VOLUMEN 12 JULIO-SEPTIEMBRE 1959 NUMERO 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. I, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

Ejemplar, 40 pesetas. Suscripción, 120 pesetas.

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.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

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, 45 pesetas. Suscripción, 90 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

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

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID, 6 (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

SUMARIO

Páginas

Formación de aldehido acético en la fermentación acetono-butílica, por *V. Callao* y *E. Montoya* 193

Micosis urinarias subordinadas a la presencia de sustancias antibióticas, por *Antonio Portolés* y *Enrique Feduchy* 199

Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. IV. Factores que influyen en la fermentación en sumergido, por *José Luis Malo Echevarría* y *Benito Regueiro Varela* ... 243

Etudes sur la periodicité des types d'echanges gazeux chez une levure: *Kloeckera apiculata (Rees emend. Klöcker)* Janke, par *Fernand Chodat* et *Carlos Ramírez Gómez* 265

Influencia de diversos factores en el desarrollo del virus Herpes simplex en células Hela, por *Carmen Gil Fernández* 297

C. S. I. C.
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN. GRANADA

FORMACION DE ALDEHIDO ACETICO EN LA FERMENTACION ACETONO-BUTILICA *

POR
V. CALLAO y E. MONTOYA

La presencia de acetaldehido y su papel en las fermentaciones butírica y acetono-butílica ha sido muy discutido desde que se inició el estudio de las mismas. Neuberg y Aristein (1921) anunciaron su aislamiento en un proceso fermentativo de esta índole, merced a la conocida técnica de captación por el bisulfito, lo que dio pie a Donker (1926) Kluyver (1931), en unión de otros hechos conocidos, para formular su clásico esquema, en el que atribuye al acetaldehido el papel de compuesto intermediario clave, tanto en la fermentación butírica como en la acetono-butílica. Posteriormente, los trabajos de Johnson y col. (1933) y Bernhauer y Kürschner (1935), que demostraron que el acetaldol es un compuesto tóxico que no puede ser transformado por el *Clostridium acetobutylicum,* hicieron perder actualidad al esquema de Donker, aun cuando los últimos autores citados consiguieron transformar el acetaldehido en butanol mediante dicho germen con un rendimiento del 60 %. De otra parte, los resultados obtenidos por Neuberg y Aristein (1921) no pudieron ser reproducidos por ningún otro investigador, por lo que Peldán (1941) llegó a la conclusión de que el acetaldehido aislado por estos autores tuvo su origen en una contaminación de los cultivos utilizados por gérmenes ajenos a las fermentaciones estudiadas. Por último, los estudios de Werkman y cols. (Wood, Bronwn & Werkman (1945). con C^{13} sobre la bioquímica de la fermentación acetono-butílica, parecen demostrar definitivamente que el acetaldehido no juega ningún papel en la formación de los productos finales de esta fermentación.

(*) Trabajo completo correspondiente a la comunicación presentada al VII Congreso Internacional de Microbiología. Estocolmo, 1958. (Abstracts, p. 400, 23 c.).

No obstante lo antes expuesto, hemos creído interesante investigar la presencia de acetaldehido en la fermentación acetono-butílica, por considerar que, si bien es posible que no intervenga en la formación del alcohol butílico o la acetona, sí es, en cambio, muy probable que actúe como intermediario en la formación del alcohol etílico que se produce en la citada fermentación.

La técnica empleada para aislar el acetaldehido de los mostos en fermentación ha sido la de captación por el oxalato de fenilhidracina (OF), usada con éxito por Bolcato y cols. (Bolcato, Scevola & Bettinetti, 1950; Montoya & Bolcato, 1955) para poner de manifiesto en la fermentación acetono-butílica la presencia de fosfato de triosa, ácido pirúvico y butiraldehido. Los resultados que exponemos a continuación demuestran de manera definitiva la presencia constante del aldehido acético en la fermentación que nos ocupa.

MATERIAL Y METODOS

Organismo.

En todas las experiencias realizadas se ha utilizado el *Clostridium acetobutylicum* (Bergey, 1947), raza núm. 17 de nuestra colección, aislado en 1952 y conservado en tierra estéril; la pureza de este microorganismo se controló cuidadosamente en todas las experiencias realizadas.

Medios de cultivo.

Como medio de desarrollo se ha utilizado mosto de maíz al 3 % (I) y como medio de fermentación mosto de maíz al 5 % (II). Tanto en uno como en otro caso se añade a los mostos el 0,1 % de autolizado de levaduras.

Cultivos experimentales.

A partir de la tierra que contiene las esporas del *Cl. acetobutylicum* se inoculan tubos con 15 c. c. de medio I, que se someten seguidamente a un choque térmico (100° C. uno y medio minutos) y a continuación se incuban. Con los cultivos así obtenidos se inoculan matraces Erlenmeyer de 300 c. c., conteniendo 250 c. c. de medio I, los cuales, después

de dieciocho horas de incubación, sirven a su vez para inocular matraces con 5.000 c. c. de medio II, donde se realizan las experiencias; la anaerobiosis inicial necesaria se consigue haciendo pasar a través del mosto una corriente de anhídrico carbónico estéril. En todos los casos, la temperatura de incubación es de 37° C.

Adición del OF.

Se utiliza una disolución de OF al 0,75 %, cuyo pH se ajusta a 4,5 mediante la adición de hidróxido sódico al 10 %; esta disolución se comienza a añadir al mosto a las 18 - 20 horas de inoculado, o sea cuando el desprendimiento de gas es máximo y el pH ha descendido a alrededor de 4. En total se añaden 8 grs. de OF por cada 5.000 c. c. de mosto, en un intervalo de tiempo comprendido entre cuatro y cinco horas, según las distintas experiencias. Hacia el final de la adición del OF la fermentación suele detenerse.

Recogida de los productos captados.

Una hora después de la última adición de OF, se acidula el mosto con ácido sulfúrico hasta conseguir una concentración del mismo del 3 %, con objeto de liberar los productos captados de su combinación con la fenilhidracina; el mosto así acidificado se filtra con la ayuda de un poco de tierra de infusorios, para separar la masa bacteriana y los restos de maíz, siendo seguidamente destilado. Las primeras fracciones de este destilado se precipitan con una solución sulfúrica de 2,4-dinitrofenilhidracina. El precipitado, formado por las 2,4-dinitrofenilhidrazonas (2,4-DNF) correspondientes a los productos volátiles captados, se lava para eliminar los restos de ácido sulfúrico y se deseca a 60° C.

El precipitado obtenido en la manera descrita está compuesto en su mayor parte por acetona-2.4-DNF, por lo que es conveniente, antes de proceder a la separación de los compuestos que lo integran, eliminar parte del exceso de este producto, lo que se consigue extrayendo el precipitado con una pequeña cantidad de alcohol etílico hirviente que disuelve prácticamente todas las sustancias que acompañan a la acetona-2,4-DNF y sólo una parte de ésta; los productos extraídos se recuperan por evaporación del alcohol.

Separación cromatográfica.

La mezcla de dinitrofenilhidrazonas que se obtiene por el procedimiento descrito se disuelve en bencina (p. e. de 60-100° C.) con el 10 % de acetato de etilo y se cromatografía en una columna de alúmina de Brockmann de 45 cm. de altura y 2,50 cm.^{2} de sección; el desarrollo de la cromatografía se lleva a cabo con bencina-acetato de etilo al 3 %, siendo necesario para obtener una buena separación pasar de 400 a 500 c. c. de esta mezcla.

Una vez desarrollada la cromatografía, las distintas bandas coloreadas se separan mecánicamente y se eluyen con éter sulfúrico. Los productos obtenidos se recuperan por evaporación del éter, se recristalizan en alcohol etílico y se identifican por sus puntos de fusión y curvas de absorción de sus soluciones alcohólicas en el espectro visible.

RESULTADOS

Siguiendo las técnicas antes descritas, en la columna cromatográfica se diferencian, de abajo a arriba, las siguientes bandas o zonas coloreadas.

1.ª Ancha, intensamente coloreada en amarillo, de límites imprecisos; está compuesta por una mezcla de acetona-2,4-DNF y butiraldehido-2,4-DNF.

2.ª Más estrecha que la anterior y coloreada menos intensamente; está compuesta por acetaldehido-2,4-DNF.

3ª. Muy estrecha y con una coloración apenas perceptible; por la pequeñísima cantidad de sustancia que la origina, no ha podido ser analizada convenientemente, pero de las pruebas efectuadas parece deducirse que está compuesta por formaldehido-2,4-DNF.

4.ª Una serie de bandas estrechas, bien delimitadas, de color amarillo, anaranjado y pardo, que contienen compuestos no identificados.

En todas las experiencias realizadas, tanto el número de bandas como sus características fueron constantes.

De acuerdo con lo dicho en el capítulo de técnicas, el acetaldehido-2,4-DNF se aisla eluyendo la banda correspondiente con éter sulfúrico y evaporando seguidamente este disolvente; el residuo se purifica por recristalización en alcohol etílico.

La identificación se llevó a cabo determinando el punto de fusión de los cristales aislados, que resultó ser de 162° C., no observándose variación en el mismo cuando el producto derivado de la fermentación se mezcla con acetaldehido-2,4-DNF sintético. De otra parte, la sustancia aislada disuelta en etanol muestra en el espectro visible un máximo de absorción a 5.580 Å, al igual que el acetaldehido-2,4-DNF sintético.

La cantidad de acetaldehido-2,4-DNF encontrada oscila de 10 a 35 mgrs. por litro de mosto de maíz fermentado, según las distintas experiencias.

DISCUSION

Dado el cuidado con que se ha controlado la pureza de los cultivos de *Cl. acetobutylicum* empleados, no cabe atribuir la producción de acetaldehido a gérmenes ajenos a la fermentación acetono-butílica. Por tanto, es necesario admitir, confirmando así los resultados de Neuberg y Aristein en 1921, que el aldehido acético se produce de una manera constante en la fermentación acetono-butílica y que, por consiguiente, debe intervenir de alguna forma en el mecanismo bioquímico de la misma.

Según dijimos, las últimas investigaciones sobre el mecanismo bioquímico de la fermentación acetono-butílica parecen demostrar que el acetaldehido no juega ningún papel en la formación del butanol y la acetona, por lo que en ausencia de otros datos llegamos a la conclusión de que posiblemente sólo interviene en la producción de alcohol etílico, como intermediario en la reducción del ácido acético.

RESUMEN

Mediante la técnica de captación por el oxalato de fenilhidracina, se ha comprobado la presencia de aldehido acético en los mostos de maíz fermentados por el *Clostridium acetobutylicum*. Los productos captados, precipitados bajo la forma de 2,4-dinotrofenilhidrazonas (2,4-DNF), fueron separados por cromatografía en alúmina de Brockmann, usando bencina-acetato de etilo 3 % como disolvente.

El acetaldehido-2,4-DNF se aisló en cantidades que oscilan entre 10 y 35 mgrs. por litro de mosto fermentado.

En ausencia de otros datos, se presume que el acetaldehido presente en los mostos en fermentación actúa como intermediario en la reducción del ácido acético a alcohol etílico.

SUMMARY

The presence of acetaldehyde in the fermentation of corn mash by *Clostridium acetobutylicum* has been investigated using the phenyhydrazine oxalate trapping technique. The trapped products were precipitated by adition of 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNP), and separated by chromatographic method with Brockmann's alumina, using a 3 % solution of ethyl acetate in benzine as solvent,

The amount of acetaldehyde-2,4-DNP isolated was of about 10 - 35 mg. per liter of fermented mash.

It is presumable that this compound is intermediator in the reduction process of acetic acid to ethyl alcohol.

BIBLIOGRAFIA

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1947. 6 th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

BERNHAUER, K. & KÜRSCHNER, K, 1935. Butyl und Acetongärungen. I.—Über Zwischenprodukte der Butanol-Acetongärung. Biochem. Z., 280, 379.

BOLCATO, V., SCEVOLA, M. E. & BETTINETTI, G. F. 1950. Simultaneous Fixation of trioses and Pyruvic Acid in Butyl Alcohol Fermentation with Living Cells. Arch. Biochem. 29, 291.

DONKER, H. J. L. 1926. Bijdrage tot de kennis der boterzuurbutylalcoholen acetongistingen. Thesis Technische Hoogeschool, Delft.

JOHNSON, M. J., PETERSON, W. H. & FRED, E. B. 1933. Intermediates Products from the Butanol-Acetone Fermentation. J. Biol. Chem., 91, 569.

KLUYVER, A. J. 1931. The Chemical Activities of Micro-organisms. University of London Press, Ltd., London.

MONTOYA, E. & BOLCATO, V. 1955. Isolation of Butyraldehyde in the Butyl Alcohol Fermentation. Naturwiss., 42, 157.

NEUBERG, C. & ARISTEIN, B. 1921. Bolcato, V. 1952. La Chimica delle Fermentazioni. Nicola Zanichelli Editore. Bologna.

PELDÁN, O. 1941. Über den Reaktionsmechanismus der Buttersäuregärung. Biochem. Z., 309, 108.

WOOD, H. G., BROWN, R. W. & WERKMAN, C. H. 1945. Mechanism of the Butyl Alcohol Fermentation with Heavy Carbon, Acetic and Butyric Acids and Acetone. Arch. Biochem., 6, 243.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGÍA
SECCIONES DE BIOLOGÍA BACTERIANA Y MICOLOGÍA

MICOSIS URINARIAS SUBORDINADAS A LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS

POR

ANTONIO PORTOLÉS y ENRIQUE FEDUCHY

Es mayor cada día la aplicación cuali y cuantitativa que de los antibióticos se hace y, asimismo mayor también, el número de publicaciones que —como consecuencia de ello— tratan de micosis post-antibioterapia; ahora bien, estas publicaciones parecen limitarse tan sólo a los casos de *moniliasis* y a estudios que relacionan muy estrechamente la causa con el efecto en cuadros patológicos definidos. Esto nos impulsó a emprender la tarea de ir aislando e identificando especies fúngicas en una serie de orinas que más tarde, a la vista de los resultados, habríamos de clasificar en grupos, para presentar con visión estadística estos datos.

Por otra parte, esta relación levadura-antibiótico no se limita, en nuestro criterio, a una mera consecuencia, sino que, desde un punto de vista microbiológico, ha de tener distintas facetas, como son: *a*), papel de los antibióticos en la detección de micosis; *b*), influencia de estas sustancias en la implantación o aparición de infecciones micóticas, y *c*), significación de estos inhibidores para la biología de las especies fúngicas. Puntos, los tres, que pretendemos examinar por separado en la primera parte experimental.

PARTE EXPERIMENTAL

1. *Estudio general.*

Materiales y métodos.

Las muestras estaban integradas por orinas de personas sanas y enfermas, procedentes de distintos medios hospitalarios y recogidas en las condiciones normales aconsejadas para esta clase de trabajos.

Las técnicas, siempre dentro de las ordinarias para cultivos y clasificación en Micología (seguimos las claves del Lodder), se han modificado en algunas ocasiones de acuerdo con los propósitos de nuestras experiencias; así, la *detección de especies micóticas* se hizo por examen en fresco del sedimento urinario, para ver abundancia de células levaduriformes en relación con otros elementos orgánicos; por frotis teñidos, para comprobar su estado citológico, y por cultivos. El *aislamiento* se practicó sobre medios sólidos que se fueron variando en el transcurso de la experiencia, de acuerdo con la positividad de sus resultados, relacionando las imágenes microscópicas de los sedimentos con los desarrollos obtenidos; su composición básica se indica en el cuadro que sigue a continuación:

CUADRO 1

Composición de los medios-base sobre los que se añadirán los inhibidores.

Gramos o c. c. de sustancias	MEDIOS			
	I	II	III	IV
Sacarosa	—	2	—	—
Glucosa	5	—	2	2
Peptona	3,75	1	1	1
Extracto de malta	—	100	100	100
Glucosamina	—	—	—	1
Glicerina	1,25	—	—	—
Agua	250	—	—	—
Agar	3,75	1,8	1,8	1,8

También, en algunos casos, hemos efectuado el recuento de células viables de levadura mediante centrifugación de 10 c. c. de orina en un tubo graduado a 3.500 r. p. m. durante 20', al cabo de los cuales se retiraron 9 c. c. del líquido sobrenadante y del c. c. restante, previa homogeneización por agitación, sembramos en superficie 0,1 c. c. (= 1 c. c. de orina a concentración original) de las dos últimas diluciones de la escala al 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 sobre medio sólido en placa.

A) *Intervención de los antibióticos en la detección de micosis.*

Hace algún tiempo que se empezaron a usar sustancias antibióticas inhibidoras del crecimiento bacteriano para conseguir cultivos de levaduras libres de contaminación, como un avance positivo frente a los casi ineficaces métodos clásicos de medios a pH ácido: también nosotros, en 1955, utilizamos la penicilina con estos propósitos, aunque más tarde, al resultar ineficaz ésta, comenzamos a emplear antibióticos como la estreptomicina y asociaciones de penicilina-estreptomicina, para pasar después a otros de espectro más amplio, como es la aureomicina, propuesta por Hesseltine y cols. (1952); pero según era lógico, más tarde, al aparecer cepas aureomicin-resistentes y conociendo, además, las discrepancias entre Pappenfort y cols. (1951), Moore (1951) y Huppert y cols. (1953) por una parte y Lopes Netto y cols. (1955), Janke, Marseluo y Segretain, por otra, sobre si esta sustancia podía o no provocar acciones estimulantes "in vitro" en el desarrollo levaduriforme, fue obligado buscar entre el arsenal antibiótico la sustancia o sustancias capaces de proporcionar crecimientos de levaduras libres de bacterias.

Ultimamente, en el estado actual de la evolución hacia la antibiótico-resistencia por parte de las cepas bacterianas más frecuentemente aisladas en orina, y en un intento de buscar el medio más idóneo para el aislamiento de especies micóticas, hemos ensayado diferentes inhibidores, observando, a la vez que su eficacia, la proporcionalidad de gérmenes que se resisten a esta acción bacteriostática, según se indica en los resultados que se resumen en el cuadro 2.

Los inhibidores, a las concentraciones que se indican por c. c. de medio, se agregaron al medio fundido y enfriado a 50° C. en el momento de su utilización.

Sería inútil conceder, dado el número de cepas de cada grupo, un valor absoluto a las cifras %, pero en este caso nos sirven para obtener una imagen relativa de comparación de los resultados para cada antibiótico, con la que es posible calificar el grado de eficacia, que es mayor para la asociación de estreptomicina-cloromicetina.

B) *Aparición de micosis urinarias post-antibioterapia.*

En este apartado nos es posible distinguir tres aspectos de la cuestión, aunque nosotros nos ocupemos tan sólo de su frecuencia y momento de aparición:

1. *En cuanto a su origen,* muy estudiado y discutido últimamente, parecen haber quedado circunscritas a tres las hipótesis fundamentales (Rimbaud y Rioux, 1955) de alergia medicamentosa por una sensibilización local de las mucosas al antibiótico, desequilibrio micótico-bacteriano que permite la exaltación vital de las levaduras y destrucción de la flora con poder vitamino-sintético elevado, que provoca la carencia local o total en riboflavina.

CUADRO 2

Frecuencias en % de contaminaciones positivas, para algunas especies bacterianas crecidas sobre diferentes medios inhibidores.

ESPECIES BACTERIANAS CONTAMINANTES	GRUPO I Para un total de 74 casos					GRUPO II Para un total de 110 casos					GRUPO III Para un total de 128 casos				
	CRECIMIENTOS +				Núm. de casos	CRECIMIENTOS +				Núm. de casos	CRECIMIENTOS +				Núm. de casos
	En número	En %	En número	En %		En número	En %	En número	En %		En número	En %	En número	En %	
Estafilococos...	6	37,5	12	75,0	16	9	25,0	4	11,1	36	0	0,0	1	3,3	30
Difterimorfos, ...	8	80,0	6	60,0	10	6	46,1	7	53,8	13	4	21,0	5	26,3	19
Enterococos	5	33,3	11	73,3	15	4	36,3	3	27,2	11	5	35,6	1	78,5	14
Colibacilos	18	78,2	6	26,0	23	13	37,5	14	35,0	40	2	4,1	1	2,0	48
Proteus	6	85,7	5	71,4	7	6	75,0	1	12,5	8	4	36,3	2	18,1	11
Piocianicos	3	100	3	100	3	2	100	2	100	2	6	100	6	100	6
INHIBIDORES	Penicilina 50 U.		Estrepto-micina 80.			Penic. 20 Estr. 40		Aureomi-cina 40			Clorom. 30 Penic. 15		Clorom. 30 Estrep. 40		
EFICACIA	+		+			++		++			+++		++++		

2. *En cuanto a su frecuencia de aparición,* la hemos estudiado comparativamente estableciendo con las muestras de orina tres grupos así clasificados:

CUADRO 3

Clasificación de las muestras de orina examinadas.

Enfermos tratados por antibióticos		Enfermos no tratados por antibióticos		Personas aparentemente sanas	
Cistitis	Pielonefritis	Diabéticos	Hepáticos	Hombres	Mujeres
132	26	48	7	42	57

Las especies levaduriformes detectadas microscópicamente en el sedimento y aisladas sobre medios sólidos con inhibidores del crecimiento bacteriano, fueron clasificadas y resultaron pertenecer a trece especies diferentes agrupadas en cinco géneros de levaduras, cuyos porcentajes se indicarán más adelante. Por otra parte, a veces, las células de levadura (figs. 1-2-3) alcanzaban un extraordinario desarrollo de la fase pseudomicelial (fig. 3).

Es preciso hacer constar que, en el grupo de enfermos diabéticos micótico-positivos no tratados por antibioterapia, el número de células de levadura observadas microscópicamente al examinar en fresco sus sedimentos de orina, era muy elevado, hasta el punto de que para cerciorarnos hubimos de hacer varios recuentos en placa, con los que obtuvimos valores que oscilaron de 20 a 78 por 10^4 células/c. c. de orina; sin embargo, algunos recuentos efectuados en enfermos sometidos a tratamiento antibiótico nunca alcanzaron valores superiores a 20 por 10^4 células. Esto nos hizo pensar en la influencia de la concentración de azúcar, aunque no pudimos demostrar —comparando los datos del recuento con los de las glucosurias analizadas— proporcionalidad alguna entre ambos.

Los resultados finales de estas frecuencias de aparición y su expresión gráfica se indica en el cuadro y gráfico que sigue:

CUADRO 4

Resumen de los resultados obtenidos.

Cuadros clínicos	Tratamiento antibiótico	Núm. de casos	Micótico-negativos	Micótico-positivos	Especies encontradas
Cistitis.....	Penicilina, penicilina - estreptomicina, aureomicina, terramicina.	131	3	128	86 *C. albicans.* 7 *C. tropicalis.* 7 *Rh. glutinis.* 4 *Rh. rubra.* 3 *Rh. Mucilaginosa.* 8 *T. candida.* 6 *T. versatilis.* 5 *T. famata.* 2 *Cr. albidus.*
Pielonefritis ..	Los mismos que anteriormente, tetraciclina y cloromicetina.	6	8	18 (*)	8 *C. albicans.* 3 *C. tropicalis.* 2 *T. famata.* 1 *T. candida.* 1 *T. versatilis.* 2 *Rh. mucilaginosa.* 1 *Rh. glutinis.* 1 *Cr. Laurentii.*
Diabéticos ...	En el momento del examen no existían.	48	17	31	18 *C. albicans.* 3 *C. tropicalis.* 2 *T. candida.* 1 *T. glabrata.* 1 *T. versatilis.* 1 *Rh. rubra.* 1 *Rh. glutinis.* 1 *C. mycoderma.* 3 *Trich. cutaneus.*
Hepáticos ...	Idem.	7	6	1	
Aparentemente sanos.....	Idem.	57 (H) 42 (M)	78	8 (H) 13 (M)	18 *C. albicans.* 2 *Rh. rubra.* 1 *Rh. glutinis.*

(*) En este grupo existe un caso en el que se aislaron conjuntamente *Cr. Laurentii* y *C. albicans* en el mismo enfermo.

