamente por la bacteria sensitiva. Por otra parte, el virus inactivado por el suero, en contraste con el inactivado por la luz UV, no toma parte en el fenómeno de interferencia. Una importante observación es hecha patente por Delbruck (44) al comprobar cómo el anticuerpo-fago no puede prevenir la multiplicación del fago que ya había sido absorbido por la bacteria sensitiva. Resulta imposible eliminar con antisuero el fago que porta en su interior una bacteria lisógena, la cual continuará llevando este fago

latente. También ha sido observado que una partícula fago es capaz de absorber 5.000 moléculas de anticuerpo, pero la obsorción de un promedio de 90 moléculas sería suficiente para suspender la reproducción del fago.

Cuando el fago está parcialmente envuelto por el anticuerpo y, por tanto, no es atacado el lugar crucial, la bacteria no absorbe únicamente el fago, sino que se reproduce. Para explicar estos resultados, Burnet y colaboradores (45) han propuesto la existencia de dos tipos de receptores, sobre el fago, que designaron A y B. Uno para el anticuerpo que se combina con el receptor A, que pueden ser varios cientos. Los anticuerpos no se combinan con los receptores B, que son los responsables de la absorción específica de las partículas fágicas, por la superficie de la bacteria, si bien pueden bloquear en parte esta absorción. Burnet observa que las bacterias muertas con formol y tratadas con fago son aglutinadas por el suero antifago homólogo, pero no por el heterólogo. Esto indica que el fago es todavía capaz de reaccionar con antisuero cuando es absorbido por una bacteria muerta. Tiffany y Rakieten (46) han observado que la absorción del fago por el enterococo es prevenida si la bacteria es previamente puesta en contacto con el suero inmune antes de la adición del fago. Delbruck (44) ha aportado la idea de que el efecto inhibitorio del suero antibacteriano puede ser utilizado para la rápida titulación de tal suero, y ha sugerido que donde el efecto es altamente específico podría ser aplicado a detallados estudios de estructura antigénica bacteriana. En determinadas condiciones, un suero antibacteriano puede ser un más eficaz inhibidor de la infección y multiplicación fágica que su suero antifago. Comprueba Delbruck que cuando un fago es absorbido por su célula sensitiva el subsiguiente tratamiento con antisuero no interfirió su multiplicación. El período latente y el volumen de ruptura quedan sin afectar. Este factor ha sido demostrado ser útil, ya que permite estimar la cantidad de fago libre y absorbida. El no absorbido había sido neutralizado por la adición del suero antifago.

Ahora bien, la superficie de la partícula fago es de considerable complejidad. Parece ser un mosaico de dos tipos de moléculas reaccionando específicamente; una es antigénica, y reacciona con su anticuerpo homólogo; la otra reacciona como un anticuerpo frente a determinado elemento existente en la superficie de la bacteria sensible. Esta última, los receptores B, son responsables del eslabón tipo específico en la infección de la

célula, es decir, de la absorción específica. Es bien conocido que el bacteriófago puede ser inactivado por extractos de bacterias que lo absorben específicamente y que la especificidad de muchos fagos está relacionada con la estructura antigénica de la bacteria. Los fagos salmonelas, disentéricos, cólera, estafilococos, ha sido observado que reaccionan específicamente con una superficie específica polisacárida. En otros casos, la especificidad puede estar relacionada con algún otro tipo de antígeno, por ejemplo, con el antígeno Vi o el R o alguna substancia no identificada presente en la superficie de la célula. La actividad inhibitoria del extracto bacteriano es raramente reversible, pero Birie (47) ha comprobado liberación de fago de un b. megatherium muerto por el calor y tratado con lisocima, que hidroliza un carbohidrato de este organismo. Estudios sobre el bloqueo de los receptores A y B por suero antifago o agentes inhibidores de él presentes en extractos de bacterias susceptibles indican que los receptores A y B son muy numerosos y están situados contiguamente. Burnet y Freemann (45) observaron que los receptores B podían ser rápidamente modificados por pasajes de fago a través de razas heterólogas, quedando el carácter antigénico inalterado. El paralelismo frecuente entre estructura antigénica y susceptibilidad al fago tiene su aplicación en los análisis de tipo antigénico. Así, Levine y Frisch (48) descubrieron la existencia en el suipestifer de subgrupos. Rakieten (50) comprueba que organismos del grupo subtilis absorben e inactivan ciertos tipos de fagos estafilocóccicos, y ello estaría relacionado con la capacidad a producir aglutininas para las razas de estafilococos sensitivas al fago. Interesa hacer resaltar que con el empleo del fago como técnica suplementaria en el análisis antigénico su utilización no quedará reducida a obtener lisis del cultivo bacteriano. Las suspensiones de bacterias muertas podrían ser empleadas para la inactivación o absorción del fago en forma cuantitativa. Con ciertos fagos, tales como el tífico Vi, su absorción estaría específicamente relacionada con la presencia de antígeno Vi. En este ejemplo la absorción específica del fago por la bacteria viva no lleva como consecuencia necesaria la lisis del germen. Este paralelismo entre la estructura antigénica y la susceptibilidad del fago no significa que los grupos determinantes antigénicos y los inactivantes sean idénticos. Los fagos específicos Vi de la S. tífica son absorbidos por bacterias desprovistas de demostrable antígeno Vi.