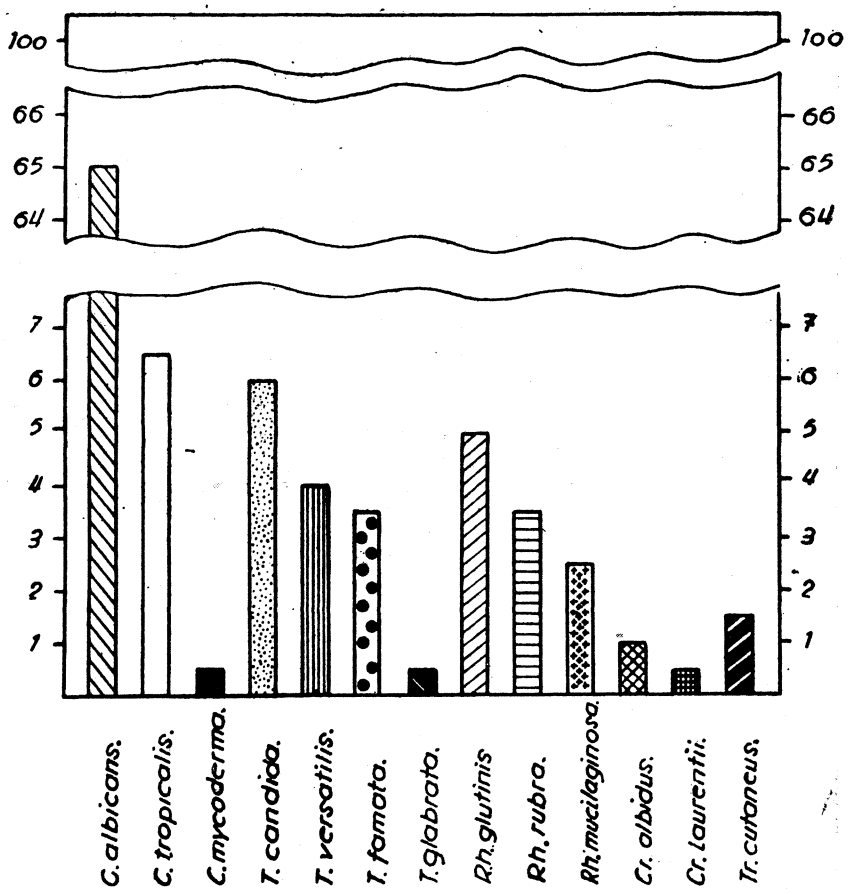

100
66
65
64
7
6
5
4
3
2
1
C. albicans.
C. tropicalis.
C. mycoderma.
T. candida.
T. versatilis.
T. famata.
T. glabrata.
Rh. glutinis
Rh. rubra.
Rh. mucilaginosa.
Cr. albidus.
Cr. laurentii.
Tr. cutaneus.

GRÁFICO A

CUADRO 5

Frecuencias de aparición por especies.

ESPECIES MICOTICAS	Frecuencia en número de casos	
	Típicas	Anormales
Candida albicans	110	20
Candida tropicalis	13	—
Candida mycoderma	1	—
Rhodothorula glutinis	3	7
Rhodothorula rubra	7	—
Rhodothorula mucilaginosa	5	—
Torulopsis candida	12	—
Torulopsis versatilis	—	8
Torulopsis famata	7	—
Torulopsis glabrata	1	—
Cryptococcus albidus	2	—
Cryptococcus Laurentii	1	—
Trichosporum cutaneus	3	—

3. *En cuanto al momento de aparición de estas levaduras,* no hemos encontrado antecedentes, por lo difícil, quizá, de precisar "in vivo" los fenómenos que condicionan el período que media entre la administración de antibióticos y la detección de células micóticas.

Es cierto que son muy distintas las variables que pueden influir (de tipo ecológico, naturaleza y dosis del antibiótico, características de la infección, condiciones del organismo, huésped, etc.); pero a pesar de ello, nosotros, en ocho casos de infección urinaria por especies coliformes en los que pudimos seguir muy de cerca el estudio microbiológico y el tratamiento, detectamos con aceptable exactitud, por exámenes diarios, el momento en que aparecen células de *C. albicans.* Estos datos, que se expresarán en el gráfico B, permiten sacar deducciones, a modo de ensayo, y acerca de alguna de las circunstancias que influyen en el intervalo de aparición de las células micóticas.

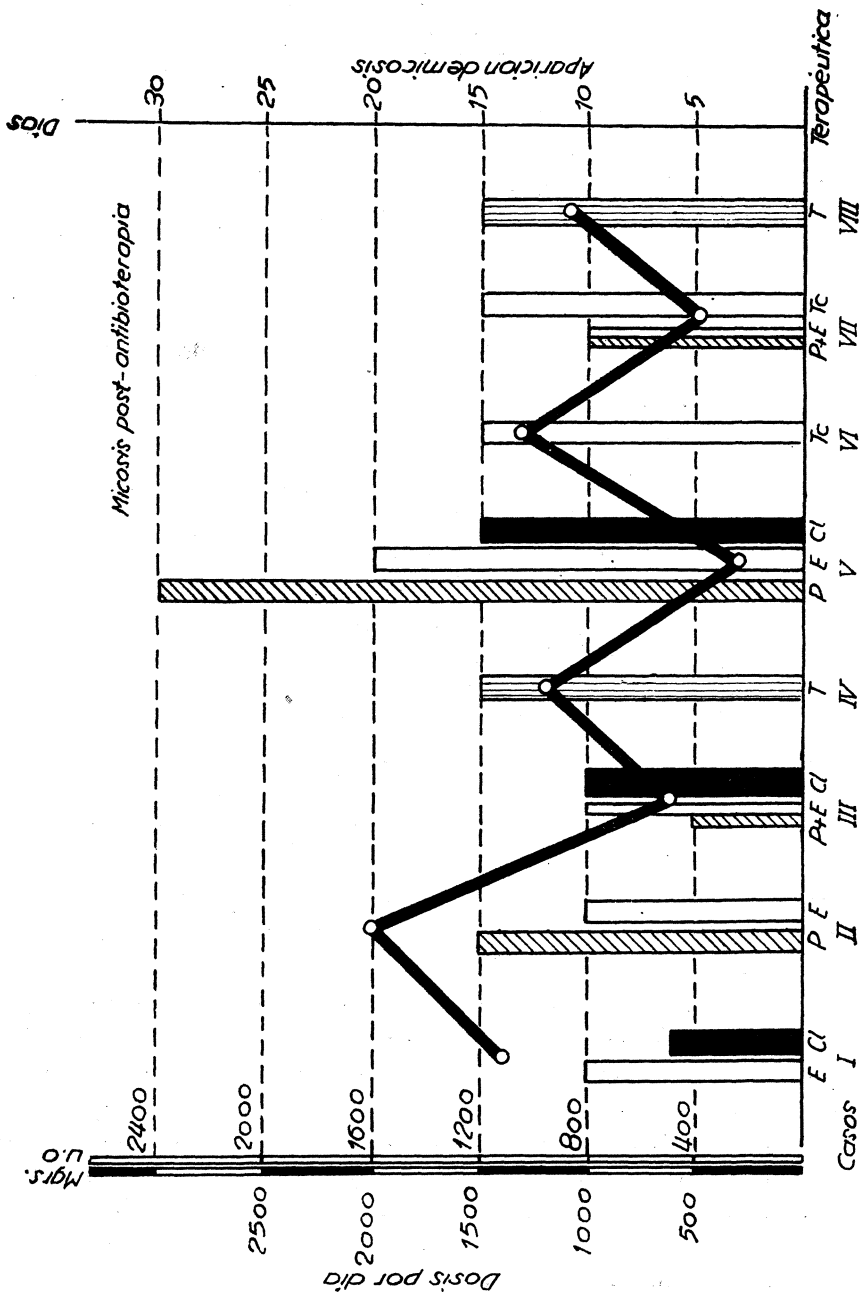

Días
Micosis post-antibioterapia
Aparición de micosis
Terapéutica
30
25
20
15
10
5
T VIII
P.E Tc VII
Tc VI
P E Cl V
T IV
P.E Cl III
P E II
E Cl I
Casos
2400
2000
1600
1200
800
400
Mgrs. U.O
2500
2000
1500
1000
500
Dosis por día

GRÁFICO 1b

C) *Los antibióticos en la biología de las especies micóticas.*

Independientemente de cuanto llevamos dicho acerca de la influencia (indirecta) que los antibióticos antibacterianos pueden tener para la detección, aparición y frecuencia de levaduras en infecciones de etiología microbiana compleja, existe otro grupo de sustancias antibióticas, entre las que destaca la nistatina, que por su condición de antibiótico antifúngico influye (directamente) en la biología del hongo, alterándole y destruyéndole unas veces, y modificando su fisiología normal otras; es decir que, si sustancias antibióticas son las que condicionan indirectamente la aparición de especies micóticas, también pertenecen a este grupo de sustancias las que intervienen directamente en su desaparición.

Estas alteraciones de las células micóticas, distintas a las producidas por antagonismos de tipo ecológico (figs. 4 y 5) en fenómenos de sustitución de flora microbiana, se manifiestan por hinchamiento (figs. 6 y 7), separación de la pared por retracción del citoplasma (fig. 8) y posterior exteriorización de vacuolas y granulaciones hasta disgregarse (figs. 9, 10 y 11) con la consiguiente desaparición de la célula por destrucción (figs. 12 a 14); pero, sin embargo, a veces, no se alcanza por completo la desintegración, sino que las células de levadura resisten el ataque, quedando patentizadas estas alteraciones en caracteres morfológicos o fisiológicos anormales, revelados en el casi 18 % de las especies encontradas y estudiadas por nosotros y todas ellas procedentes de enfermos a los que se había administrado nistatina.

Estas alteraciones se resumen en un 15,5 % de cepas de *C. albicans* que presentan anormalidades en la fermentación y asimilación de galactosa y algunas de ellas con células de mayor tamaño; un 70 % de *Rh. glutinis* con tamaño celular más pequeño del normal, análogo al de la variedad rubescens y algunas de ellas con disminución en la asimilación de la galactosa, deficiencia en la hidrolisis de arbutina, asimilación de alcohol o de nitratos o bien variaciones en la tonalidad de pigmentación; y en el 100 % de *T. versatilis* que han resultado tener un mayor tamaño del normal.

Y, por último, antes de pasar al examen monográfico, queremos señalar que las modificaciones o alteraciones por antagonismos de tipo ecológico que antes hemos mencionado, tienen también su importancia en la detección de levaduras, ya que hemos tenido ocasión de observar en

algunas ocasiones que pese a existir células levaduriformes (es cierto también que con marcada alteración de tipo granuloso) en los frotis, estas no crecían o tardaban en hacerlo bajo las condiciones habitualmente empleadas. Después de algunos ensayos con determinadas sustancias, urea, algunos aminoácidos o vitaminas A, B_{12}, etc., hemos visto que la glucosamina al 1 % favorece el desarrollo levaduriforme de estas células diversamente afectadas por antagonismos de tipo ecológico.

II. *Examen monográfico.*

Se han empleados cultivos, en estado puro, y sembrados en estría sobre agar de malta, pertenecientes a tres cosechas sucesivas, reunidas en grupos considerados aisladamente uniformes.

Se procedió a su rejuvenecimiento en extracto de malta y estría en agar del mismo medio, comenzando las siembras en los diferentes medios para los estudios de clasificación, siendo las claves las de Lodder-Kreger-Van-Rif, que se resumen en los cuadros 6 a 13.

CUADRO 6

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Torulopsis versatilis*.
Familia Cryptococácea. Subfamilia Cryptococoidea. Genero *Torulopsis*.

GRUPOS	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES						Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa					
10 E	2	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+		+	+ débil	—	No se aprecia seudomicelio.
10 F	1	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+		+	+ débil	—	
10 G	1	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+	Débilmente.	+	—	—	
10 H	1	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+		+	—	—	
11 I	1	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+		+ débil	—	—	
11 Y	1	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+		+ débil	+ débil	—	
11 R	1	+	+	+	+	—	+ 1/3	+	+	+	+	+		+ débil	+ débil	—	

CUADRO 6 (Conclusión)

GRUPOS	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Colonias gigantes	Observaciones
10 E 10 F 10 G 10 H 11 I 11 Y 11 R	*A los tres días a 25°* Células redondeadas, algunas ligeramente elípticas. Presenta pequeñas vacuolas y varias de ellas con corpúsculos refringentes en cada vacuola, ambas series muy coincidentes. Tamaño (3.0 - 5.7) × (5.8-6.8) μ Figura 15. Al mes en el mismo medio a 17°, acuse depósito y débil anillo.	*A los cinco días.* Superficie ligeramente rugosa, blanca muy brillante, bordes lobulados. *A los treinta días* Superficie y bordes prácticamente lisos, poco brillantes, más bien mates, color blanco-grisáceo. No forma seudomicelio.	En figuras 17 y 18 se aprecian dos colonias gigantes correspondientes a las cifras 10 E y 11 I. El color y aspecto de la masa es en ambos blanco y mate, pero la superficie acusa diferencias, cóncava la parte central y contorno finamente estriado casi liso en la 1.ª, y con granulaciones sobre fondo estriado y parte central cóncava en la segunda.	Las células en extracto de malta son de mayor tamaño que las descritas por Lodder en esta especie: (2-4) × (3-5) μ No forma seudomicelio, pero el frotis sobre agar de patata acusa agrupamientos ramificados de levadura. Figura 19.

CUADRO 7

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Torulopsis glabrata.*

GRUPO	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES					Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa				
135 APM	1	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—

GRUPO	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Colonia gigante en gelatina de malta	Observaciones
135 AP-AM	*A los tres días a 25°* Células ovales, ovales-redondeados. (3,8-4,8) × (4,2-6,7). Figura 20. *Al mes a 17°* Trazas de anillo, depósito, líquido claro y trazas velo en la superficie.	*A los cinco días a 25°* Estría blanco-grisácea, brillante pero finamente granulada. Células redondas y elípticas con corpúsculo refringente. *Al mes a 17°* Superficie débilmente estriada, color algo oscuro, células elípticas, elipticoredondas.	Colonia muy lisa con ligera cavidad en el centro. Figura 21.	La descrita por Lodder-W. Kreger-Van Rig., procede de origen humano.

CUADRO 8

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Torulopsis famata.*

GRUPO	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES					Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa				
D 1º	7	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−

GRUPO	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Seudomicelio sobre agar patata	Colonias gigantes
D 1º	*A los tres días a* 25º Células elípticas, elíptico-ovales, pequeñas. *Al mes a* 17º Depósito, anillo y líquido claro. (2.6-3.2) × (3.2-3.5). μ Figura 22.	*Al mes a* 17º Estría lisa, color crema oscuro, bordes lisos también.	No forma seudomicelio.	La colonia a los sesenta días a temperaturas 17 - 20º presenta aspecto liso, oquedad central no muy acentuada, color blanco mate. Figura 23.

CUADRO 9

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Torulopsis candida.*

GRUPOS	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES					Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa				
B 1º	10	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+ débil	+	—
136 AP-AM	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+ débil	+	—	+ débil	+	—

GRUPOS	Caracteres en extracto de malta	Cultivo en estría de agar malta	Colonia gigante sobre gelatina malta	Observaciones
B 1º	*A los tres días a 25º* Células redondas vacuoladas, con una o dos vacuolas pequeñas. Varias células están en gemación. Figura 24. (3.8-7) × (4.2-7) μ	*A los cinco días a 25º* Superficie brillante, blanca, ligeramente grisácea y débilmente lobulada, bordes algo ondulados. Células redondas finamente granuladas. *Al mes a 17º* Crema brillante, fugoso, con bordes finamente estriados. En ambos grupos se presenta el mismo aspecto.	En figura 26 y 27 se aprecia el aspecto a los veinte días a temperatura para 17-20º y en la figura 28 a los sesenta días. En la primera superficie lisa, color crema y borde blanco estriado y festonado. En la tercera aparece marcadamente fibrosa la parte central, color crema, y al borde finamente estriado y blanco.	Las células del cultivo en malta son de mayor tamaño que la descrita para la especie.
136 AP-AM	Células redondas y vacuoladas, con gemación o no figura 25, muy similares a las del grupo B, pero mayor tamaño. (5.8-10.2) × (1.4-10.2) μ			

CUADRO 10

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Rhodotorula glutinis*.

Familia Cryptococácea. Subfamilia Rhodotoruloidea. Género *Rhodotorula*.

GRUPOS	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES				Asimilación No_3K	Asimilacion de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Lactosa				
F 1º	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+débil	—	+	+	+	—
G 1º	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	—
137 AP-AM	1	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—
140 AP-AM	1	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—
146 AP-AM	1	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—
104 A	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	Vestigios	—
104 B	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—		—
104 C	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—		—
146 O	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—
146 P	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—

CUADRO 10 (Continuación)

GRUPOS	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Colonias gigantes
F 1° (Fig. 30) G 1°	*A los tres días a 25°* Células redondeadas, contenido vacío o liso, destacando solamente un corpúsculo refringente. Células en gemación. *Al mes a 17°* Depósito y anillo rosado.	*A los cinco días a 25°* Superficie brillante, lisa, en las partes más densas, ligeramente abuñolada en el pico superior, color rosa vivo. *Al mes a 17°* Estría rugosa, de aspecto fibroso, color rosa vivo (coral).	En figuras 33 y 34 se aprecia colonia gigante de cepa F de veinte días a 17-20°, presenta superficie lisa, borde estrecho y finamente estriado, color rosa vivo.
137 AP-AM 140 AP-AM 146 AP-AM (Fig. 32)	*A los tres días a 25°* Depósito y anillo rosado. Depósito y anillo rosado. Elíptico redondeadas. *Al mes a 17°* Depósito y anillo rosa vivo.	*A los cinco días a 25°* Igual aspecto que las anteriores, con color rosa vivo. *Al mes a 17°* Superficie lisa, rosa vivo (coral) y brillante. Bordes finamente estriados y en la base rugosa. Células redondeadas con corcúsculo refringente.	Figuras 35 y 36, colonia de cepa 146 AP-A; a los veinte y sesenta días a 17-20° ambas rosa vivo y brillante, muy características; la segunda, marcadamente nerviada.

CUADRO 10 (Conclusión)

GRUPOS	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Colonias gigantes
104 A 104 B (Fig. 16) 104 C	*A los tres días a 25°* Células redondeadas o elíptico-redondeadas. Contenido liso o ligeramente vacuolado. Menor número de células, con corpúsculo refringente, que las anteriores. *Al mes a 17°* Depósito y anillo rosado.	*A los cinco días a 25°* Igual aspecto que las anteriores pero color rosa asalmonado. *Al mes a 17°* Estría más lisa que las anteriores de este tiempo y el color rosa más opaco. Células de igual aspecto.	Figuras 37 y 38, colonia de la cepa, 140 AP-AM, de los dos cultivos de veinte y sesenta días crateriforme en el centro, bordes convexos color rosa vivo.
146 O (Fig. 31) 146 P (Fig. 32)	*A los tres días a 25°* Elíptico-redondeada con 2-4 corpúsculos refringentes. Algunas células en gemación. Se acusa menor tamaño que las anteriores. *Al mes a 17°* Depósito y anillo rosado.	*Al mes a 17°* Estría rugosa, color rosa ligeramente amarillento.	Figuras 39 y 40, colonia de la cepa, 137 AP-AM a los veinte días y a los sesenta, aspecto liso y finamente radiado, respectivamente, son más similares a G que a la 145 AP-AM.

CUADRO 11

GRUPO DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Candida mycoderma.*

Familia Cryptococácea. Subfamilia Cryptococoidea. Género *Candida.*

GRUPO	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES					Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa				
141 AP-AM	1	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	+

GRUPO	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Colonia gigante	Seudomicelio sobre agar patata
141 AP-AM	Celulas elíptico alargadas, algunas francamente alargadas. Figura 41. Presentan dos corpúsculos refringentes, uno en cada polo; a las veinticuatro horas, acusa ya formación de velo. Figura 41.	*A los cinco días a 25°* Superficie mate, blanco gris, como cristal esmerilado. Células elípticas algo alargadas, con dos pequeños corpúsculos refringentes. *Al mes a 17°* Superficie blanca mate.	En gelatina malta a los veinte días, colonia blanca lisa, tenuemente rayada con borde finamente estriado. Figura 42.	Seudomicelio, ramificado, con células más alargadas en cadenas y sobre ellas las blastoesporas de menor tamaño y elípticas. Figura 43.

CUADRO 12

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Candida albicans.*

GRUPOS	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES					Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa				
A 1º	13	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	+
C 1º	59	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+
E 1º	5	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	+
40 = 134 AP-AM	41	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+
138 AP-AM	1	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	+
139 AP-AM	1	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	+

CUADRO 12 (Conclusión)

GRUPOS	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Seudomicelio sobre agar de patata	Colonias gigantes en gelatina malta
A 1º C 1º E 1º 134 AP-AM 138 AP-AM 139 AP-AM	*A los tres días a 25º* Células redondas en gemación. Contenido liso o con algún pequeño corpúsculo refringente, aisladas o reunidas en grupos. Células de diferente tamaño, oscilando la media entre: (2.9-5.5) × (3.9-7.1) μ El aspecto de las células correspondientes a los 6 grupos es muy similar. Figuras 44 y 45. *Al mes a 17º* Presentan depósito y anillo, acusando A_1º C_1º ligero polvo flotante. Las 136, 138, 139, AP-AM anillo y líquido, claro.	*A los cinco días.* Superficie blanca, jugosa, brillante, lisa y los bordes también lisos. *A los treinta días.* Presentan superficie lisa, blanco marfil mate. Los bordes también lisos, destacándose solamente ligera ondulación en los grupos C y E, más marcada en el primero. Al microscopio, las células acusan corpúsculos refringentes bien destacados. Las del grupo 139 AP. se destacan por su menor tamaño, pero con el mismo aspecto.	Seudomicelio típico con blastoesporas reunidas en racimos globosos y colocados a lo largo de un filamento formado por células alargadas. En las figuras 46, 47, 48 y 49 se aprecia el conjunto y detalle, tomados de cultivo sobre frotis de agar de patata sobre porta, sembrado con la cepa E. En las figuras 50 y 51 se aprecian seudomicelios de las cepas A, C, y 139 AP-AM. Pero definidos por estar cultivados en masa de agar más densa y en caja Petri, además el desarrollo más avanzado da lugar a fusión a los racimos globosos.	En las figuras 52 y 53 se aprecian las colonias gigantes pertenecientes a la cepa A1º. Son dos fases de desarrollo, la 3.ª de unos treinta días a 17-20º y luego a nevera. La 2.ª, sesenta días a 17-20º. En esta segunda fase se aprecia la liquidación de la gelatina. Las colonias de cepa E1º figuras 54 y 55 son similares a las de la cepa A1º lisas con ligeras estrías, liquidan la gelatina. La colonia de cepa C figura 56 presenta rugosidades nerviadas y bordes granulados y la colonia figura 57 liquidando la gelatina. Las colonias de esta cepa están en una fase de transición entre las E y C 138-AP (figura 59.

CUADRO 13

GRUPOS DE LEVADURAS CLASIFICADAS COMO *Trichosporon cutaneus.*

Familia Cryptococácea. Subfamilia Trichosporoidea. Género *Trichosporon.*

GRUPOS	Núm. de cepas	FERMENTACION DE AZUCARES						ASIMILACION DE AZUCARES					Asimilación No_3K	Asimilación de alcohol	Hidrólisis de la arbutina	Seudomicelio
		Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa				
152 L	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	Trazas	+
152 M	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
152 N	1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+

GRUPOS	Caracteres en extracto de malta	Caracteres en estría sobre agar malta	Seudomicelio	Colonias gigantes
152 L 152 M 152 N	*A los tres días a 25°* Células elípticas y células muy alargadas, otras parecen tranosmiceliares. En su interior presentan vacuolas y corpúsculos refringentes. Figuras 60, 61 y 62.	*A los cinco días a 25°* Estría muy rugosa y fibrosa, como gruesas nerviaduras, color crema. *Al mes a 17°* Nerviaduras más destacadas, color más oscuro.	Forman abundante seudomicelio con células alargadas y en cadena formando zigzag y sobre ellas figuran colocadas las blastoesporas, de forma elíptica, elíptico-redondeada, colocadas en forma característica. Figura 63.	*A los sesenta días a 17-20°* Presenta aspecto muy fibroso, color pardo amarillento y borde finamente estriado, blanco yeso. Figura 64.

CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS RESULTADOS

Efectivamente es posible comprobar una vez más la subordinación existente entre las micosis humanas y la presencia de antibióticos, y así como muchos autores describen localizaciones en faringe, bronquios y pulmones, boca, estómago e intestinos, aparato genital femenino o hígado y otras vísceras —siempre relativas a un concepto de patogenicidad— nosotros en 311 muestras de orina procedentes de personas sanas y enfermas, tratadas o no con antibióticos, hemos aislado 200 cepas de levaduras, que si bien es verdad, algunas procedían de personas sanas o enfermas que, al menos en el momento del examen no estaban sometidas a antibioterapia, lo cierto es que del 74,05 % de estas muestras procedentes de enfermos tratados con distintos antibióticos, un 93,4 % fueron micótico-positivos. Para una visión comparativamente más clara de los resultados presentamos el

CUADRO 14

Casuística ocasional de casos micótico-positivos en orinas.

De 311 casos examinados ... ...
- Un 31,8 % de aparentemente sanos, de los cuales 21,2 % son micótico-positivos.
- Un 68,2 % de enfermos ... ...
  - Con antibioterapia son el 74,05 %, y de ellos un 93,4 % micótico-positivos.
  - Sin antibioterapia son 25,95 %, de los cuales hay 54,5 % micótico-positivos.

En estos resultados hay que suponer, además, que parte de los micótico-positivos aparentemente ajenos a la antibioterapia tengan una remota etiología de origen antibiótico, ya que dado el general uso y abuso que de estos agentes terapéuticos se hace, es posible que intervinieran en su implantación modificando, definitivamente, el equilibrio de la flora microbiana compleja.

Prescindimos en este trabajo del concepto estrictamente patógeno que puede representar la coexistencia de estos microorganismos en in-

fecciones bacterianas del aparato urinario, interesándonos tan sólo por los posibles puntos de contacto que pueden existir entre levaduras y antibióticos, al influir éstos en su origen o implantación orgánica *in vivo,* detección por cultivo *in vitro,* que condiciona, a su vez, el tratamiento por antibióticos de otra naturaleza para lograr su destrucción o desaparición.

Las consecuencias que se deducen de las observaciones acerca del intervalo de aparición de levaduras en relación con el tratamiento, son paralelas a los resultados obtenidos *in vitro* con vistas a lograr un perfecto aislamiento de estos microorganismos: en el primer caso se ve que el período de aparición de levaduras es tanto más corto cuanto más intenso es el tratamiento antibiótico e independiente de su naturaleza química, lo mismo que en el segundo una eficaz asociación inhibidora antibacteriana trae como consecuencia el cultivo aislado de las colonias levaduriformes. Asimismo, la aparición de micosis en orina es tan rápida (tres días) cuando intervienen tres antibióticos entre los que se establece una potente acción sinérgica antibacteriana, aun cuando entre ellos no existan inhibidores de tipo tetraciclínico que son los más responsabilizados de las micosis post-antibioterapia, como fácil es conseguir cultivos de levaduras aisladas si se conociera *a priori* el comportamiento frente a los antibióticos, de las especies que integran la flora microbiana compleja de la que se quieren aislar.

Asociaciones de 30 gam. de cloromicetina con 40 gam. de estreptomicina/c. c. de medio se han mostrado de gran eficacia en el aislamiento de colonias de levadura a partir de orinas, según se puede ver en el cuadro 2, aunque si la contaminación es debida a proteus o piocianicos su eficacia se ve notablemente disminuída. En este aspecto es preciso señalar también que hemos observado que el 1 % de glucosamina en el medio favorece el desarrollo de células levaduriformes que en los frotis se encontraban alteradas o "envejecidas" quizá por antagonismos de tipo ecológico.

El intervalo normal de aparición de levaduras viables, en los casos de infecciones urinarias por floras microbianas complejas sometidas a antibioterapia, parece oscilar entre ocho a quince días desde que se inicia el tratamiento, aunque siempre dependiendo de la actividad bactericida de los agentes terapéuticos porque en un caso de asociación si-

nérgica de penicilina, estreptomicina y cloromicetina, hubo aparición de levaduras a los tres días de tratamiento.

Sin duda, es mucho mayor el porcentaje de *C. albicans* encontrado por nosotros frente al de las otras levaduras; esto y su más frecuente agresividad pueden ser la causa de que todos los trabajos de esta índole consultados se refieran casi exclusivamente a moniliasis. No obstante esto, también hemos de conceder importancia a las otras especies detectadas y cuya frecuencia puede observarse en el gráfico A, del que es posible establecer el siguiente orden de aparición por géneros:

Candida → *Torulopsis* → *Rhodothorula* → *Cryptococcus* → *Trycophiton*

Por último, en los casos en que pese a no existir antibioterapia, se detectan levaduras, coincidiendo con glucosurias de concentración variable, se observa en el sedimento en fresco un aumento en la proliferación de estos microorganismos sin que hayamos podido demostrar relación entre la concentración del azúcar en las muestras de orina y la densidad de contaminación micótica.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se hacen ensayos que demuestran la utilidad de asociaciones de 40 gam. de estreptomicina con 30 gam. de cloromitecina para la detección de colonias aisladas de levadura, en muestras de orina.

2. Se observa, para algunos casos con posibilidad de comparación, una cierta relación entre el intervalo de aparición detectable de las levaduras y la potencia antibacteriana efectiva del tratamiento.

3. En el 74,05 % de las muestras, que fueron tomadas post-antibioterapia, se encontraron el 93,4 % con presencia de levaduras; el resto de las especies encontradas proceden de enfermos no tratados por antibióticos y de personas aparentemente sanas.

4. Además de un 65 % de *C. albicans* se han detectado y clasificado otras especies: 6,5 % de *C. tropicalis*, 6 % de *T. candida*, 5 % de *Rh. glutinis*, 4 % de *T. versatilis*, 3,5 % de *T. famata*, 3,5 % de *Rh. rubra*, 2,5 % de *Rh. mucilaginosa*, 1,5 % de *Tr. cutaneus*, 1 % *Cr. albidus*, 0,5 % de *C. mycoderma*, 0,5 % de *T. glabrata* y 0,5 % *de Cr. Laurentii*.

SUMMARY

1. We fulfil experiments to show the utility of associations of 40 gam. streptomycine with 30 gam. chloromicetine for the detection of isolated yeast colonies, in samples of urine.

2. We observe, for some cases with the possibility of comparison, a certain relation between the interval of appearance detectable of yeast and the effective antibaterian power of the treatment.

3. In the 74,05 % of the samples, taken post-anti-biotherapy, 93,4 por 100 presented yeast; the rest of the species found came from sick people not treated with antibiotics or from persons who were apparently healthy.

4. Besides a 65 % of *C. albicans* some other species have been detected and classified: 6,5 % *C. tropicalis,* 6 % *T. candida,* 5 % *Rh. glutinis,* 4 % *T. versatilis,* 3,5 % *T. famata,* 3,5 % *Rh. rubra,* 2,5 % *Rh. mucilaginasa,* 1,5 % *Tr. cutaneus,* 1 % *Cr. albidus.* 0,5 % *C. mycoderma,* 0,5 % *T. glabrata* and 0,5 % *Cr. Laurentii.*

BIBLIOGRAFIA

CHAPTAL; JEAN; RIOUX; CAMPO y BERTRAND. 1954. Arch. Franc. Pediatr. 2, 745.

HESSELTINE; HANCK; TEN y BOHONOS. 1952. J. Barct. 64, 55.

HUPPERT, MC. PHERSON y CAZIN. 1953. J. Bact. 65, 171.

JANKE. 1954. Zentr. Bakt. Abt. I. 160, 628.

LODDER y KREGER-VAN RIG. 1952. The Yeast. Amsterdan.

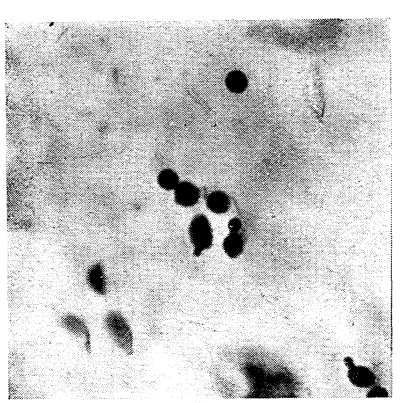
LOPES y NETTO. 1955. Bull. Inst. Pasteur. 87, 229.

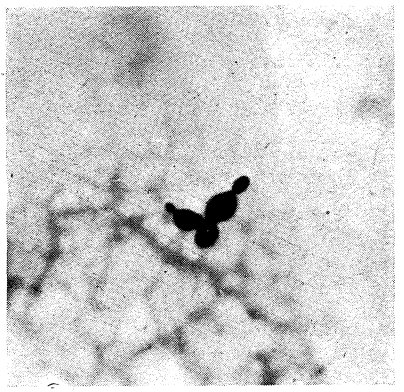
MARSELUO y SEGRETAIN. 1954. Ann. Inst. Pasteur. 87, 229.

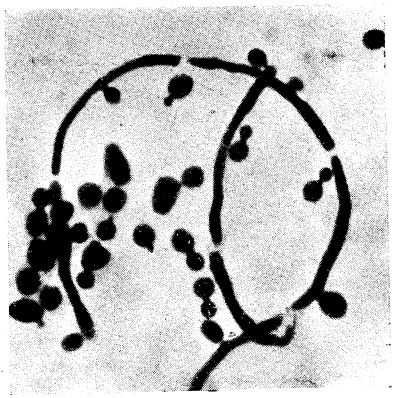
MOORE. 1951. J. Lab. clin. Med. 37, 703.

PAPPENFORT y SCHNALL 1951. Arch. Internal. Med. 88, 729.

RIMBAUD y RIOUX. 1955. La Presse Medicale 63, 701.

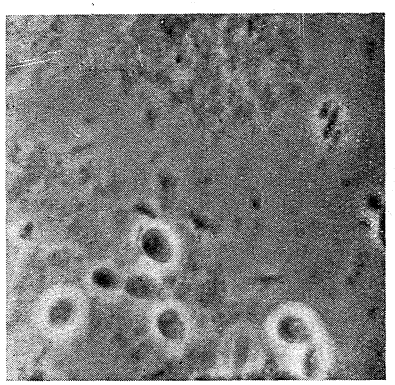


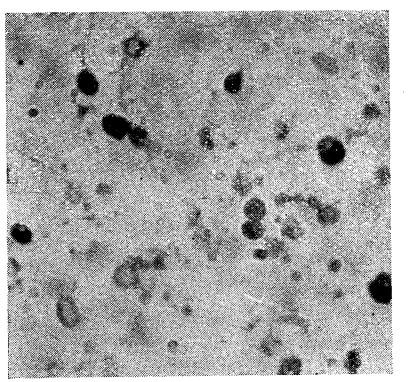




FIGURAS 1, 2 Y 3

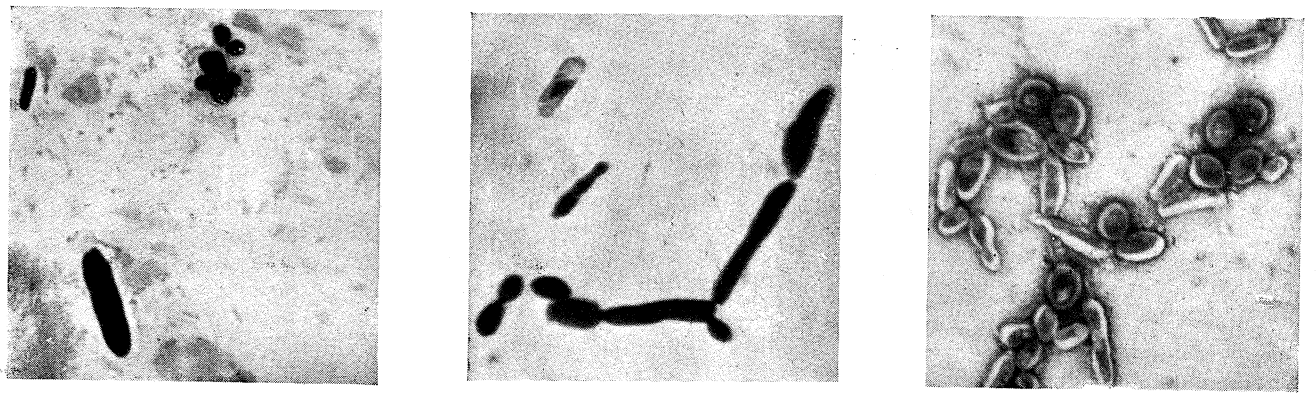
Imágenes de tres frotis de sedimento urinario, donde se aprecian claramente las células de levadura; uno de ellos (fig. 3) muestra amplio desarrollo de seudomicelios.





FIGURAS 4 Y 5

Imágenes de células de levaduras con alteraciones análogas a las de envejecimiento, producidas posiblemente por antagonismos microbianos.

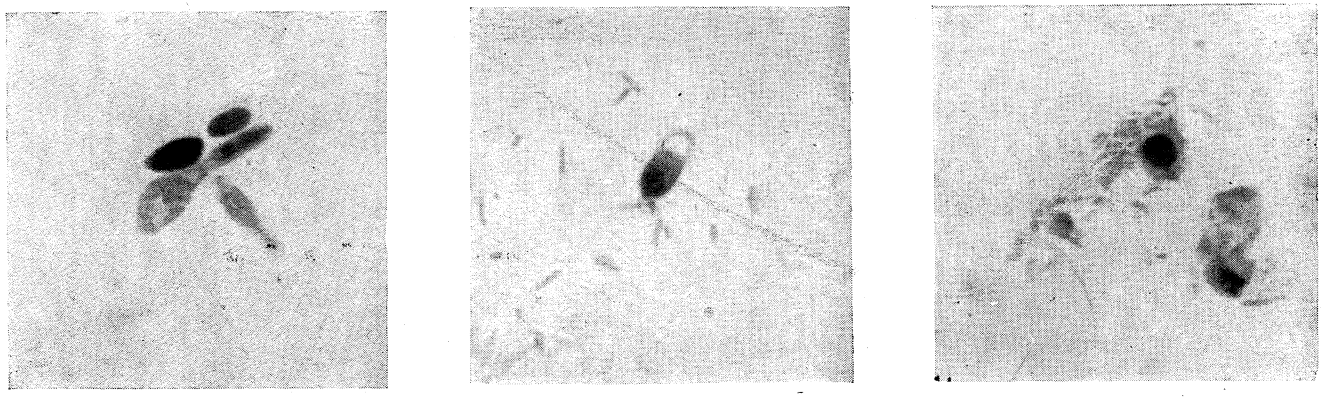


FIGURAS 6, 7 y 8

Aumento del tamaño celular y separación de la pared y citoplasma, provocados por la acción de nistatina.

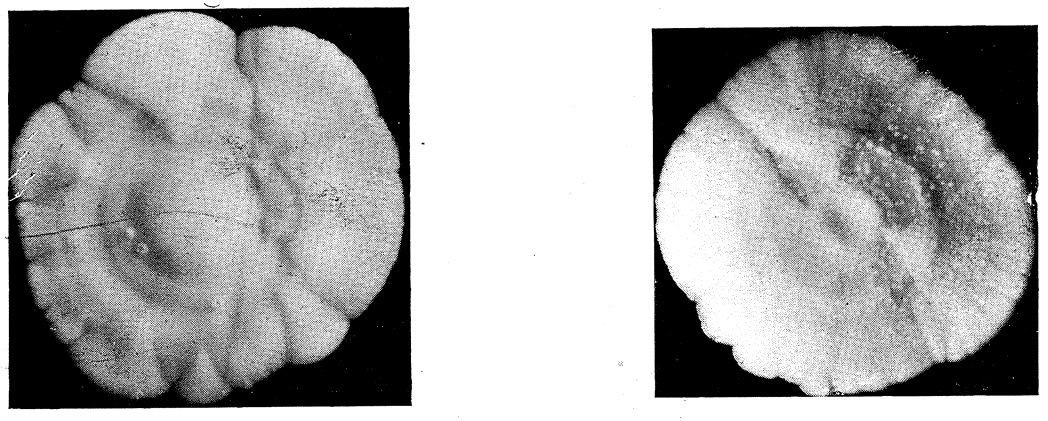
FIGURAS 9, 10 y 11

Exteriorización de vacuolas y gránulos como fases que preceden a la desintegración celular.



FIGURAS 12, 13 y 14

Ultimas fases que conducen a la desintegración celular producida por la nistatina.



FIGURAS 17 y 18

Torulopsis versatilis. Colonias gigantes sobre gelatina de malta a los 60 días, correspondientes a las cepas 10 E (fig. 17) y 11 - I (fig. 18).

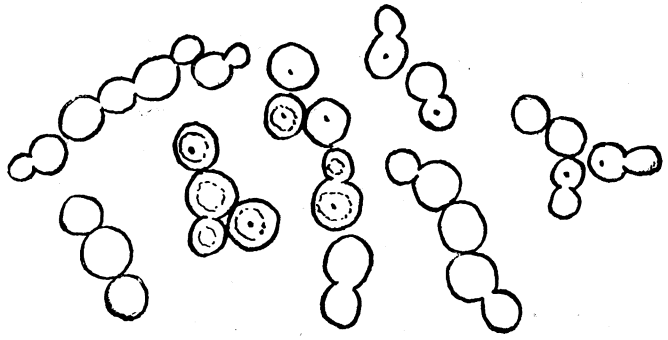


FIGURA 15

Células de cultivo en malta de 72 horas de levaduras 10 G *Torulopsis versatilis.*

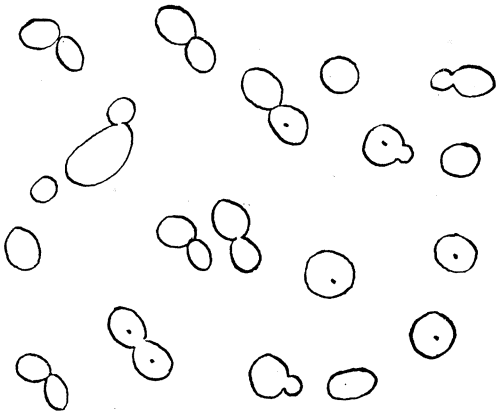


FIGURA 16

Células de cultivo en malta de 72 horas de levaduras 10 E *Torulopsis versatilis.*

FIGURA 19
Desarrollo sobre agar de patata de frotis de *Torulopsis versatilis* (levadura 10 E), que no acusa seudomicelio.

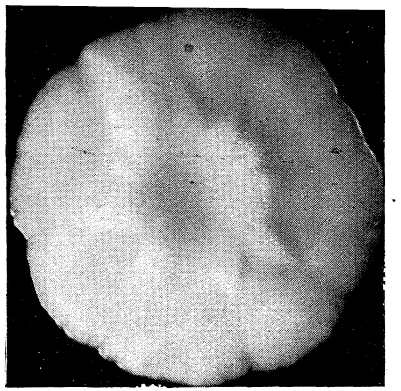


FIGURA 21
Colonia gigante en gelatina de malta de *Torulopsis glabrata,* cepa 135, AP-AM.

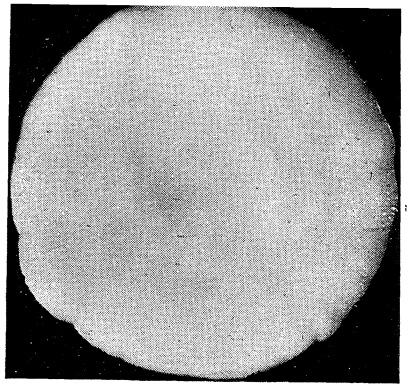


FIGURA 23
Colonia gigante en gelatina de malta a los 60 días de *Torulopsis famata,* cepa D.

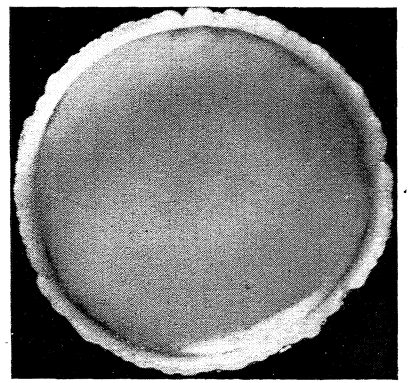


FIGURA 26
Colonia gigante en gelatina de malta de *Torulopsis Candida,* cepa B_{10}. Superficie lisa color crema, borde estriado, blanco.

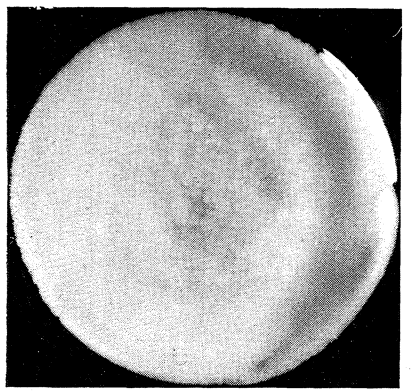


FIGURA 27
Colonia gigante en gelatina de malta de *Torulopsis Candida,* cepa 136. AP-AM, en fase más avanzada, iniciando granulaciones.

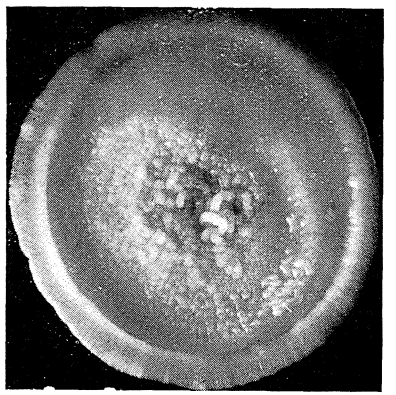


FIGURA 28
Colonia gigante en gelatina de malta de *Torulopsis Candida,* cepa B_{10}, en fase más avanzada que en fig. 27.

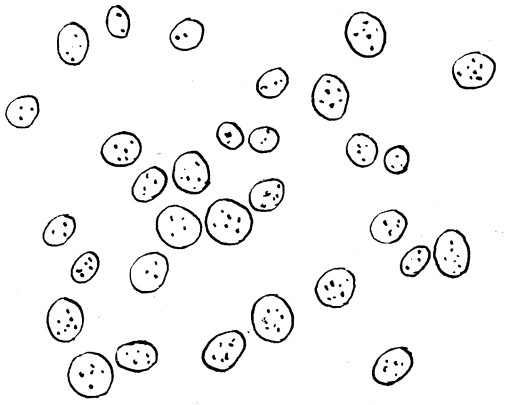


FIGURA 20

Torulopsis glabrata, células en malta a las 72 horas de la cepa 135. AP-AM.