Pero las partículas fago no son exclusivamente los antígenos específi-

cos fago. Lisados de bacteriófago contienen componentes ultrafiltrables, que se combinan específicamente con suero antifago, aun cuando dicho suero haya sido elaborado inyectando al conejo partículas fago purificadas (trabajos de Alexander y Leydi) (51). Estas substancias solubles específicas fago o factores ultrafiltrables son puestos de manifiesto por su poder de reducción de la actividad neutralizante fágica de un suero. Ellos tienen la misma reactividad cruzada serológica que el fago correspondiente. Estos factores tienen un gran interés, ya que pueden representar lo fundamental en la constitución específica del fago y lanzar alguna luz en relación con el proceso de síntesis del fago. Las partículas fágicas inmaduras producidas por las bacterias infectadas en presencia del colorante proflavina, y semejantes a la cabeza del fago vacía, fijan el complemento con suero antifago, pero no se combinan con anticuerpos neutralizantes (trabajos de Luria y colaboradores) (52). Hay, pues, más de un tipo de antígeno en algunos fagos. El antígeno que provoca anticuerpos neutralizantes está aparentemente localizado en la cola del fago, mientras otros antígenos, identificables por la prueba de fijación del complemento, están localizados en la cabeza (trabajos de Lanni) (53). El anticuerpo frente al antígeno de la cabeza no neutraliza el fago. Estas observaciones están de acuerdo con la idea de que la cola del fago representa el órgano de ligazón del fago a la célula huésped, pero sobre esto hemos de insistir más adelante.

Ahora bien, el mecanismo inmunitario que actúa sobre la bacteria es ineficaz frente a un virus situado en el interior de la célula huésped, y puede ser relativamente ineficaz en prevenir la infección de la célula. La célula huésped, sin embargo, puede adquirir una resistencia a la infección por determinados caminos y que en la actualidad han adquirido fundamental importancia, en relación al proceso de inmunidad en virus. La invasión de las células puede ser bloqueada si ella ha sido invadida por una variante capaz de producir una infección latente o por otro virus relacionado con el primero. Este fenómeno es de una importancia biológica fundamental. La interferencia ha sido observada en tres distintos virus animales. En los bacteriófagos fué observado en el año 1942 por Delbruck y Luria (54) y ha sido estudiado con el sistema de agentes T. Los experimentos iniciales se hicieron para saber qué sucedería cuando una mezcla de los fagos T1 y T2 infectaron una sola célula bacteriana. Se prepararon mezclas de estos dos fagos y se añadieron a cultivos del huésped

como el coli B. No se observó diferencia entre la velocidad de absorción de los dos virus cuando estaban juntos o cuando se estudiaron separadamente. Sin embargo, el fago T2 se multiplicó; el T1 fué excluído por completo del proceso de multiplicación. Tal resultado se observó siempre, al menos que el T1 se añadiera a la bacteria más de cuatro minutos antes de la adición del T2. El mismo resultado se observó después de inactivar el T2 con la luz UV. En algunos casos, ningún virus dominó sobre el otro, pero nunca se observó que una bacteria dada liberara ambas clases de fago. En algunas ocasiones se observó un efecto depresor; por ejemplo, el volumen de ruptura del T1 en una mezcla con T2 pudo ser menor que si el T1 fuera el único agente infeccioso presente. Los trabajos de Delbruck (55) parecen demostrar la existencia de un efecto de exclusión mutua; únicamente la primera partícula activa del fago que es absorbida por la bacteria es capaz de multiplicarse intracelularmente. Otras partículas fago, de la misma u otras especies, suficientemente absorbidas, no se multiplican. Se considera la existencia de un cambio en la permeabilidad de la membrana celular que es súbitamente establecido después de que la primera partícula viral ha penetrado en la célula. El efecto depresor de un segundo virus, probablemente absorbido por el huésped, es difícil de explicar. Este efecto es disminuído si suero antifago es añadido después de que el virus ha sido absorbido por la bacteria. Bajas concentraciones de suero antibacteriano pueden también disminuir este efecto depresor, aunque no es capaz de prevenir la absorción del segundo virus; en resumen, cuando una bacteria infectada con fago T1 es superinfectada con fago T2, únicamente el T1 se desarrolla. Viceversa, preestablecido el T2, previene el desarrollo del T1. Este fenómeno ha sido llamado de exclusión mutua. Pero ¿qué sucede cuando un fago virulento es llevado a competir con uno moderado? Weigle y Delbruck (55) inducen el desarrollo del profago en una raza coli K12 (λ) e infectan la bacteria inducida con fago T5; del análisis de las partículas aparece que la producción o maduración del fago λ es bloqueado por el fago T5. También ha sido observado por Jacob (55 b) otro tipo de exclusión entre fagos moderados, denominados 1 y 8 del P. pyocyanea. Después de mezclados, e infectado el huésped, una gran mayoría de bacterias producen fago 1, los menos fago 8, pero ni una sola bacteria produjo jamás ambos fagos. Esto es una cosa de tipo de exclusión mutua o cruzada. Otro fenómeno ha sido

observado por Jacob en el pyocyanea con dos fagos, que, como consecuencia de ser una infección sincrónica, son compatibles y pueden desarrollarse simultáneamente. Si una bacteria en la cual uno de los fagos se ha desarrollado durante 35' a 40' es infectado con el fago heterólogo, ningún fago es producido y la bacteria no se lisa. El mecanismo de este proceso, en virtud del cual un fago puede detener completamente el desarrollo de otro, nos es completamente desconocido.