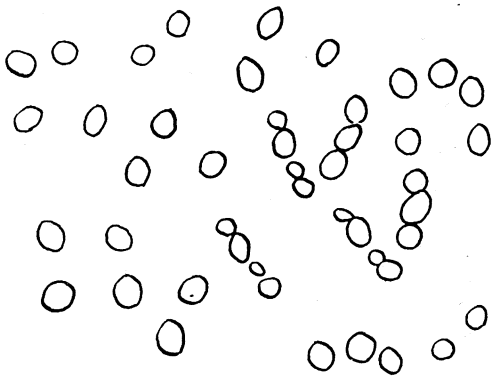
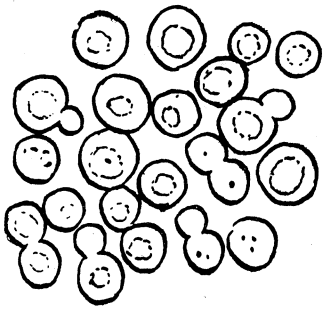
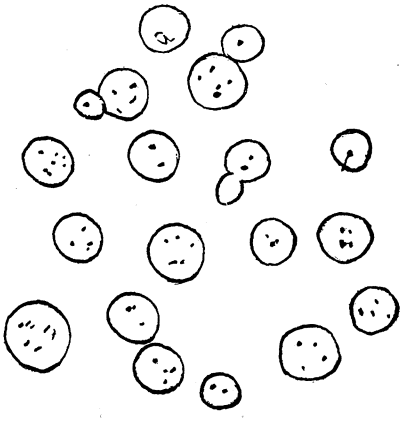


FIGURA 22

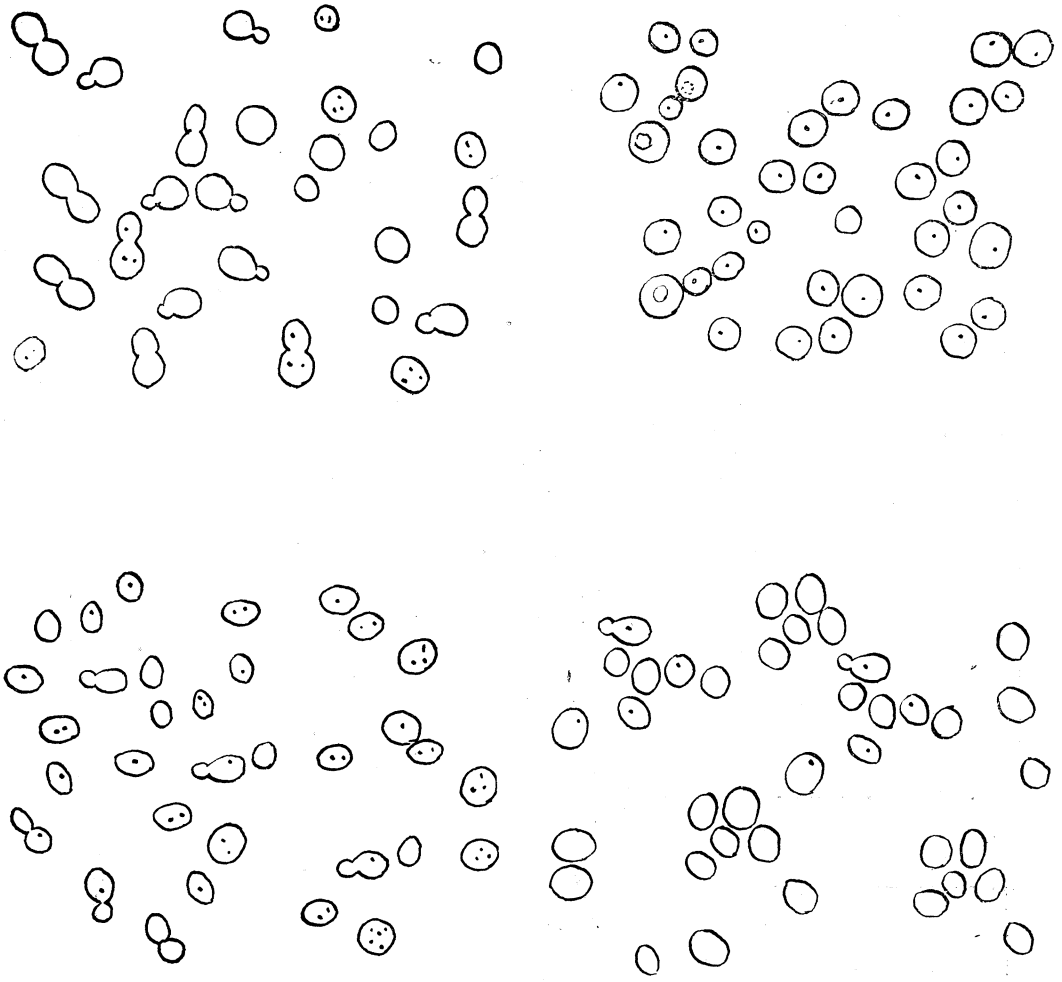
Células de *Torulopsis famata,* cultivo en malta de 72 horas, cepa D.





FIGURAS 24 y 25

Células de *Torulopsis Candida* en malta a las 72 horas, correspondientes a las cepas 136-AP (fig. 25) y B_1 (fig. 24).



FIGURAS 29, 30, 31 y 32

Células de cultivo en malta de *Rhodotorula glutinis,* variedad *rubescens,* de las cepas 104 D (fig. 29), F_{1^o} (fig. 30), 146 O (fig. 31) y 146 P (fig. 32).

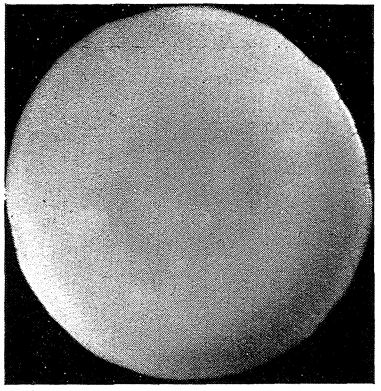


FIGURA 33
Rhodotorula glutinis, cepa F.

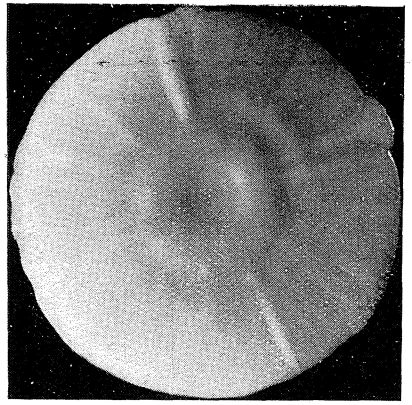


FIGURA 34
Rhodotorula glutinis, cepa F.

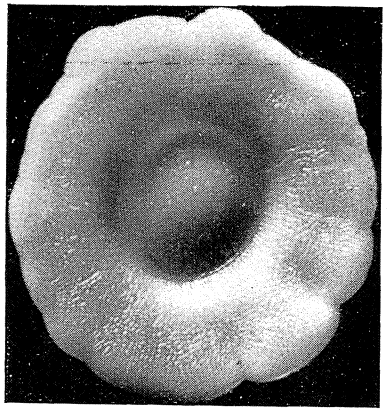


FIGURA 35
Rhodotorula glutinis, cepa 146-AP-AM.

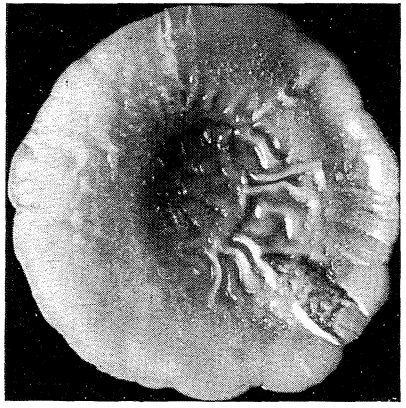


FIGURA 36
Rhodotorula glutinis, cepa 146-**AP-AM.**

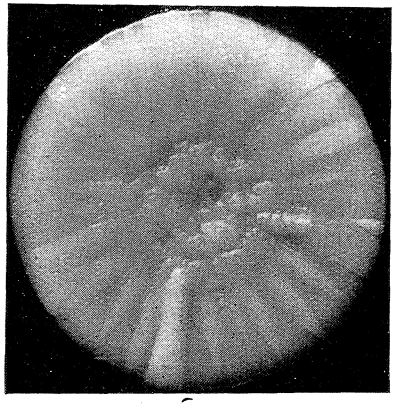


FIGURA 37
Rhodotorula glutinis, cepa 140-**AP-AM.**

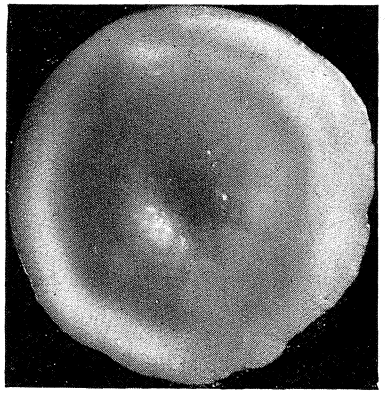


FIGURA 38
Rhodotorula glutinis, cepa 140-AP-AM.

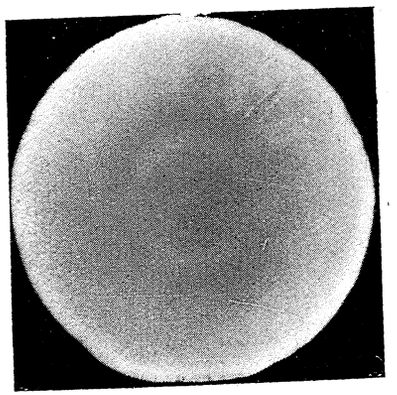


FIGURA 39
Rhodotorula glutinis, cepa 137-AP-AM.

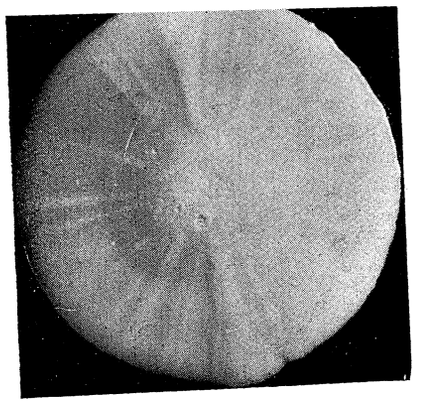


FIGURA 40
Rhodotorula glutinis, cepa 137-AP-AM.

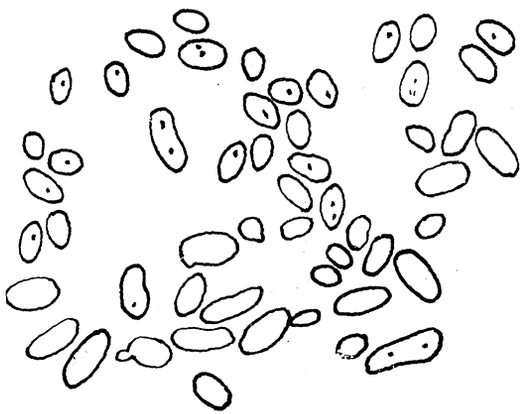


FIGURA 41
Células de cultivo en malta a las 72 horas de *Candida mycoderma*, cepa 141-AP-AM.

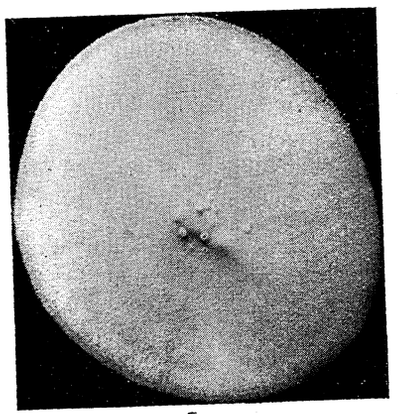


FIGURA 42
Colonia gigante en gelatina de malta, de *Candida mycoderma*, cepa 141-AP-AM.

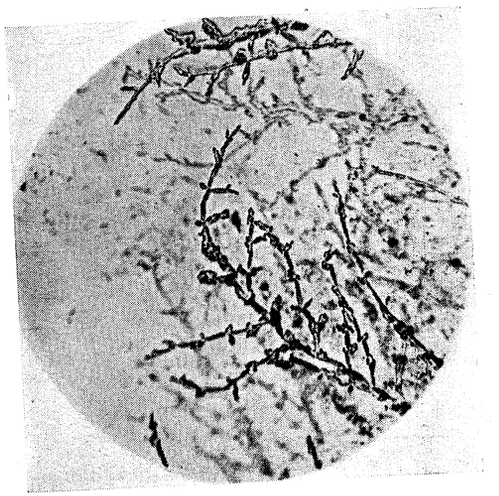
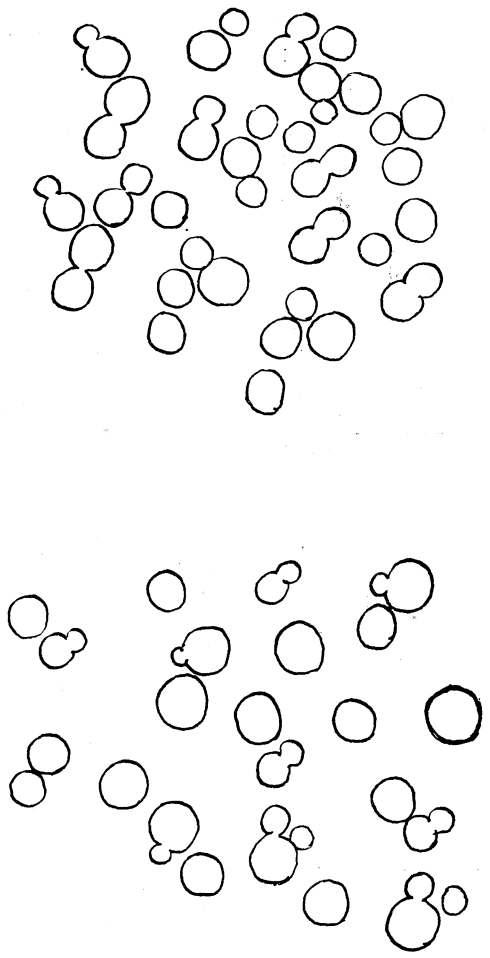
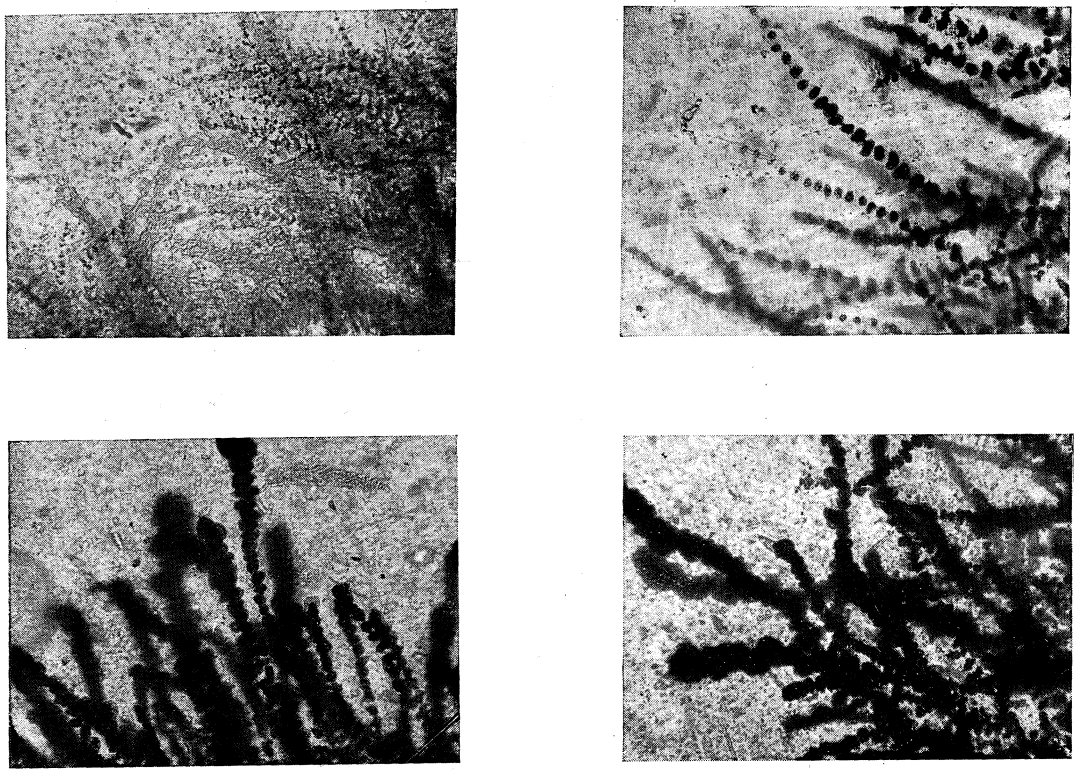


FIGURA 43
Seudomicelio de *Candida mycoderma*, en frotis sobre agar de patata.

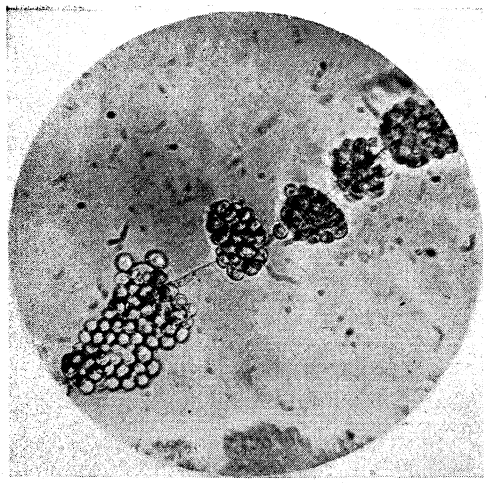


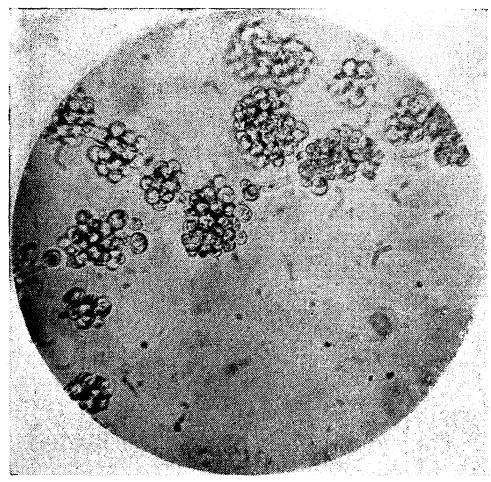
FIGURAS 44 y 45
Células de *Candida albicans*, cultivo de 72 horas en malta; cepa 134 AP-AM (fig. 44) y A_{1^o} (fig. 45).



FIGURAS 46, 47, 48 y 49

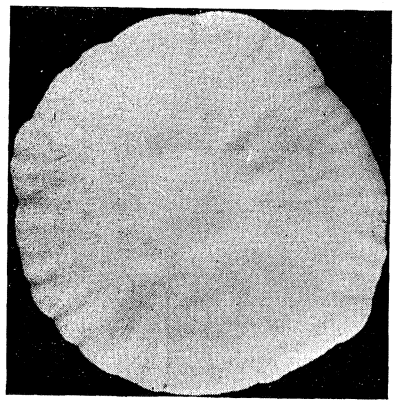
Aspectos de seudomicelios de *Candida albicans,* sobre agar de patata, con aspecto característico en los agrupamientos de blastosporas.



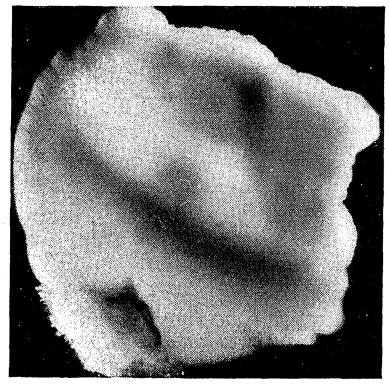


FIGURAS 50 y 51

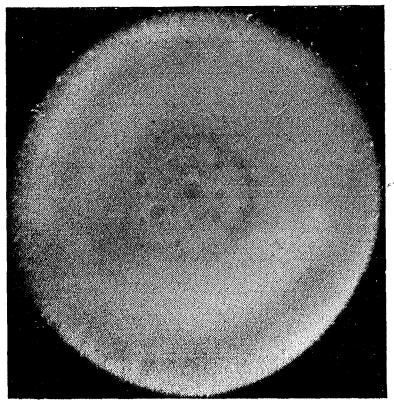
Seudomicelio de *Candida albicans*, detalle de los racimos globosos de blastosporas del seudomicelio.



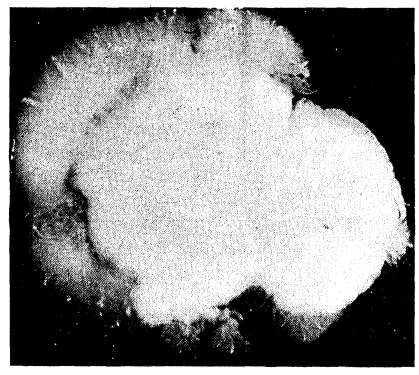
FIGURAS 52 y 53



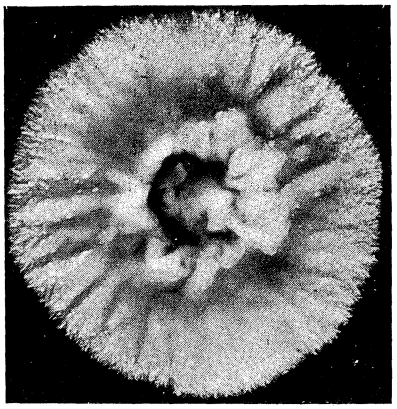
Colonias gigantes de *Candida albicans* sobre gelatina de malta, a los 60 días; cepas A_{1^o} comenzando en (fig. 53) a liquidar la gelatina.

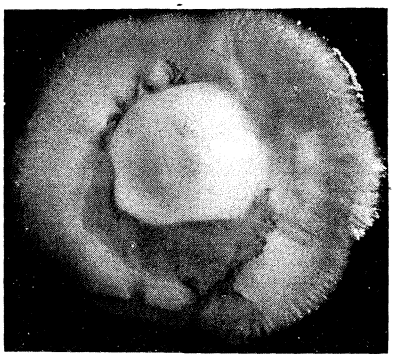


FIGURAS 54 y 55



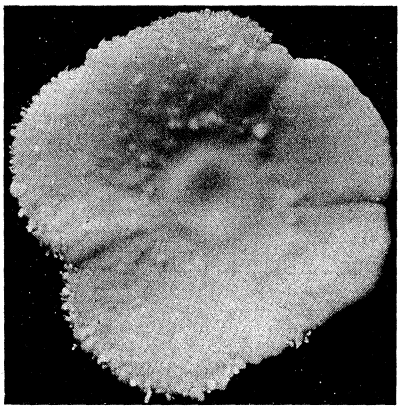
Colonias gigantes en gelatina de malta de *Candida albicans*, cepa E. En la figura 55 comienza liquidación de la gelatina, apreciándose aún aspecto fibroso.

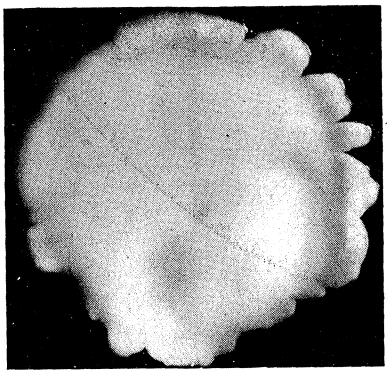




FIGURAS 56 y 57

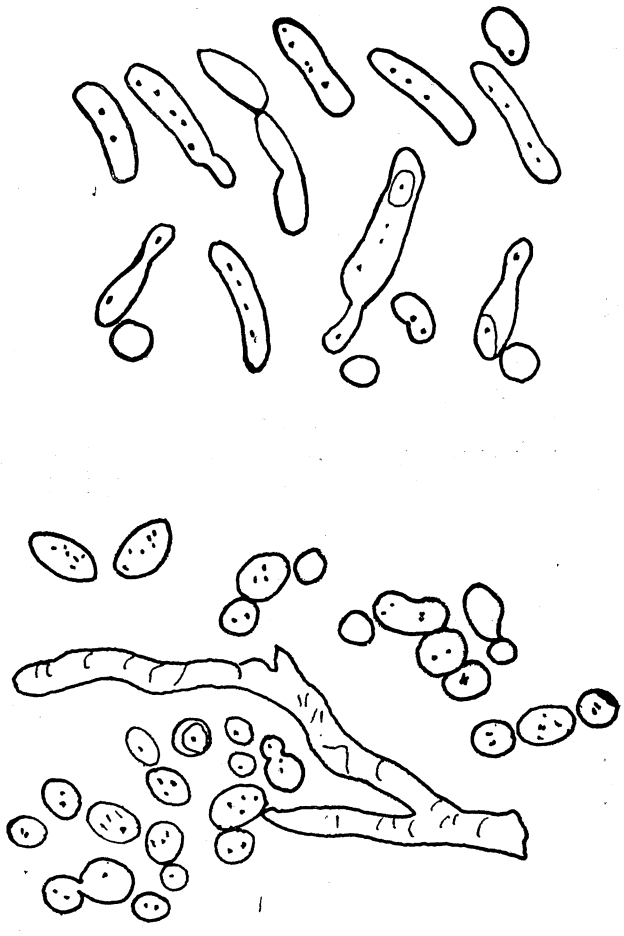
Colonias gigantes de *Candida albicans,* cepa C, sobre gelatina de malta. Se aprecia francamente el aspecto fibroso de fase más avanzada y la liquidación de gelatina en figura 57.





FIGURAS 58 y 59

Colonias gigantes de *Candida albicans,* cepa 138-AP-AM, sobre gelatina de malta. Comienza a manifestarse la fase granulada y la liquidación de la gelatina.



FIGURAS 60 y 61

Células de *Trichosporon cutaneum*, de cultivo de malta a las 72 horas, apreciándose formas de comienzo de seudomicelio.

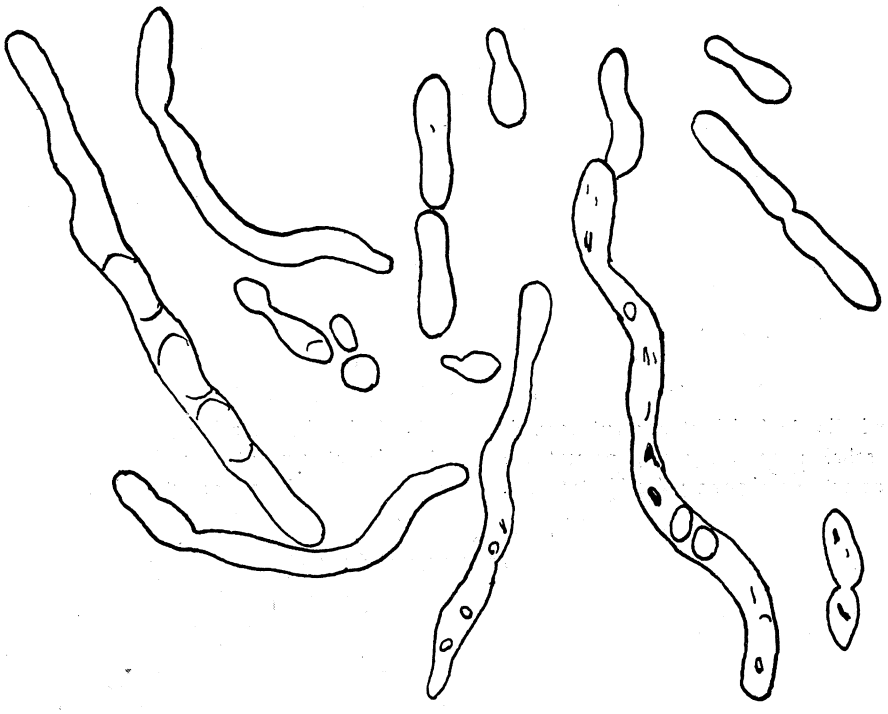


FIGURA 62

Células de *Trichosporon cutaneum*, de cultivo de malta a las 72 horas, apreciándose formas de comienzo de seudomicelio.

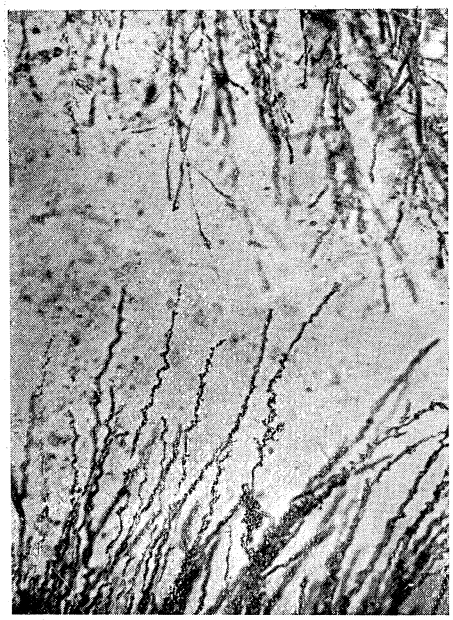


FIGURA 63

Seudomicelio de *Trichosporon cutaneus*, de frotis sobre agar de patata, presentando típico aspecto en zig-zag y las blastosporas.

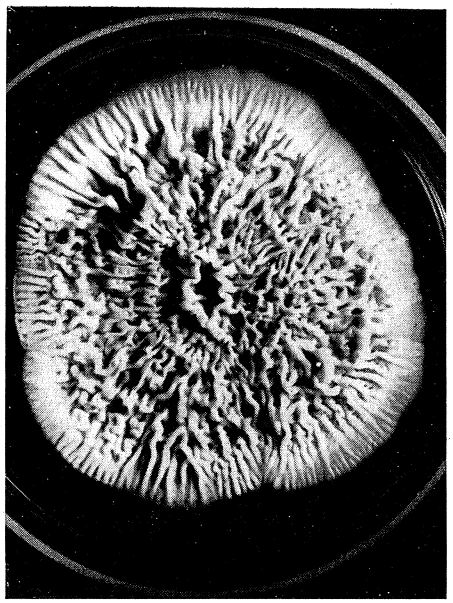


FIGURA 64

Colonia gigante sobre gelatina de malta de *Trichosporon cutaneus*, de aspecto muy fibroso característico.

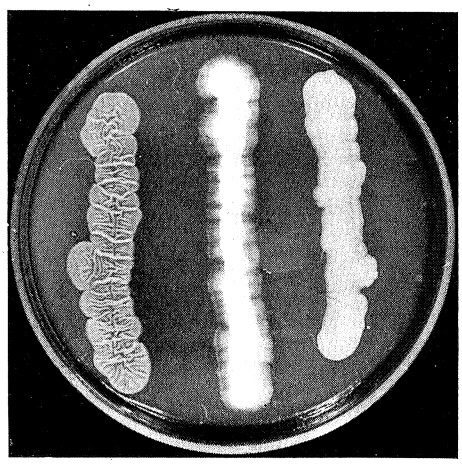


FIGURA 65

Estrías sobre agar patata de

Candida mycoderma — *Candida albicans* — *Torulopsis Candida*

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

IV. Factores que influyen en la fermentación en sumergido.

POR

José Luis MALO ECHEVARRIA y Benito REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

En el primer trabajo sobre producción de ácido cítrico por fermentación, Malo & Regueiro (1957) decían que pocas variaciones se habían realizado en los métodos de Currie (1917), hasta la aparición de la técnica de fermentación en sumergido por Perquin (1938). Los numerosos autores que habían estudiado esta fermentación únicamente estudiaban las variables o factores en relación con el microorganismo medio de fermentación o factores físicos con que trabajaba cada uno. Este fue también el objetivo de nuestros anteriores trabajos (1958, 1958 a).

Los problemas que hemos visto en la fermentación en superficie, con medio sintético, también se presentan en la fermentación en sumergido, aparte otros que afectan a la aireación. Por tanto, se hace preciso reinvestigar todos los factores, para adaptarlos a las nuevas condiciones de crecimiento y en las condiciones en que nosotros trabajamos.

Desde luego, la fermentación en sumergido presenta evidentes ventajas sobre la superficial, sobre todo en lo fundamental de producción del producto a obtener en la fermentación. Por esta razón todas las fermentaciones de tipo aerobio tienden a realizarse por este método, a no ser que se opongan razones económicas.

De todas maneras, siempre es conveniente el estudiar los factores o variables en las dos formas de crecimiento.

En el presente trabajo se estudian los factores que en la fermentación en superficie hemos encontrado como más fundamentales en la producción.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Como decíamos antes, después de los trabajos de Currie (1917), poco original encontramos sobre producción de ácido cítrico por fermentación, hasta la aparición de la tesis doctoral de L. H. C. Perquin (1938) en Delft (Holanda).

Aplica este autor el método introducido por Kluyver & Perquin (1933), de cultivo de microorganismos en sumergido, a la producción de ácido cítrico. Como dicho trabajo fue publicado en holandés, recibió poca atención, aunque representa el trabajo fundamental sobre producción de ácido cítrico en fermentación sumergida, por lo cual es necesario su conocimiento.

Después del anterior trabajo, encontramos como más importantes los de Karow & Waksman (1947) y Shu & Johnson (1948). A partir de éstos se han publicado otros que veremos más adelante.

Para sistematizar algo esta revisión vamos a tratar aquí sólo de los trabajos de producción de ácido cítrico en fermentación sumergida, sobre medio sintético y en escala de laboratorio, tratando por orden los factores: microorganismo, medio de fermentación y factores físicos.

Microorganismos.

Puede decirse, en términos generales, que hongos que producen ácido cítrico en superficie también lo producen en sumergido, aunque esto se admite con ciertas reservas. La capacidad de producción varía mucho de unas razas a otras; así Perlman (1949), estudiando setenta razas de *Aspergillus niger* de orígenes diferentes, observa que todas dan ácido cítrico, pero solo unas pocas en cantidad remunerable (se considera como tal, la que produce más de un 50 % de conversión). Esto indica que fisiológicamente unas razas deben ser diferentes de otras. Encuentra el autor como mejores las esporas jóvenes, cuya conservación conviene sea a baja temperatura.

El fenómeno de "variación biológica" que vimos cuando hablamos de la fermentación en superficie, también ocurre en la fermentación en sumergido, lo cual también aquí indica que una colonia es una mezcla de razas originadas por variaciones naturales. Por selección pueden separarse unas razas de otras, que aunque no difieran morfológicamente, sí varían en su capacidad de producción de ácido cítrico.

El método de selección de razas productoras de ácido cítrico, por mutaciones inducidas, tuvo poco éxito; sin embargo James & Rubbo & Gardner (1956), consiguen por irradiación ultravioleta y rayos X, a partir de la raza de *Aspergillus niger* 72-4 Wis., unos mutantes que no sólo difieren en la capacidad de producir más ácido cítrico, sino también en sus caracteres morfológicos. Usan los métodos generales de Shu & Johnson (1947). En otro trabajo, Gadner & James & Rubbo (1956), indican un método de aislamiento de las razas productoras, sobre un medio indicador de acidez.

Shu & Johnson (1947), estudian el efecto del medio de esporulación, sobre la producción de ácido cítrico en fermentación sumergida. Utilizan un medio sintético con azúcar, sales inorgánicas y agar, al que añaden diferentes iones metálicos. Si en dicho medio se aumenta la cantidad de zinc, nitrato amónico y fosfato monopotásico, se retarda la esporulación, que en cambio se adelanta aumentando el manganeso o añadiendo extracto de malta. La presencia de manganeso en el medio de esporulación rebaja un 35 % la producción de ácido cítrico en fermentación.

Esto, en sumergido; en superficie no influye. En dieciocho pases sucesivos por medio de esporulación, no se observa cambio significativo en la actividad de la raza estudiada: "72-4 Wis."

Shu & Johnson (1948), estudian la interdependencia de los componentes del medio de fermentación, y Martín & Steel (1954) estudian la influencia del empleo de un inóculo vegetativo en vez de inóculo de esporas, observando que el tipo y cantidad del mismo influyen en los resultados finales.

Medio de fermentación.

Cuando se utiliza un medio sintético, su composición es: azúcar, sales inorgánicas e iones metálicos. También aquí influyen los "elementos traza", como vimos en la fermentación en superficie.

De azúcares se utilizan sacarosa, y glucosa sobre todo. La cantidad óptima es de 10-5 %; si se pone más, la fermentación se alarga y, por tanto, la eficiencia disminuye. Algunas razas de hongo no toleran cantidades elevadas de ácido cítrico, y entonces se precisa terminar antes las fermentaciones. Pero también si se pone en cambio poca cantidad de azúcar, como parte de él se utiliza en la formación de micelio y producción de energía, disminuye la cantidad correspondiente a la formación de ácido cítrico. El azúcar que se transforma en ácido cítrico se expresa en por ciento de conversión.

Shu & Johnson (1948) aconsejan tratar el azúcar para separar las impurezas metálicas.

Como fuente de nitrógeno se utilizan, en el medio de fermentación sintético, varios productos (nitratos, sales amónicas, aminoácidos, etc.) sin observarse diferencias apreciables. Mientras no se conozca bien este factor, interesa siempre no poner exceso de nitrógeno en los medios.

Shu & Johnson (1948) estudian la influencia de las sales inorgánicas, encontrando como mejor fuente de nitrógeno el nitrato amónico al 0,25 %, y como necesario, el sulfato magnésico, que por debajo de 0,05 por 100 da rendimientos muy bajos. El fosfato también es necesario, y no solo como *buffer* o alimento, pues se observa una mayor producción de ácido cítrico cuando se añade más fosfato del necesario para el crecimiento.

En cuanto a los iones metálicos, quizás sean el factor del medio de fermentación que más influyen en la formación del ácido cítrico. Esta es la razón por la que fueron estudiados por numerosos autores, axistiendo grandes divergencias entre ellos, quizás sobre todo debido al empleo de razas de hongos diferentes.

En el trabajo mencionado de Shu & Johnson (1948), se estudia la producción de ácido cítrico en relación con los iones metálicos, viendo que el hierro y zinc eran necesarios para el crecimiento aunque su nivel variaba con la raza utilizada. Dan la hipótesis de que el ácido cítrico se acumula cuando ciertos componentes (por ejemplo, los iones metálicos) de los sistemas enzimáticos se encuentran a un nivel por debajo del normal. Así el zinc y el hierro, en cantidad inferior a la precisa para el crecimiento, hacen aumentar la cantidad de ácido cítrico. Sin embargo, si esta concentración de metales baja mucho, la utilización de azúcar se hace muy pobre y no se forma tanto ácido cítrico.

Karow & Waksman (1947) encuentran que el zinc y manganeso son necesarios para la producción de ácido cítrico.

También Karow & Waksman (1947) dicen que la adición al medio de suplementos orgánicos inhibe la producción de ácido cítrico, en las condiciones en que ellos los emplean, aun cuando se aumenta el crecimiento del hongo.

Como en la fermentación en superficie, Moyer (1953) estudia el efecto del metanol en la producción de ácido cítrico en sumergido, encontrando que varias razas de hongo producen bastante ácido cítrico, cuando se añade metanol a un medio con cantidades elevadas de iones metalicos.

Factores físicos.

Muchos, son los mismos que hemos visto en la fermentación en superficie, pero otros intervienen debido a la nueva técnica utilizada. Entre los estudiados por diferentes autores tenemos los siguientes:

La esterilización no es factor muy importante, debido a que como dijimos anteriormente el pH que se utiliza hace difíciles las contaminaciones. Steel & Lentz & Martín (1955), observan que la fermentación es sensible a los cambios de las condiciones de esterilización. Un aumento en la presión no influye, pero un aumento en el tiempo de la misma puede variar resultados, aunque éstos afectan más a la morfología que a la producción. También observan variación según el tiempo de enfriamiento de la esterilización. Malo & Regueiro (1957) estudian estos factores en superficie, no encontrando tales variaciones.

También Steel & Lentz & Martín (1955) estudian la influencia del pH inicial, encontrando que el óptimo es 7.0 en las condiciones en que trabajan. En cambio Shu & Johnson (1948) utilizan un pH inicial de 3.8, y que si se eleva más, se acorta el tiempo de fermentación, aunque no hay reducción de producción de ácido cítrico.

En la temperatura de fermentación, casi todos los autores utilizan de 25° a 28°, aunque ésta varía también según la raza utilizada. Steel & Lentz & Martín (1955) encuentran el óptimo a 31° en las condiciones que ellos utilizan.

El factor que diferencia la técnica de sumergido de la de superficie es la aireación. Como la fermentación cítrica es de tipo aerobio, se

comprende que cuantas más células estén en contacto con el oxígeno del aire, más metabolismo y más producción de sustancias se producirán.

En la fermentación superficial, solamente una capa de células está en contacto con el oxígeno disuelto en el medio (que es el único que pasa a la célula), mientras que en el método sumergido en micelio ocupa todo el volumen de medio y el oxígeno se disuelve en mayor proporción, debido a la aireación y agitación del medio por diferentes métodos.

En escala de laboratorio, los matraces con el medio se ponen encima de unas mesas de agitación, que al mover violentamente los matraces hacen que el aire filtrado se mezcle con el medio y el oxígeno se disuelva en mayor proporción en todo el volumen.

Shu & Johnson (1948) observan las diferencias en este factor, según se agite en rotación o en vaivén, observando que la única diferencia es el tiempo de fermentación, que en el primer caso es de doscientas horas, y en el segundo de doscientas ochenta horas.

Shu (1953) estudia la importancia de la aireación en la producción de ácido cítrico, encontrando que si el medio se airea con aire se produce un 42 % de conversión; si la aireación es con oxígeno, esta conversión sube al 70 %. Mayor rendimiento se logra si el gas de aireación contiene anhídrido carbónico.

METODOS

A lo largo de este trabajo se ha empleado el mutante: *Aspergillus niger* 72-4 (13), que se conserva en tierra por el método indicado en nuestro primer trabajo.

También indicamos allí la técnica de inducción de mutaciones por radiaciones ultravioleta, que se realiza en una parte de este trabajo. Los medios de esporulación y de fermentación son los mismos indicados para superficie.

Con relación a la técnica de fermentación sumergida, utilizamos matraces Erlemmeyer de 500 c. c. de capacidad con 50 c. c. de medio de fermentación. Estos matraces se colocan en un aparato de agitación de vaivén, al que un motor de un HP. da 90 golpes por minuto con un recorrido de 10 cm. El aparato va dentro de una cámara de 28° (fig. 1).

Para buscar las condiciones óptimas de aireación, se hace necesario el determinar cuáles son aquéllas en las que se disuelve más oxígeno en el medio; ésto lo hacemos utilizando matraces de diferentes tamaños y con cantidades diferentes de medio.

El oxígeno disuelto puede determinarse por varios procedimientos, pero encontramos como más sencillo para nuestro objeto el método de Cooper & Fernstrom & Miller (1944) de oxidación del sulfito.

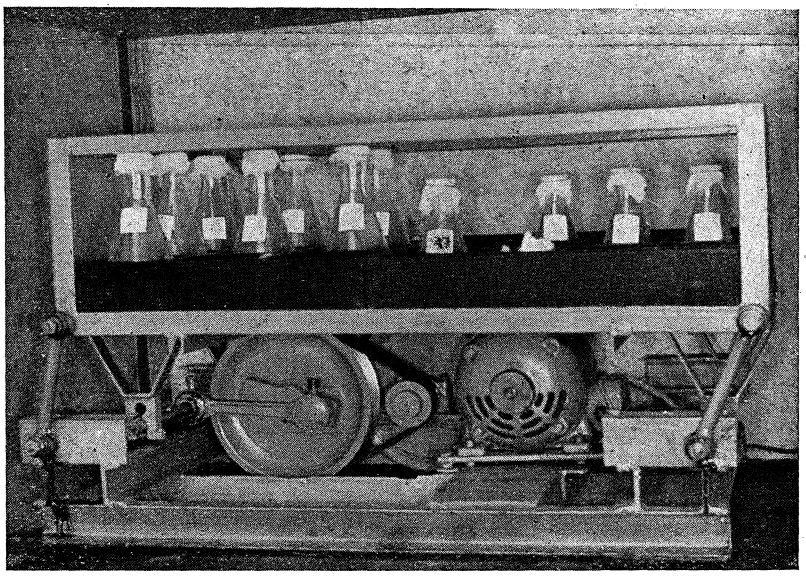


FIGURA 1

En los matraces pone, en vez de medio, una solución de sulfito que se pone en agitación; a intervalos de tiempo se toman cinco c. c. de muestra, se le añade una solución yodo-yodurada y el exceso de yodo titula con thiosulfato; el gasto de éste aumenta con el tiempo de aireación, pues cada vez hay menos sulfito que reaccione con yodo y, por lo tanto, hay más yodo libre. Se ponen controles de matraces con solución de sulfito sin agitar.

Resultados obtenidos en unas pruebas son los que se indican en la figura 2.

El factor que más afecta a la aireación de un medio es el del crecimiento del hongo; es decir, el micelio. Por esta razón, para completar este estudio del factor oxígeno disuelto, realizamos una experiencia igual a la anterior, pero en presencia de micelio que se recoge procedente de una fermentación en sumergido y que se lava con agua en un embudo Buchner. Se prepara una suspensión del mismo y añade en dife-

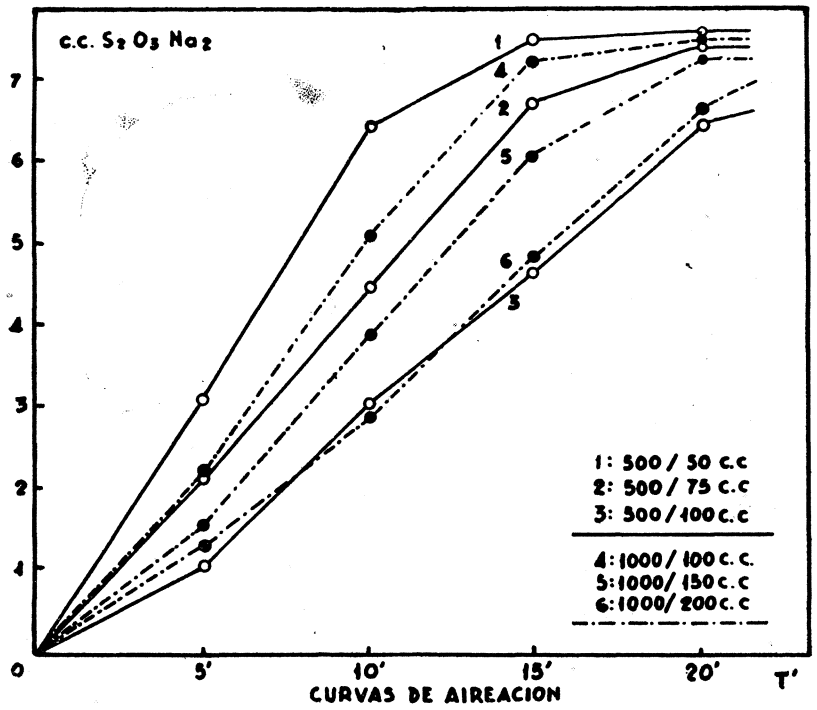


FIGURA 2

rentes cantidades a varios matraces de 500 c. c. que contienen un volumen final de 50 c. c. de solución de sulfito.

Observando los resultados obtenidos que se dan a continuación, se nota que la aireación en todos los casos es muy parecida, sin que la cantidad de micelio parezca que ejerce influencia alguna, aunque desde luego su presencia frena la aireación haciendo la disolución de oxí-

geno más lenta. Esto puede verse en el cuadro siguiente, que indica los gastos en c. c. de tiosulfato:

	5'	10'	15'	20'	25'
Micelio: 0,0 %	4,6	5,6	6,0	6,2	6,5
" 2,0 %	3,3	3,6	3,7	3,8	4,0
" 4,0 %	3,1	3,7	4,0	4,2	4,2
" 6,0 %	3,1	3,9	3,9	4,0	4,0
" 8,0 %	3,2	3,2	4,0	3,9	3,9
" 10,0 %	2,9	3,5	3,6	3,5	3,5 .

Los resultados de la fermentación se observan por determinaciones en muestras que se realizan a los diez días de fermentación. El volumen de micelio se hace por centrifugación de 10 c. c. en tubo de la misma capacidad, a 2.500 r. p. m.; durante diez minutos, se lee el tanto por ciento del sedimento. El pH se determina en modelo Beckman G. El azúcar remanente se determina por la técnica de Shaffer Somoggi (1933). La acidez titulable, por el método usado por Karow & Waksman (1947). La separación de elementos traza por la oxina, por el método usado por Chesters & Rolinson (1951).

Por último, se hace determinación colorimétrica de ácido cítrico, por el método de Perlman & Lardy & Johnson (1944), encontrándose en todos los casos que coincide con la determinación de acidez titulable, lo cual indica que todo el ácido que se forma en las fermentaciones realizadas es ácido cítrico.

RESULTADOS

1.º *Influencia del agua del medio de fermentación.*

Se trata de ver la influencia que tiene el agua en la que se diluyen los componentes del medio sintético de fermentación, en la producción de ácido cítrico en sumergido. Las técnicas y métodos son los indicados en la parte correspondiente, y las variables son: 1, medio preparado con agua destilada; 2, medio preparado con agua corriente.

Los resultados se indican en la figura 3.

En agua destilada, el pH es más bajo, se produce menos micelio, la utilización de azúcar es más lenta, pero en cambio la formación de ácido cítrico es tres veces superior a cuando se emplea agua corriente.

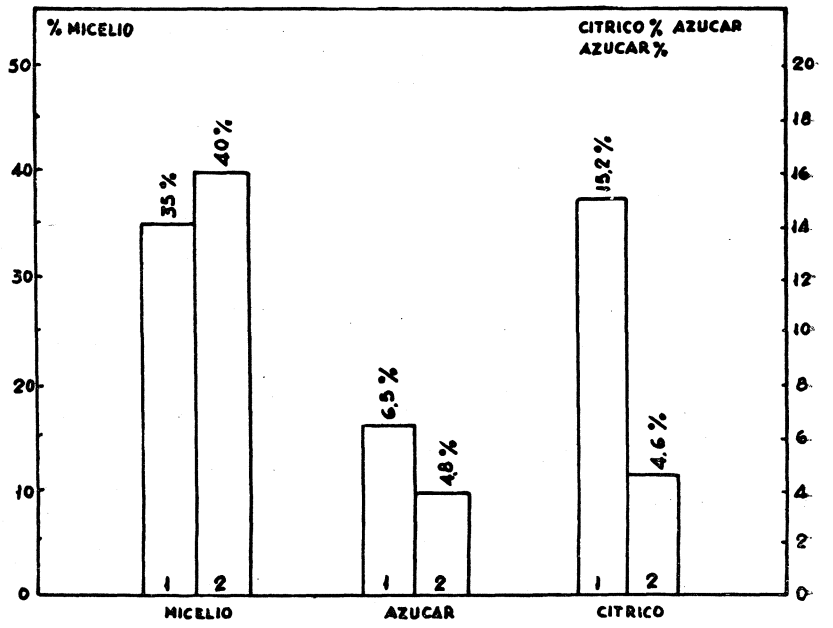


FIGURA 3

2.° *Influencia del tratamiento por 8-hidroxiquinolina.*

Interesa ver si la fermentación sumergida produce, el tratamiento por oxina, los mismos resultados que en la fermentación en superficie. El azúcar disuelto en agua destilada se trata por la oxina y después se añaden las sales inorgánicas. Se usa un control (I) preparado igualmente, pero sin tratamiento. A los diez días los resultados obtenidos se expresaron según se ve en la figura 4.

En el medio tratado por la 8-hidroxiquinolina (oxina), el pH es más bajo, la producción de micelio es menor, el consumo de azúcar muy bajo y la formación de ácido cítrico es casi la mitad de la que se produce en el medio control, sin tratamiento.

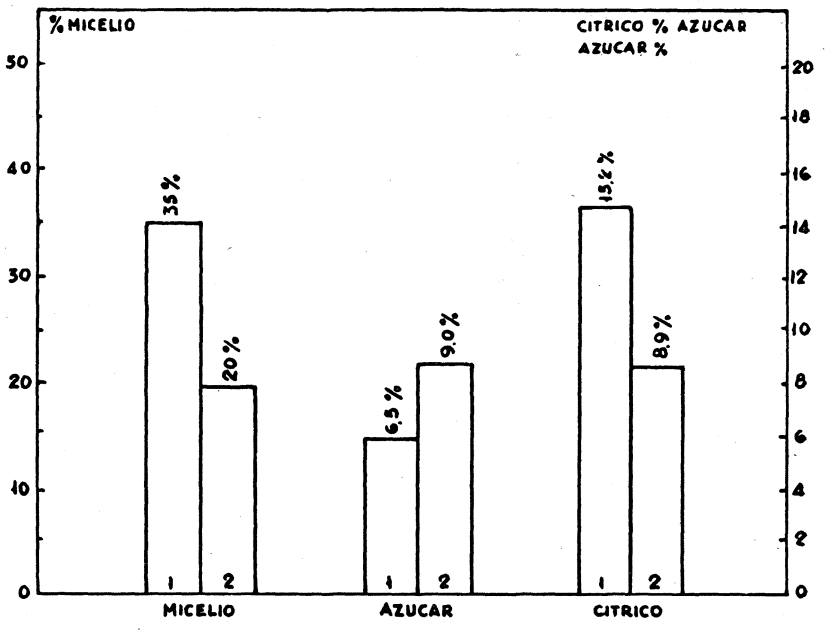


FIGURA 4

3.° *Relación entre el azúcar y la falta de iones metálicos.*

En medio basal, preparado con agua destilada y sales inorgánicas, se estudia la influencia de la fuente de carbono (sacarosa y glucosa) y al tiempo la falta de alguno de los iones metálicos, según el cuadro siguiente:

Matraz	Zinc	Cobre	Hierro	Manganeso
1	25	6	130	10
2	—	6	130	10
3	25	—	130	10
4	25	6	—	10
5	25	6	130	—

Estas cifras expresan gammas /100 c. c. de medio de fermentación. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Matraz	pH	Volumen micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	% conversión
Sacarosa:					
1	2.35	60 %	6,10 %	1.197 mgs.	8,5 %
2	2.05	40.%	8,70 %	1.301 "	9,2 %
3	2.65	50 %	5,50 %	416 "	2,9 %
4	2.55	50 %	7,90 %	520 "	3,6 %
5	2.55	40 %	5,20 %	937 "	4,4 %
Glucosa:					
1	2.65	35 %	3,30 %	468 mgs.	3,3 %
2	2.80	40 %	4,40 %	364 "	2,6 %
3	2.75	60 %	6,40 %	416 "	2,9 %
4	2.50	60 %	6,40 %	832 "	5,9 %
5	2,70	40 %	5,30 %	364 "	2,6 %

Comparando estos resultados se observa que, en general, el pH final es algo más elevado en el caso de utilizarse glucosa. En cuanto a los resultados de producción de micelio, los resultados pueden considerarse parecidos en todos los casos. En cuanto a la utilización de azúcar (sacarosa y glucosa), en general es mayor en el caso de la glucosa, aunque en este caso la ausencia de cobre y hierro hace disminuir dicho consumo, lo que en el caso de la sacarosa producen el zinc y el hierro. En cuanto a la producción de ácido cítrico, es mayor en el caso de emplear sacarosa, sobre todo empleando todos los metales o solamente el zinc; utilizando glucosa, se aumenta un poco en ausencia del hierro.

4.° *Influencia del zinc en la fermentación sumergida.*

Como habíamos visto en la producción de ácido cítrico en superficie, un aumento de producción del mismo cuando se añadía zinc al medio basal, tratamos de ver si esto mismo ocurre en la fermentación en su-

perficie y asimismo si esta influencia es cuantitativa. Hemos obtenido los resultados siguientes:

Matraz	pH	Volumen micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	% conversión
00,0 Zn/cc.	2.45	40 %	9,90 %	625 mgr.	4,4 %
12,5 "	2.55	37 %	7,30 %	521 "	3,7 %
25,0 "	2.50	45 %	9,00 %	416 "	2,9 %
37,5 "	2.37	65 %	9,10 %	572 "	4,0 %
50,0 "	2.50	60 %	8,40 %	465 "	3,3 %

Se observa que el zinc casi no afecta a la utilización de azúcar y formación de ácido cítrico; en cambio. sí parece que aumenta la producción de micelio (fig. 5).

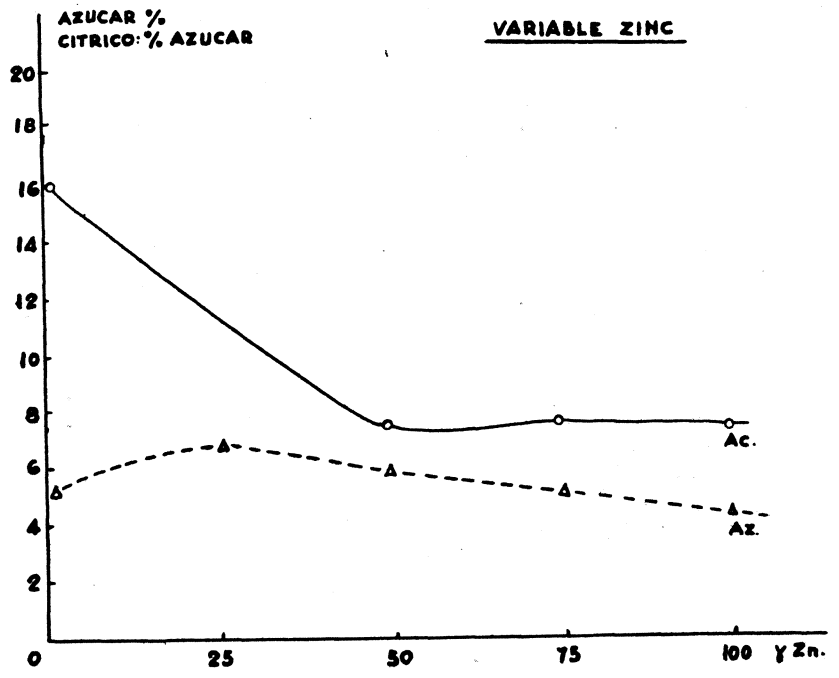


FIGURA 5

5.º *Influencia de otros iones metálicos en la fermentación sumergida.*

Ampliando la experiencia anterior, probamos la posible influencia del cobre, hierro y manganeso (además del zinc) en la producción de ácido cítrico y de forma también cuantitativa. Las cantidades que se añaden por 100 c. c. de medio y los resultados obtenidos se pueden ver en las figuras 6-8.

En todos los casos, la producción de micelio (40-50 %) no parece sea sensiblemente influída por los metales, ni sus cantidades. Tampoco influye mucho la utilización de azúcar, como puede observarse en las curvas correspondientes. En cuanto a la formación de ácido cítrico, en el caso del zinc disminuye a medida que aumenta aquél, manteniéndose igual a partir de la adición de 50 gammas/100 c. c. El cobre y manganeso casi no afectan la formación de ácido cítrico, y el hierro hace disminuir su formación a medida que se adiciona más cantidad.

6.º *Influencia del metanol.*

Vista su influencia en la fermentación en superficie, se prueba su acción en la fermentación sumergida, y los resultados se expresan en la figura 9.

En una prueba preliminar se había observado que el metanol es el alcohol de bajo peso molecular que mejores resultados producía, pues el etanol, daba más bajo rendimiento y los demás tenían cierto efecto tóxico sobre la formación de ácido cítrico. El pH y el volumen de micelio van bajando a medida que aumenta la concentración de metanol; la utilización de azúcar casi no varía; en cambio, la formación de ácido cítrico llega ser máxima con 5 % de metanol (17,4 %).

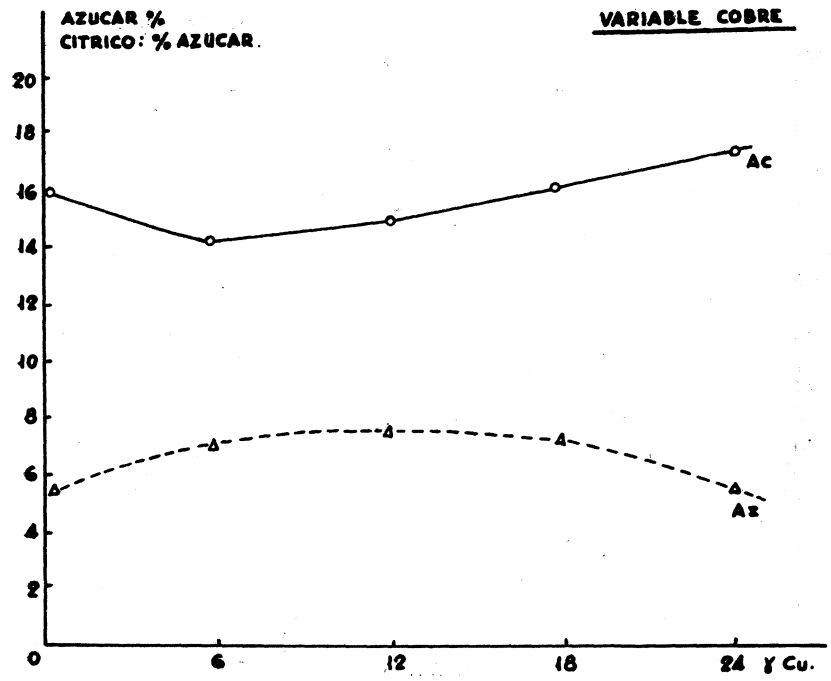


FIGURA 6

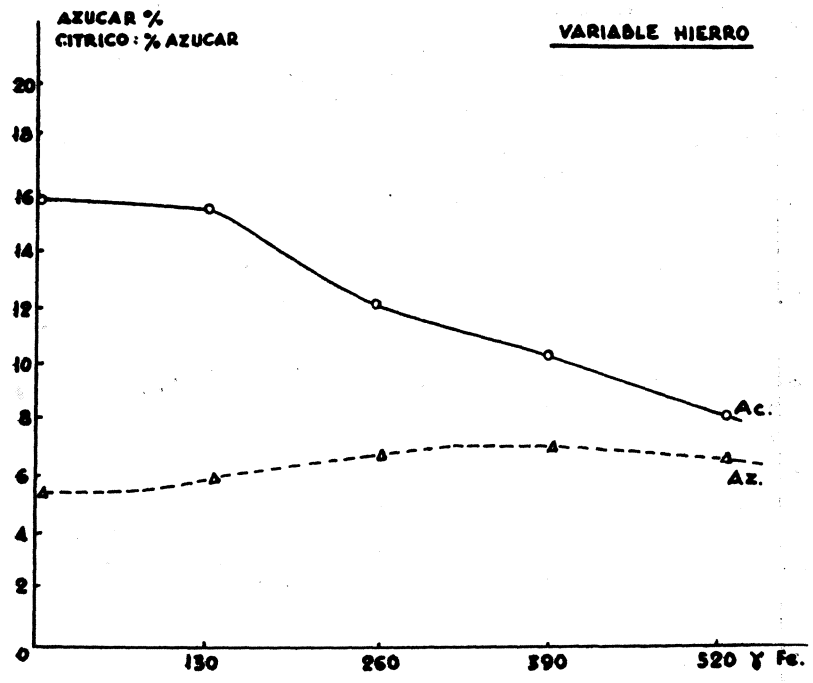


FIGURA 7

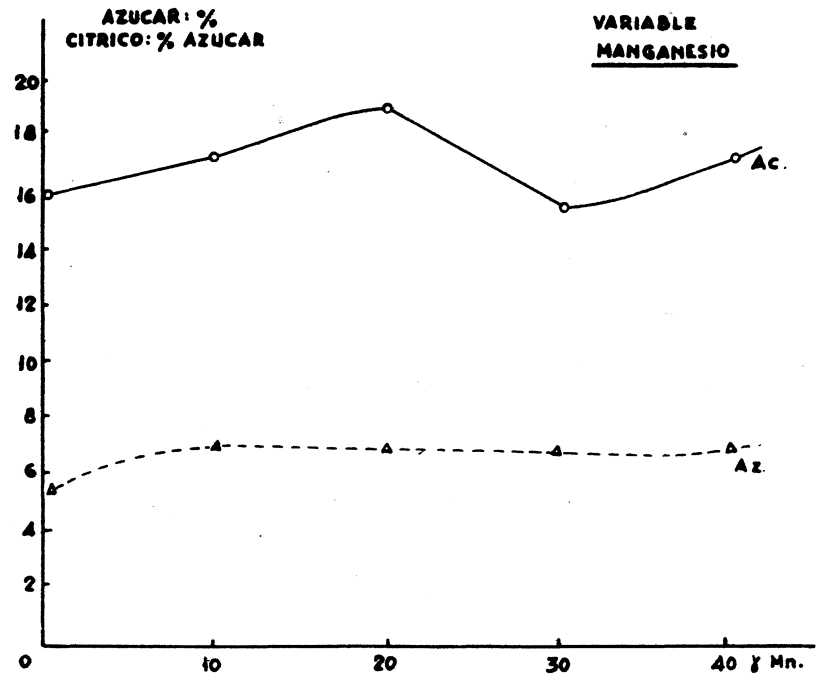


FIGURA 8

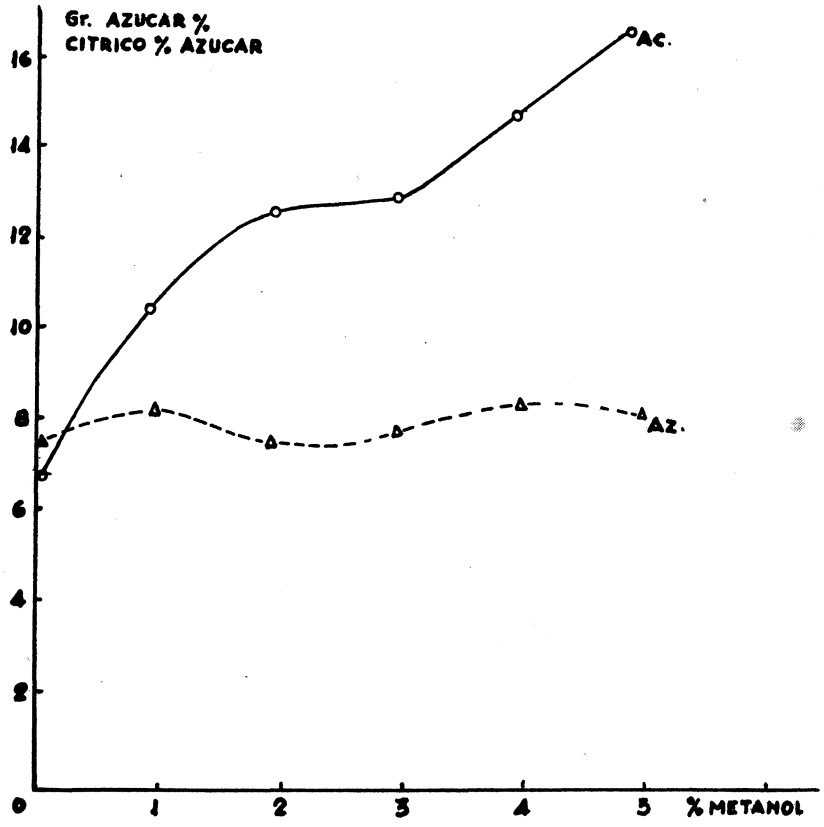


FIGURA 9

7.° *Relación entre metanol y los iones metálicos.*

Se estudia aquí la influencia de la presencia o ausencia de los iones metálicos en presencia de metanol (al 4 % y 5 %), según el cuadro siguiente:

Matraz	Zinc	Cobre	Hierro	Manganeso
1	—	—	—	—
2	—	6	130	10
3	25	—	130	10
4	25	6	—	10
5	25	6	130	—
6	25	6	130	10

Estas cifras son gammas por 100 c. c. de medio. Se hace en medio basal con agua destilada. Los resultados son los siguientes:

Matraz	pH	Volumen micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	% conversión
4 % *metanol*:					
1	1.90	25 %	9,40 %	989 mgr.	7,0 %
2	1.95	30 %	9,70 %	989 "	7,0 %
3	2.45	40 %	4,30 %	1.666 "	11,9 %
4	2.30	55 %	5,70 %	2.394 "	17,1 %
5	2,35	40 %	4,30 %	2.394 "	17,1 %
6	2.35	35 %	4,50 %	2.080 "	14,8 %
5 % *metanol*:					
1	1.80	20 %	10,20 %	937 mgr.	6,6 %
2	1.90	25 %	9,60 %	1.041 "	7,4 %
3	2.50	40 %	4,50 %	937 "	6,6 %
4	2.30	55 %	4,00 %	1.041 "	7,4 %
5	2,40	45 %	4,70 %	2.394 "	17,1 %
6	2.40	45 %	4,90 %	1.613 "	11,5 %

En ambos casos, la ausencia de todos los metales o solamente del zinc hace disminuir la producción de micelio; en cambio la ausencia de hierro lo aumenta.

También con las dos concentraciones de metanol, la utilización del azúcar disminuye, cuando faltan todos los metales o solamente el zinc.

En cuanto a la producción de ácido cítrico, con un 4 % de metanol, disminuye cuando faltan todos los metales o solamente zinc y es mayor en ausencia de hierro o manganeso. Cuando se pone un 5 % de metanol, la formación de ácido cítrico sólo aumenta en ausencia del manganeso y baja en todas las demás ausencias de uno o todos los metales.

8.° *Mutantes ultravioleta en fermentación sumergida.*

Los mutantes ultravioleta obtenidos según la técnica vista en nuestro primer trabajo sobre la producción de ácido cítrico y probados en fermentación en superficie, se tratan ahora de probar para ver si las condiciones de fermentación sumergida les son más favorables.

En este caso se utiliza un medio basal, preparado con agua destilada y con 25 gammas de zinc por 100 c. c. de medio. Se prueban cinco mutantes, en ausencia y en presencia de 4 % de metanol. Los resultados se expresan a continuación:

Colonia	pH	Volumen micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	% conversión
Sin metanol:					
1	2.45	55 %	5,80 %	1.588 mgr.	11,3 %
2	2.50	50 %	5,50 %	1.423 "	10,1 %
3	2.50	55 %	4,60 %	1.468 "	10,5 %
4	2,50	45 %	5,20 %	1.314 "	9,3 %
5	2.70	40 %	4,40 %	1.150 "	8,2 %
4 % *metanol*:					
1	2.50	50 %	7,30 %	2.354 mgr.	16,8 %
2	2.40	40 %	6,10 %	2.190 "	15,6 %
3	2.40	45 %	6,20 %	2.245 "	16,0 %
4	2.65	35 %	6,40 %	1.916 "	13,6 %
5	2.50	50 %	5,70 %	2.573 "	18,3 %

Se observa que las cinco mutantes ultravioleta dan, en un medio normal, parecida producción de micelio y utilizan sensiblemente la misma cantidad de azúcar; en cambio la formación de ácido cítrico, aunque baja, varía entre 8,2 % y 11,3 % de conversión.

Si esto mismo se hace en un medio con un 4 % de metanol, en todos los casos, el pH y la producción de micelio es parecida, pero la utilización de azúcar es menor que en el caso anterior con todas las colonias, y la formación de ácido cítrico varía entre 13,6 % y 18,3 %, no siendo correlativa con las obtenidas en medio normal.

DISCUSION

Como puede observarse, las experiencias aquí realizadas en sumergido se han realizado anteriormente en superficie. Lo primero que interesa en la fermentación en sumergido es fijar las condiciones óptimas de aireación, y realizado esto, vemos que en el agitador por nosotros utilizado el empleo de matraces de 500 c. c. con 50 c. c. de medio es en donde se consigue una mayor disolución de oxígeno.

Como en la fermentación en superficie, probamos antes el efecto que tiene el tipo de agua (destilada o corriente) en la producción de ácido cítrico. Como en aquel caso, el empleo de agua corriente da lugar a una mayor producción de micelio y utilización de azúcar, pero a diferencia de aquélla, se produce mucho menos ácido cítrico.

Como en el caso de la fermentación en superficie, el tratamiento por la 8-hidroxiquinolina (oxina), da lugar a una menor producción de micelio, utilización de azúcar y formación de ácido cítrico, seguramente por las causas que Block (1955) y Malo & Regueiro (1958), encuentran de que en el agua de tratamiento queda alguna actividad antifúngica.

Lo mismo que en fermentación en superficie, el empleo de sacarosa en sumergido da lugar a mayor producción de ácido cítrico que la glucosa, aún cuando la utilización de azúcar es menor, pero a diferencia de aquélla la sacarosa produce también una mayor cantidad de micelio.

Cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono, la ausencia de cobre, hierro y manganeso da lugar a una disminución de la eficiencia de la fermentación en cuanto al consumo de azúcar y formación de ácido cítrico. Estos resultados no están de acuerdo con los de otros autores y con los obtenidos por nosotros en la fermentación en superficie.

Habiendo visto el efecto beneficioso que producía la adición de zinc en la fermentación en superficie, tratamos de ver si este efecto también se produce en sumergido, sin lograrlo a pesar de hacerlo de forma cuantitativa. Esto demuestra que el metabolismo del hongo no es idéntico en una y otra forma de fermentación. Sin embargo, el zinc favorece la producción de micelio también en sumergido.

Habíamos visto en la fermentación en superficie que el cobre, hierro y manganeso no efectaban cuantitativamente a la producción de micelio, utilización de azúcar y formación de ácido cítrico, lo cual sí era aumentado por el zinc. En la fermentación en sumergido, el micelio parece que no es afectado por ninguno de los cuatro metales, así como tampoco la utilización de azúcar. En cuanto a la formación de ácido cítrico, el zinc y el hierro la disminuyen; el primero, hasta 50 gammas/c. c., y el segundo, de forma progresiva, a medida que se añade más cantidad.

Moyer (1953) también había estudiado el efecto de los alcoholes en fermentación sumergida; nosotros probamos el efecto del metanol, encontrando un incremento en producción de ácido cítrico a medida que aumentamos la cantidad de metanol, llegando a ser óptima a un 5 % del alcohol (17,4 %), aunque desde luego mucho menos que lo obtenido en fermentación en superficie.

Viendo si existe alguna relación entre el metanol y los iones metálicos, la ausencia de zinc hace disminuir el micelio, que aumenta en ausencia del hierro. La utilización de azúcar también disminuye si falta zinc. En cuanto a la formación de ácido cítrico, aumenta en ausencia del hierro y manganeso, con un 4 % de metanol y solo de manganeso con un 5 % de metanol. Esta formación disminuye mucho cuando falta zinc en el medio.

Por los métodos indicados en nuestro primer trabajo, aislamos cinco colonias mutantes por radiación ultravioleta y las probamos en ausencia y presencia de metanol. En general, producen más en sumergido que en superficie, en ausencia de metanol, aún cuando no existe relación en el consumo de azúcar o formación de ácido cítrico. El metanol incrementa la formación de ácido cítrico en todos los casos, disminuyendo la utilización de azúcar.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la influencia de diversos factores, sobre la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida, de un medio sintético y por acción del *Aspergillus niger* 72-4 (13).

Se encuentra la conveniencia del empleo de agua destilada y sacarosa y el evitar el empleo de oxina para separar los iones metálicos. Se encuentra que en este medio sintético es perjudicial la adición de zinc y hierro que disminuyen la eficiencia de la fermentación. La adición de un 5 % de metanol hace aumentar la formación de ácido cítrico, pero en mucha menor proporción que en la fermentación superficial; dicha formación se mejora en ausencia de manganeso.

SUMMARY

In this paper we study the influence of different factors on the production of citric acid by submerged fermentation of a synthetic medium and by the action of *Aspergillus niger* 72-4 (13).

We found the convenience of the use of distilled water and sacarose and avoiding the use of oxine to separate metallic ions. We found that in this sythetic medium the addition of zinc and iron is pernicious as it decreases the afficiency of fermentation. The addition of 5 % metanol helps to increase the formation of citric acid but in a much smaller proportion than with superficial fermentación; this formation can be improved in absence of manganese.

BIBLIOGRAFIA

S. S. Block. 1955. J. Agr. Food Chem. 3. 229.

C. G. C. Chesters & G. N. Rolinson. 1951. J. Gen. Microbiol. 5. 553.

C. M. Cooper & G. A. Fernstrom & S. A. Miller. 1944. Ind. Eng. Chem. 36. 504.

J. N. Currie. 1917. J. Biol. Chem. 31. 15.

J. F. Gardner & L. V. James & S. D. Rubbo. 1956. J. Gen. Microbiol. 14. 228.

L. V. James & S. D. Rubbo & J. F. Gardner. 1956. J. Gen. Microbiol. 14. 223.

E. O. Karow & S. A. Waksman. 1947. Ind. Eng. Chem 39. 821.

A. J. Kluyver & L. H. C. Perquin. 1933. Biochem. Zeits. 266. 68.

J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1957. Microbiol. Española. 10. 425.

J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1958. Microbiol. Española.
J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1958 a. Microbiol. Española.
S. M. Martín & R. Steel. 1954. Can. J. Microbiol. 1. 470.
A. J. Moyer. 1953. Appl. Microbiol. 1. 1.
D. Perlman & H. A. Lardy & M. J. Johnson. 1944. Ind. Eng. Chem. 36. 515.
D. Perlman. 1949. Proc. IV Congr. Int. Microbiol. pág. 546.
L. H. C. Perquin. 1938. Bijdrage tot de kemos der oxydative dissimilalie van *Aspergillus niger* van Tieghem. Tesis.
Shaffer & Somogyi. 1942. Polarimetry, Saccharimetry of Sugars. pág. 196.
P. Shu. 1953. J. Agr. Food. Chem. I. III 9.
P. Shu & M. J. Johnson. 1947. J. Bacteriol. 54. 161.
P. Shu & M. J. Johnson. 1948. Ind. Eng. Chem. 40. 1202.
P. Shu & M. J. Johnson. 1948 a. J. Bacteriol. 56. 577.
R. Steel & C. P. Lentz & S. M. Martín. 1955. Can. J. Microbiol. 1. 299.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
INSTITUT DE BOTANIQUE GENERAL DE L'UNIVERSITE DE GENEVE
LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET DE FERMENTATIONS

ETUDES SUR LA PERIODICITE DES TYPES D'ECHANGES GAZEUX CHEZ UNE LEVURE: *KLOECKERA APICULATA (Rees emend. Klöcker)* Janke.

PAR
Fernand CHODAT et Carlos RAMIREZ GOMEZ (*)

I) INTRODUCTION

Les recherches qui font l'objet du présent article ont été entreprises pour élucider l'énigme du comportement imprévisible d'échantillons de levures dont on mesure les échanges gazeux.

Toutes conditions expérimentales étant —ou paraissant— par ailleurs égales, la population de levures manifeste tantôt des intensités croissantes, tantôt des intensités décroissantes de ces échanges gazeux. Cette irrégularité ayant été surtout observée au cours d'exercices de démonstration, il nous a paru nécessaire d'effectuer une recherche systématique en vue d'identifier les facteurs supposés responsables de ces variations. Une analyse minutieuse du problème a successivement mis hors de cause l'influence des facteurs externes mesurables. L'étude de ces phénomènes, renouvelée au cours du temps de vie d'une population de levures nous a conduits à une interprétation toute nouvelle:

Périodicité d'un même cycle physiologique.

La notion des rythmes manifestés par les végétaux et les animaux et l'étude des phénomènes biologiques rythmiques est revenue à l'ordre du jour, grâce aux travaux de Bünning et de son école.

(*) Travail réalisé au laboratoire de Microbiologie et Fermentations de l'Institut de Botanique Générale de l'Université de Genève durant l'année 1958.

Quelques publications de caractère général (Reinberg et Ghata, 1957), (Bünning, 1953) et plusieurs travaux de recherche (Keitman, 1949), (Baillaud et Courtot, 1955) et (Baillaud, 1958) ont été publiés sur les rythmes biologiques.

Dans l'impossibilité de donner ici un aperçu de ce problème, nous nous bornerons à citer quelques définitions empruntées à l'article de Baillaud (1958).

Rythmes exogènes et rythmes endogènes.

"Un rythme biologique est *exogène* s'il se manifeste uniquement sous l'influence de conditions externes à caractère périodique, avec lesquelles il est nécessairement synchronisé".

"Un rythme est *endogène* s'il est susceptible de se manifester ou de se *conserver* sous des conditions externes uniformes, qu'il soit *spontané* ou induit préalablement par une ou plusieurs variations des conditions externes".

Nos essais tendent à prouver que les fluctuations enregistrées, de caractère périodique, appartiennent à la catégorie des *rythmes endogènes spontanés,* indiqués plus haut. Des exemples de ce genre de rythmes sont bien connus chez les plantes et les animaux supérieurs. Plus rares sont les démonstrations tirées de la biologie des microorganismes. Ces derniers sont certes plus faciles à cultiver dans des conditions précises, permettant une description statistique de leur cycle vital. Par contre, les microorganismes présentent une sensibilité très grande aux moindres variations du milieu ambiant et les traduisent par diverses expressions physiologiques et morphologiques. Cette résonance rend plus difficile la mise en évidence d'un rythme autonome chez ces êtres.

II) MÉTHODES

1) *Levure utilisée.*

Nous avons utilisé dans nos expériences d'échanges gazeux une souche de *Kloeckera apiculata* (Rees emend. Klöcker) Janke, provenant des laboratoires Hoffmann-La Roche & Cie. de Bâle (Suisse), où elle est

utilisée, sous le nom de *Kloeckera brevis* Lodder, pour le dosage des vitamines.

Biologie et morphologie.

En culture non agitée sur moût de bière, à 25° C., les cellules sont citriformes, ovoïdes, ovales ou allongées. Les dimensions moyennes sont: $(2 - 4{,}5)\ (5 - 8)\ \mu$. Après un mois à 17° C., il se forme un dépôt et un anneau mince.

Sur moût de bière gélosé, à 17° C., après un mois, la strie est de couleur jaune brunâtre, lisse et brillante.

Pseudomycélium absent sur pomme de terre gélosée.

Sporulation négative.

En étudiant expérimentalement son pouvoir de multiplication en moût de bière aéré, à 25° C., nous avons obtenu les résultats représentés par les courbes de la figure 1.

1) On observe que, dans les conditions expérimentales, par nous utilisées, la limite du temps d'expérimentation est de six heures. Celle-ci semble déterminée par le pH bas atteint au bout de cette période, lequel descend de 5,5 à 4,5, restant invariable à partir de ce moment.

2) Dans les mêmes conditions, les levures non rajeunies (culture d'un mois sur moût de bière gélosé), ont un pouvoir d'acidification beaucoup plus marqué que les levures rajeunies (culture de 24 heures sur moût de bière gélosé), puisque, leur nombre étant plus petit, elles atteignent l'acidité limite en même temps que les rajeunies.

3) Les levures non rajeunies multiplient par trois leur nombre initial au bout de six heures, tandis que les rajeunies le multiplient par 22.

Interprétation des résultats.

Les cellules rajeunies se multiplient abondamment, tandis que les vieilles concentrent leur activité dans un métabolisme d'échange.

On distinguera donc deux phases durant le temps de culture en moût de bière aéré:

a) *Phase de multiplication,* de six heures, limitée dans ce cas par l'acidification du milieu, exprimée par le pH 4,5.

b) *Phase d'inhibition de la multiplication,* allant de la sixième heure à la 24 ème.

Le rôle de ces deux phases sera examiné plus tard, dans le chapitre concernant la périodicité.

Propriétés physiologiques.

Fermentation:

Glucose	+	Maltose	—
Galactose...	—	Lactose	—
Saccharose	—		

Assimilation des sucres:

Glucose	+	Maltose	—
Galactose...	—	Lactose	—
Saccharose	—		

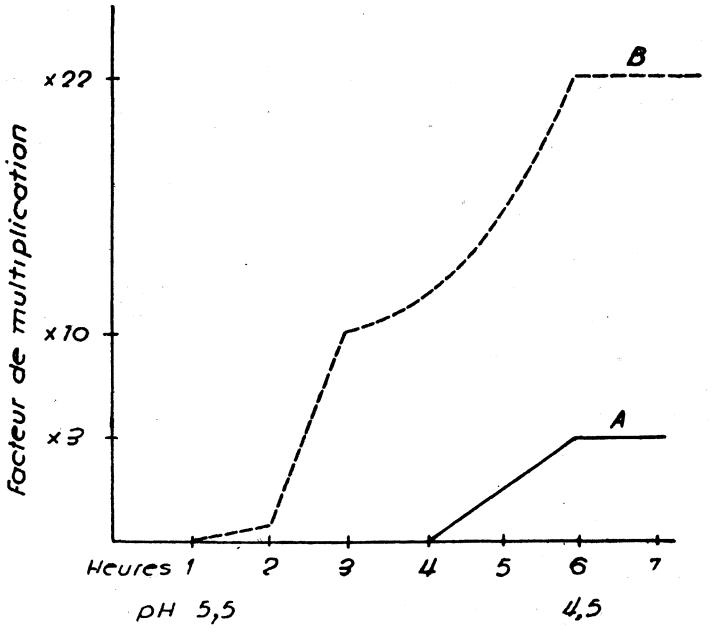


FIGURE 1

Graphique représentant la multiplication de Kloeckera apiculata *en moût de bière aéré à 25° C., durant six heures.*

La ligne à trait continu A représente la multiplication d'un échantillon de levure agée d'un mois. La ligne à trait discontinu B représente la multiplication d'un échantillon de levure rajeunie sur moût de bière gelosé, agée de 24 heures.

Assimilation du nitrate de potassium: négative.
Assimilation de l'éthanol: négative.
Hydrolyse de l'arbutine: négative (*).

Particularités physiologiques.

Nous donnons ci-dessous une liste des substances assimilables par *Kloeckera apiculata* citées par Wiles (1953), à laquelle nous ajoutons quelques métabolites essayés par nous (en italique).

Acide citrique	—	Acide lactique...	—
Célobiose	—	Lactose...	—
Ethanol...	—	Maltose...	—
Esculine	—	Mannitol...	—
Arabinose	—	Mélézitose	—
Dextrine...	—	Raffinose	—
Erythritol	—	Salicine...	+
Galactose...	—	Sorbitol...	—
Tréhalose	—	Xylose	—
Alfa-méthyl glucoside...	—	Gluconate de potassium	+
Acide cétogluconique...	—	Glucose...	+
Acide succinique	—	Rhamnose	—
Acétate de sodium.. ...	—	*Pyruvate de sodium* ...	—
Acétate de potassium...	—	*Pyruvate de calcium...*	—
Acétate de calcium ...	—	*Pyruvate de calcium...*	—
Gluconate de calcium...	+	*Acide aspartique*	—

En milieu liquide aéré à base de glucose, *Kloeckera apiculata* produit de l'acétate d'éthyle.

2. *Milieux utilisés.*

Milieu de multiplication.

Le milieu de multiplication employé a été du moût de bière, provenant de la fabrique du "Cardinal" de Fribourg (Suisse).

(*) Toutes ces épreuves ont été faites selon les méthodes de l'école hollandaise de J. Lodder et N. J. W. Kreger-Van Rij (1952).

Après avoir ajusté le pH à 5,5, le milieu est stérilisé à 115° C., durant 20 minutes, puis on le centrifuge stérilement, afin d'éliminer le trouble produit par floculation pendant la stérilisation à l'autoclave.

Milieux de mesure (*).

Nous avons utilisé deux milieux de mesure: A) *Milieu synthétique tamponné* (**). B) *Solution physiologique fortement tamponnée.*

Pour chacun de ces milieux, la source hydrocarbonée (acides aminés exclus), a varié: glucose, pyruvate, acétate, gluconate.

Dans le cas du milieu synthétique, on a également testé des milieux totalement dépourvus de ressources azotées (minérales et aminées).

Le tableau I résume les diverses conditions nutritives proposées à la levure pour sa respiration.

TABLEAU I

Conditions nutritives proposés à *Kloeckera apiculata* pour sa respiration.

N.°	Milieu synthétique azote	Milieu synth. sans azote	Solution physiologique
1	Glucose	—	—
2	Pyruvate	—	—
3	Acétate	—	—
4	Gluconate	—	—
5	—	Glucose	—
6	—	Acétate	—
7	—	—	Glucose
8	—	—	Pyruvate
9	—	—	Acétate
10	—	—	Gluconate

(*) C'est à dire: mesure des échanges gazeux dans l'appareil de Warburg.

(**) Le milieu synthétique à base d'acétate de sodium, légèrement tamponné (voir page 7) (*) à pH 7,0 s'alcalinise de plus en plus en présence de la levure. Cette alcalinisation est nuisible à la mesure du CO_2, lequel est absorbé par le milieu alcalin au fur et à mesure de sa production par la levure. Cette absorption de CO_2 par le milieu est mise en évidence, en ajoutant de l'acide sulfurique à la fin de l'expérience; addition qui produira la liberation du CO_2 absorbé. Cette alcali-

A) *Composition du milieu synthétique de base.*

Pour faciliter sa préparation, nous le divisons en trois solutions séparées:

Solution a): *Mineralia.*

PO_4H_2K	1,5 gr.
$SO_4Mg.7H_2O$	0,5 gr.
$SO_4(NH_4)_2$	2,0 gr.
Cl_2Ca	0,33gr.
IK	0,1 gr.
Eau distillée...	1000,0 ml.

Solution b): *Oligoéléments.*

SO_4Fe	50 γ
MoO_4Na_2	10 γ
SO_4Cu	10 γ
SO_4Mn	10 γ
SO_4Zn	70 γ
BO_3H_3	100 γ

On prépare cette solution à une concentration 100 fois plus grande et elle est conservée à 4° C., jusqu'au moment de l'emploi.

Solution c): *Vitamines.*

On prépare chaque vitamine séparément de la façon suivante:

Pantothénate de calcium: 70 mg. dans 100 ml. d'eau distillée.

Biotine: 40 mg. dans 1000 ml. d'eau distillée. Un ml. de cette solution est étendu dans 100 ml. d'eau distillée.

Minositol :200 mg. dans 100 ml. d'eau distillée.

Thiamine :40 mg. dans 100 ml. d'eau distillée.

---

nisation est explicable par la nature même de l'acétate de sodium, sel d'acide faible et base forte, donnant des réactions alcalines en s'hydrolysant:

$$CH_3 - COONa + H_2O = CH_3 - COOH + NaOH$$

Afin d'éviter cet accident, nous avons employé le tampon concentré (voir page 9 **) à pH 5,6.

Acide nicotinique: 400 mg. dans 100 ml. d'eau distillée.

La solution complète de vitamines est composée de parties égales de chacune des solutions indiquées ci-dessus.

Au moment de l'emploi du milieu complet, on mélange les trois solutions: *a*), *b*) et *c*) dans les proportions suivantes:

Solution *a*): un litre; solution *b*): un ml.; solution *c*): 50 ml.

Le pH est ajusté à 5,6 et le milieu est stérilisé à 115° C., durant 20 minutes.

Ce milieu est une modification du milieu employé par les laboratoires Hoffman-La Roche pour le dosage des vitamines. Les modifications introduites sont: la suppression de l'acide aspartique, qui n'est pas assimilé par *Kl. apiculata;* la suppression de la pyridoxine et de la riboflavine, envers lesquelles, cette levure ne présente pas de déficiences.

B) *Solution physiologique tamponnée.*

Cette solution est formée d'un mélange des deux solutions suivantes:
Solution aqueuse de ClNa 0,9 % ... ... 1 volume
Solution de tampon phosphate de S rensen à pH 7,0. 1 volume.

La solution de tampon phosphate de S rensen est préparée comme suit:

Solution 1) PO_4H_2K ... ... 9,078 gr. par litre d'eau distillée.
Solution 2) $PO_4HNa_2\ 2H_2O$ ... 11,876 gr. par litre d'eau distillée.

On mélange ces deux solutions dans les proportions suivantes, pour obtenir un pH 7,0:

Solution 1): 4 volumes.
Solution 2): 6 volumes.

On stérilise finalement à 115° C., durant 20 minutes.

Variantes dans les milieux de mesure.

Le milieu synthétique de base, avec les variations indiquées au Tableau I,a subi certaines modifications jugées nécessaires, au cours de nos

expériences: Substitution du tampon faible (*) par le tampon fort (**) et addition d'antibiotiques (***), afin d'éviter l'interférence de bactéries.

3. *Conditions de la multiplication.*

La levure, prélevée à partir d'une culture sur moût de bière gélosé est cultivée sur moût de bière, à 25° C., durant 24 heures, avec agitation (50 oscillations par minute).

Standardisation des suspensions.

La mesure de la densité des cellules de levures est réalisée au moyen du néphélomètre de Pulfrich. Les valeurs néphélométriques obtenues pour les suspensions de levures sont reportées sur la courbe étalon, établie expérimentalement, en comparant le nombre de cellules (dénombrées par hémacytométrie) avec les valeurs néphélométriques des suspensions respectives.

Préparation des suspensions.

a) Culture aérée de la levure sur moût de bière, à 25° C., durant 24 heures.

b) Centrifugation stérile de la suspension *a*).

c) Lavage de la levure en solution physiologique stérile.

d) Centrifugation de la suspension *c*).

e) Resuspension de la levure dans la solution physiologique stérile.

f) Agitation de cette suspension à 25° C., durant une nuit (épuisement éventuel des réserves endogènes). (****).

(*) Le tampon faible est ainsi composé: on élève la concentration du phosphate du milieu par la addition d'une dose complémentaire de $PO_4HNa_2 \cdot 2H_2O$, de telle sorte que la proportion soit égale à celle d'un mélange tampon de S rensen. Dans ce cas, nous employons 1,5 gr., de PO_4H_2K et 2,9 gr., de PO_4HNa_2, pour obtenir un pH 7,0.

(**) Le tampon fort est un mélange à volumes égaux d'une solution de phosphates de S rensen à pH 7,0 et de milieu synthétique (doublement concentré).

(***) 100 gammas de pénicilline et 100 gammas de streptomycine par ml.

(****) On peut supprimer les opérations *e*) et *f*), l'expérience nous ayant montré que *Kloeckera apiculata* ne possède pratiquement pas de réserves endogènes respirables, quand elle est cultivée sur moût de bière aéré.

g) Dénombrement des cellules dans la suspension *f*), par néphélométrie .

h) Centrifugation de la suspension *f*).

i) Resuspension de la levure dans le milieu de mesure à la concentration de 50.000 cellules par ml.

Les suspensions de levures peuvent être conservées à 4° C., durant 24 heures, sans changements appréciables de leur activité.

Mesure des échanges gazeux.

Elle est réalisée dans l'appareil de Warburg.

Les auges utilisées ont un volume de 15 ml. et une branche latérale.

La température des expériences est de 25° C.

La vitesse d'agitation dans l'appareil de Warburg est de 120 oscillations par minute.

Le volume total de liquide par auge est de 3 ml.

La concentration des cellules de levures dans le milieu de mesure est de 50.000 par ml.

III) CONDITIONS DE CULTURES PREEXPERIMENTALES: REGIMES

Motifs expérimentaux et théoriques de l'adoption des régimes

L'irrégularité des premiers résultats acquis nous a fait soupçonner au début, des influences irrégulières, antérieures à l'expérience et liées aux conditions de culture préexpérimentales.

Malgré les précautions prises pour réaliser une première multiplication de la levure dans des conditions constantes d'inoculation et de culture, celle-ci est exposée brusquement à des changements de milieu, dont l'importance était à vérifier. Ces suppositions que nous vérifierons plus loin, nous ont conduits à la notion des *régimes*.

Définitions des régimes continu et discontinu.

La levure se multiplie dans du moût de bière glucosé et la mesure est réalisée en milieu synthétique à base de pyruvate, d'acétate ou de gluconate. Dans ces trois cas, la discontinuité des conditions est notoire!

Nous avons convenu de considérer comme *continu* un régime où la source de carbone est la même dans le milieu de multiplication et dans le milieu de mesure. Cette continuité est relative, puisque l'hydrate de carbone mis à part, les deux milieux sont très différents: l'un est naturel et l'autre synthétique. Pour atténuer les effets de cette différence, nous avons intercalé la phase d'adaptation figurée au Tableau II.

TABLEAU II

Régimes auquels a été soumise *Kloeckera apiculata.*

Régimes	PHASES			
	De multiplication — Milieu: moût de bière glucosé	D'adaptation — Milieu synthétique	De mesure — Milieu synthétique tamponné	De mesure — Sol. physiologique tamponnée
Continu *a*)	Glucose	Glucose	Glucose	—
Continu *b*)	Glucose	—	Glucose	—
Continu *c*)	Glucose	—	—	Glucose
Continu *d*)	Glucose	Acétate	Acétate	—
Discontinu *a*)	Glucose	—	Acétate Gluconate	—
Discontinu *b*)	Glucose	Glucose	Acétate Pyruvate	—
Discontinu *c*)	Glucose	—	—	Acétate Pyruvate Gluconate

Le régime *continu a)* offre le maximum de sécurité, puisque le milieu est rigoureusement identique pour les phases d'adaptation et de mesure; il en serait de même pour le régime *continu d).*

Nous verrons plus loin que la précaution d'introduire le milieu d'adaptation avec l'acétate est illusoire.

Le régime *continu b)* offre, faute d'étape d'adaptation, une continuité moins satisfaisante.

Finalement, nous avons adopté un régime *continu c),* beaucoup plus simple, où la levure passe du milieu de multiplication (moût de bière glucosé) au milieu de mesure, composé d'une solution physiologique glucosée tamponnée.

IV) ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA LEVURE A LA SORTIE DE SON MILIEU DE MULTIPLICATION

Une culture de *Kloeckera apiculata* de 24 heures ou de 48 heures sur moût de bière aéré à 25° C., accuse une respiration endogène pratiquement nulle (elle ne dépasse pas 8 ml. par heure au maximum), tant en solution physiologique qu'en milieu synthétique.

Ce comportement n'est pas surprenant si nous nous rappelons qu'au cours de cette culture en moût de bière aéré, la levure produit une quantité d'alcool appréciable, qui se transforme rapidement en acide acétique et en acétate d'éthyle, reconnaissable à son odeur. Une phase fermentative est, comme on le sait, peu propice aux synthèses. La condition très particulière, choisie dans nos expériences: moût de bière aéré, a permis la formation simultanée d'éthanol et d'acide acétique.

L'absence de réserves respirables abrège considérablement les opérations préliminaires à la mesure, rendant inutiles les précautions d'épuisement préalable de la levure.

V) REPRODUCTIBILITE DES MESURES D'ECHANGES GAZEUX

La reproductibilité des expériences dépend de la constance des facteurs agissant sur elles. Dans nos mesures d'échanges gazeux, nous distinguons des facteurs constants:

1) La forme et le volume des auges de Warburg utilisées.
2) La quantité de liquide utilisée dans les auges de Warburg.
3) La densité de la suspension de levures: 50.000 par ml.
4) La température: 25° C.
5) L'agitation dans l'appareil de Warburg: 120 oscillations par minute.

Ces conditions ont été rigoureusement respectées dans toutes les mesures effectuées. Malgré ces précautions, nous avons enregistré d'importantes inégalités relatives aux *intensités* des échanges gazeux et *aux valeurs des quotients respiratoires*. Nos soupçons se sont alors portés sur les circonstances préexpérimentales qui auraient pu influencer les divers échantillons de populations étudiés.

Ces circonstances étudiées par nous sont les suivantes:

a) Ressources azotées de la solution nutritive, dite milieu de mesure.

b) Temps de culture dans le milieu de multiplication.

a) *Ressources en azote de la solution nutritive dite milieu de mesure.*

Les expériences de mesure ont été réalisées dans six conditions, figurées au Tableau III.

TABLEAU III

Conditions	Solution synthétique (—)	N	C
1	+	+	+
2	+	+	−
3	+	—	+
4	+	—	—
5	—	—	+
6	—	—	—

Légende:

Sol. synth. (—) = Constituants de la solution synthétique, moins les constituants hydrocarbonés et azotés.

$N = SO_4 (NH_4)_2$

C = Glucose, ou acétate, ou pyruvate, ou gluconate.

Les expériences des conditions 5 et 6 sont réalisées en solution physiologique avec ou sans glucose, ou acétate, ou pyruvate, ou gluconate.

De ces six conditions, trois peuvent être éliminées (2,4, et 6), en raison des constatations consignées au chapitre IV: pas d'échanges gazeux sans la présence de ressources hydrocarbonées dans le milieu de mesure.

La condition 1) n'entre ici en ligne de compte, qu'au titre de témoin. Les conditions 3 et 5, représentent des milieux hydrocarbonés, tous deux dépourvus de ressources azotées. D'autre part, la condition 5 manque en plus, de tous les constituants du milieu synthétique.

Nos expériences prouvent que l'intensité des échanges gazeux diminue dans la condition 3, c'est à dire: carence de ressources azotées. Ce

résultat, valable pour la durée de l'expérience montre que le capital azoté endocellulaire (enzymes, en particulier), est suffisant pour assurer un fonctionnement réduit des échanges gazeux. La figure 2 donne une preuve graphique de notre affirmation.

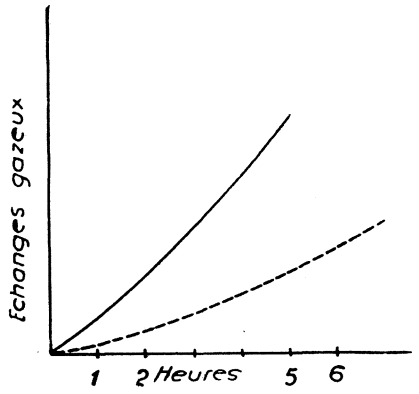


FIGURE 2

Influence de l'absence de ressources azotées sur les échanges gazeux.

Trait continu: échanges gazeux en présence de ressources azotées. Trait discontinu: échanges gazeux en absence de ressources azotées.

b) *Temps de culture dans le milieu de multiplication*

Cette variable s'est révélée la plus significative á l'égard des phénomènes de périodicité considérés. L'examen de ce facteur sera fait aux chapitres VII et VIII.

VI) ECHANGES GAZEUX DANS LES MILIEUX DE MESURE

Au Tableau II (voir chapitre III) nous avons groupé l'ensemble de nos expériences en sept régimes. Quelques-uns d'entre eux offraient des conditions inappropriées au développement d'un échange gazeux d'importance significative.

Nous pourrions grouper les régimes de caractère positif et de caractère négatif d'une autre manière que celle du Tableau II, mentionné plus haut.

Le milieu de mesure peut être composé de tous les éléments du milieu synthétique, ou il peut en être depourvu, n'étant composé que de CLNa, de la source de carbone et des phosphates du tampon (solution physiologique).

Chacune de ces deux possibilités doit être éxaminée en fonction de la nature de la source hydrocarbonée. Le tableau IV donne une idée de ces possibilités.

TABLEAU IV

Source de carbone	Echanges gazeux dans les milieux de mesure		Assimilation de la source hydrocarbonée (*)
	Solution physiologique	Milieu synthétique	
Glucose	+	+	+
Pyruvate	—	+	—
Gluconate	—	+	+
Acétate	—	+	—

— = Sans échanges gazeux.
\+ = Avec échanges gazeux.

Les échanges gazeux à partir du glucose, s'effectuent aussi bien en milieu synthétique qu' en solution physiologique.

Il en va tout autrement si l'on considère l'acétate, le pyruvate et le gluconate. Ces trois substrats sont respirés par la levure uniquement dans le milieu synthétique. Ceci pourrait être dû au fait que le substrat est plus accessible á l'enzyme. Par exemple: un changement de perméabilité produit par le changement de milieu employé dans la mesure.

D'autre part, le paradoxe: respiration positive de l'acétate et du pyruvate et assimilation négative de ces substrats est un fait nouveau.

Dans nos essais, le gluconate de calcium se distingue du pyruvate de sodium et de l'acétate de sodium. Les auxanogrammes montrent que le gluconate est assimilé par *Kloeckera apiculata;* par contre les deux autres substrats ne le sont pas. Ce phénomène de croissance doit impliquer logiquement une respiration du gluconate, qui d'ailleurs, a été démontrée

(*) Le pouvoir d'assimilation a été mis en évidence par la méthode auxanographique.

dans nos expériences en milieu synthétique à base de gluconate. Par contre, cette levure ne respire pas le gluconate en une solution aussi simple que la solution physiologique. Si d'autre part, on compare le gluconate au pyruvate et à l'acétate, nous constatons que ces deux dernières molécules sont encore moins familières à la levure que le gluconate. Si le pyruvate et l'acétate peuvent être occasionellement respirés, ils ne sont jamais assimilés dans nos conditions expérimentales.

En nous basant sur la notion des initiateurs (F. Lynen, 1941-42), nous avons essayé l'adaptation de *Kloeckera apiculata* à l'acétate et au pyruvate, en ajoutant au milieu à base d'acétate ou de pyruvate, des traces de glucose ou d'alcool qui serviraient d'initiateurs, mais sans résultat. Nous avons essayé aussi le gluconate comme initiateur, de même sans résultat. La méthode employée a été l'auxanographie en milieu liquide.

Une autre méthode employée par nous dans nos essais d'adaptation, o été la suivante: culture de la levure en milieu synthétique glucosé, en diminuant progressivement la quantité de glucose et en la remplaçant par des quantités augmentant graduellement, d'acétate ou de pyruvate. I a levure était cultivée par passages successifs dans ces divers milieux. Nous n'avons pas eu de résultats positifs avec cette méthode.

VII) PERIODICITE DE L'INTENSITE DES ECHANGES GAZEUX ET AGE DE LA CULTURE

Phénomènes d'autointoxication progressive du milieu de mesure.

Notre étude tend à expliquer l'indétermination du tonus physiologique de la levure, à la sortie de son milieu de multiplication. Cette inconstance s'exprime par deux phénomènes concomitants: *l'intensité des échanges gazeux et le quotient respiratoire.* Nous traiterons dans ce chapitre les expériences concernant les intensités des échanges gazeux. Les observations signalées sont valables pour le glucose et l'acétate.

La première observation faite dans nos expériences est la suivante: Toutes les expériences réalisées, soit en milieu synthétique glucosé ou à base d'acétate, ou de pyruvate, ou de gluconate, soit en solution physiologique glucosée, montrent un arrêt du métabolisme gazeux au bout de six heures.

Le facteur pH, c'est à dire, l'acidification progressive du milieu, doit être éliminé comme cause limitante; le pH 4,5, limite inférieure supportée par la levure, n'est en fait, jamais atteint.

Facteur concentration du substrat. Le facteur épuisement des ressources nutritives, plus praticulièrement des métabolites respirables, n'entre pas non plus en ligne de compte. Des calculs basés sur le dégagement du CO_2 au cours de ces six heures, prouvent qu'une faible fraction des ressources hydrocarbonées a pu être consommée.

Le facteur carence d'oxygène doit être aussi écarté, puisque les robinets des manomètres de l'appareil de Warburg sont ouverts périodiquement, au cours de chaque expérience. Donc, l'atmosphère des auges se renouvelle.

De même, nous ne pouvons pas imputer cet arrêt à la *saturation de l'atmosphère* des auges *par le CO_2* produit, car la réserve de KOH dans les godets des auges de Warburg est largement suffisante pour l'absorber durant six heures et même plus.

La vitalité de la levure, n'est pas compromise par un séjour de six heures, voir même de 24-48 heures, dans les auges manométriques; il suffit de substituer au milieu usagé, un milieu frais, pour que réapparaissent, avec la même intensité, les échanges gazeux.

La multiplication végétative de la levure au cours de l'expérience, de l'ordre de 20 %, selon nos observations (le nombre initial de 50.000 cellules par ml. atteint celui de 60.000 cellules par ml. en six heures), joue un rôle positif dans l'intensité des échanges gazeux: plus grand est le nombre de cellules, plus grande sera l'intensité des échanges gazeux. Elle joue en même temps, un rôle négatif: plus grand est le nombre de cellules, plus grande sera la quantité de toxines versées par elles dans le milieu. Ces deux valeurs se compensant, en une certaine mesure, ce facteur ne semble donc pas jouer un rôle important dans l'autoinhibition progressive du milieu.

Ces constatations obligent à considérer comme cause limitante de nos expériences, l'intoxication de la levure par les produits solubles de son métabolisme, progressivement accumulés dans le volume liquide restreint employé dans les auges de Warburg.

Cette observation impose la notion de ralentissement progressif de l'intensité du métabolisme général, et gazeux en particulier, de la levure placée dans les conditions décrites. Nous verrons plus loin les effets de

ce ralentissement sur l'activité de levures présentant des tonus physiologiques différents.

Evolution de l'intensité des échanges gazeux au cours de la mesure.

Les suspensions de cellules de levures croissant dans le même milieu, prises au même stade de multiplication, présentent des intensités différentes de leurs échanges gazeux au cours de six heures consécutives de mesure; cette observation est valable pour les milieux synthétiques glucosés ou à base d'acétate, de pyruvate ou de gluconate, et pour la solution physiologique glucosée. Les expériences réalisées, permettent de classer ces évolutions comme suit:

1) Intensité croissante: nous avons observé huit cas.
2) Intensité croissante et puis décroissante: cinq cas.
3) Intensité décroissante: six cas.
4) Intensité constante: un cas.
5) Intensité décroissante et puis croissante: un cas.

Ce comportement irrégulier et déconcertant au début, a pu être analysé comme suit:

Commençons par postuler, ce que nous prouverons plus loin, que la levure présente une *périodicité* de ses fonctions métaboliques. Il existe une alternance de phases croissantes et de déclin dans les phénomènes mesurés. La figure 3 schématise cette périodicité et situe chacun des types d'évolution signalés plus haut.

Il faut remarquer que les oscillations de cette courbe sinusoïdale n'ont aucune relation avec le délai de six heures imposé par l'expérience. En fait, le temps nécessaire pour accomplir une demi-période oscillatoire, étant supérieur à six heures, nous ne pouvons apprécier dans le système expérimental adopté, la durée de la période entière.

Nous prélevons, dans chacune de nos expériences, selon les lois du hasard, un échantillon de population de levures, *se trouvant à un stade quelconque de sa périodicité.*

Cette interprétation exige, pour être admise, l'élimination systématique des causes externes analysables, susceptibles de déterminer le caractère croissant ou décroissant des fonctions métaboliques.

Nous verrons plus loin la part prise dans ces phénomènes, par la nature des ressources hydrocarbonées, par la présence ou l'absence de res-

sources azotées dans la solution nutritive (milieu de mesure), et, enfin et surtout, la part prise par le facteur *temps de culture dans le milieu de multiplication.*

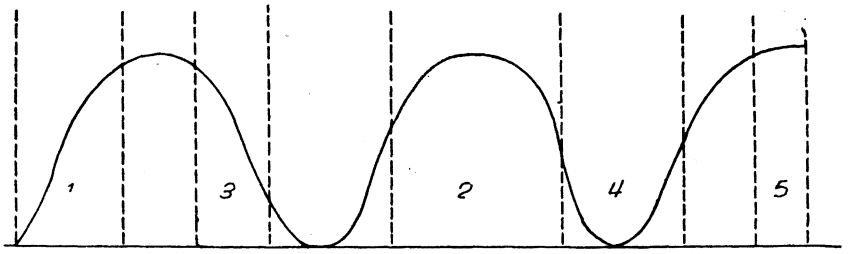


FIGURE 3

Représentation schématique de la périodicité de l'intensité des échanges gazeux.

Les chiffres indiquent les segments de la courbe correspondante aux tendances diverses des intensités observées. N° 1: Tendance croissante; N° 2: Tendance croissante, puis décroissante; N° 3: Tendance décroissante; N° 4: Tendance décroissante, puis croissante; N° 5: Tendance stable.

Relation entre l'autointoxication du milieu de mesure et les phases de la périodicité

Le phénomène d'autointoxication du milieu est un frein qui réduira progressivement et suspendra enfin (au bout de six heures) le métabolisme de la suspension de levures. Si celles-ci se trouvent à un stade physiologique décroissant, l'action modératrice de l'autointoxication, du même signe (—), s'additionera: le déclin de la pente s'accentue. Si les levures se trouvent à un stade physiologique croissant, l'action modératrice de l'autointoxication, de signe opposé, se soustraira: la pente de la courbe ascendante s'atténue.

Quel que soit le tonus physiologique de la population de levures, la durée de la phase sera finalement limitée par les effets des produits toxiques accumulés. En phase de déclin, leur accumulation sera plus rapide au début, puis elle sera amoindrie à la fin. En phase d'intensification, ces produits seront peu importants au début, puis plus nombreux à la fin. La limite est, en fait, déterminée par la somme totale de ces produits, quel que soit le mode d'accumulation.

L'autointoxication *interfère* donc avec le déclin ou avec l'intensification de l'activité métabolique, *mais ne parvient pas à masquer leurs caractères généraux*. En d'autres termes, *la périodicité se manifeste malgré l'action freinante de l'autointoxication.*

Périodicité de l'intensité des échanges gazeux et âge de la culture.

La courbe d'allure décroissante indique un affaiblissement progressif du métabolisme générateur d'échanges gazeux. La courbe d'allure croissante indique l'inverse.

L'examen de toutes les courbes, établies sur la base de nos mesures, permet la constatation suivante:

Quelle que soit la composition du milieu de mesure (synthétique ou solution physiologique); quelle que soit la source de carbone (glucose ou acétate); quelles que soient les conditions préalables d'adaptation; quelle que soit le caractère continu ou discontinu du "régime" utilisé, *on rencontre,* apparemment au hasard, *des courbes d'allure croissante et des courbes d'allure décroissante.*

La périodicité de l'intensité des échanges gazeux n'est pas, non plus, liée aux "états" de multiplication et d'inhibition du bourgeonnement, rencontrés successivement au cours des 24 heures de culture à 25° C., en moût de bière aéré (voir chapitre II).

Le tonus progressif ou régressif de la population de levures ne tient donc pas aux circonstances inhérentes aux milieux de mesure. Par contre, dès qu'on fait intervenir le facteur: *temps de culture (âge de la culture),* en milieu de multiplication, le hasard apparent disparaît.

Le Tableau V groupe les expériences réalisées avec des échantillons de levures, différant par leurs temps de culture en moût de bière aéré (âge de culture): 24 heures, 31 heures, 38 heures, 48 heures et 72 heures.

Horizontalement sont inscrits les n° des expériences faites avec des échantillons de levures *provenant d'un même inoculum,* où la seule variable est l'âge de la culture de chaque échantillon. La dernière colonne verticale figure les allures consécutives de courbes représentant des intensités d'échanges gazeux: croissantes, horizontales et décroissantes.

On constate une alternance des tonus progressifs et des tonus régressifs, dont le renouvellement produit une périodicité.

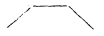
Le nombre de cas de courbes d'allure croissante, décroissante et intermédiaire, rencontré dans nos expériences est à peu près, du même ordre (le taux de fréquence est de 25 %, 20 % et 20 % respectivement). L'appréciation quantitative confirme les lignes précédentes.

A égalité de conditions, les résultats de nos expériences sont rigoureusement reproductibles, pour autant qu'on tienne compte du temps de culture (âge de la culture) de la population de levure, dont on a mesuré l'intensité des échanges gazeux.

En fait, au cours du temps de culture en moût de bière aéré, se succèdent *des états distincts* de la levure: *fonctions physiologiques croissantes et décroissantes.*

TABLEAU V

Courbes représentant les intensités des échanges gazeux

Exp. n.°	Temps de culture en milieu de multiplication					Tendance des courbes
	24 h.	31 h.	38 h.	48 h.	72 h.	
VIII et X	c	h	—	d	—	
XI	c	d	—	—	—	
XII	dc	dc	dc	—	—	
XVIII et XIX	d	—	—	cd	—	
XX, XXI et XXII	cd	—	—	cd	c	

Légende:

c = Courbe d'allure croissante.
h = Courbe d'allure constante.
d = Courbe d'allure décroissante.
dc = Courbe d'allure décroissante, puis croissante.
cd = Courbe d'allure croissante, puis décroissante.

Nous avons dit plus haut, que les caractères croissants ou décroissants des fonctions physiologiques, ne dépendaient point des facteurs externes du milieu où se déroule la mesure. Cette indépendance existe encore à l'égard du temps de bourgeonnement.

Le rythme de bourgeonnement dans nos conditions expérimentales et en moût de bière aéré, est de cinq divisions en six heures, ce qui donne aproximativement, une durée de vie prébourgeonnante de 66 minu-

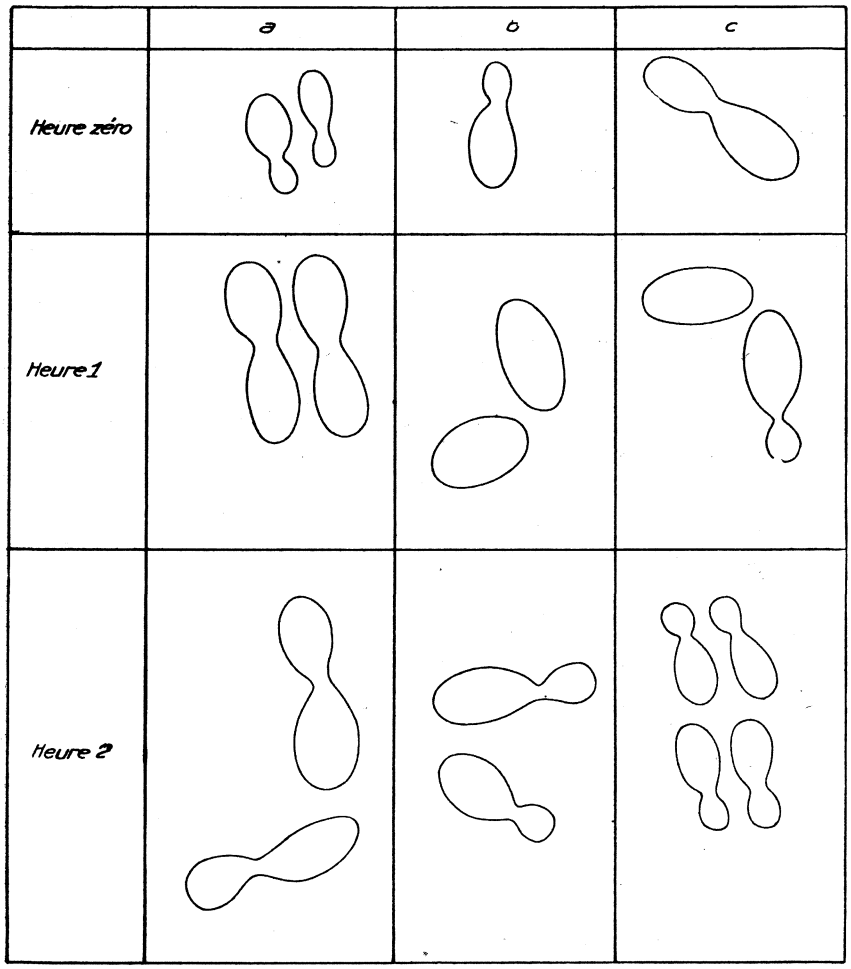


FIGURE 4

Observation microscopique du développement et du bourgeonnement de Kloeckera apiculata *sur moût de bière gélosé, à 25° C.*

Le groupe *a* est en phase de croissance prédominante. Le groupe *c* est en phase de bourgeonnement. Enfin, nous observons un cas intermédiaire en *b*.

tes. Ce temps est trop court pour concorder avec la durée d'une phase ascendante ou descendante des périodicités physiologiques décrites.

Jusqu'à plus ample informé, nous n'établirons donc pas de liaison entre le rythme de bourgeonnement cellulaire et les fluctuations du tonus physiologique (conclusions tirées de l'observation des courbes de multiplication, figure 1, chapitre II).

L'examen microscopique du développement de quelques cellules de levure, prélevées au hasard (en culture sur lame), révèle des comportements inégaux de cellule à cellule. Les unes s'orientent rapidement vers le bourgeonnement, alors que d'autres croissent, au lieu de bourgeonner, dans le même temps. Nous rencontrons des phases intermédiaires entre ces deux cas opposés.

Sans vouloir exagérer la portée de ces observations limitées, on peut se demander s'il n'y a pas là une expression nouvelle des divers états révélés par la périodicité physiologique (voir figure 4).

Nous voyons donc que le facteur *âge de la culture* est le seul qui fasse disparaître le hasard apparent des variations d'intensité des échanges gazeux.

Après avoir passé en revue les divers facteurs étudiés et leurs influences possibles sur les phénomènes de périodicité observés, il nous reste à envisager comme explication plausible de ces phénomènes, *l'hypothèse d'un rythme endogène spontané.*

A l'appui de l'interprétation physiologique de ces états distincts, s'ajoute l'observation microscopique signalée plus haut.

VIII) PERIODICITE DES VARIATIONS DES VALEURS DU QUOTIENT RESPIRATOIRE

Le chapitre précédent concernait l'intensité des échanges gazeux, notion quantitative, exprimée par des valeurs absolues.

Considérons maintenant le problème du quotient respiratoire. Cette valeur relative exprime une qualité des échanges gazeux. Les valeurs du quotient respiratoire peuvent croître ou décroître en fonction du temps au cours de l'expérience.

Rappelons qu'il n'est pas permis d'identifier la chute des valeurs du quotient respiratoire avec celle des intensités respiratoires. Il s'agit

d'un ordre de phénomènes distincts. On peut ainsi observer simultanément une diminution progressive de la consommation des ml. d'oxygène et en même temps, une tendance croissante des valeurs du quotient respiratoire.

Le quotient respiratoire est, comme on le sait, une valeur obtenue en divisant le volume de CO_2 dégagé par le volume d'oxygène consommé au cours d'une mesure d'échanges gazeux.

Au sens strict du terme, le quotient respiratoire se rapporte à la respiration intégrale d'un métabolite. La valeur théorique de celui-ci peut être établie, *in vitro,* pour une molécule telle que le glucose, l'acétate, le pyruvate ou tout autre, par des moyens chimiques. On sait que le quotient respiratoire est égal à un dans le cas de la combustion intégrale d'un sucre, inférieur à un dans le cas d'un lipide et supérieur à l'unité, dans le cas d'un acide organique riche en oxygène.

Les valeurs du quotient respiratoire d'une suspension de levures ou d'un tissu présentent rarement la constance des cas théoriques énoncés plus haut. Diverses causes contribuent à modifier, en fonction du temps, cette valeur:

La molécule respirée peut changer. Lorsque les glucides sont épuisés, l'acte respiratoire se porte vers les lipides et les protides. A chacune de ces substances correspond un quotient respiratoire spécifique. On doit aussi envisager, au lieu de l'épuisement, l'aparition de molécules récemment synthétisées, qui deviennet, dès lors, l'objet d'actes respiratoires. En supposant même que la provision initiale de glucide est suffisante pour ne pas s'épuiser au cours de la mesure, des réactions de synthèse, concomitantes de la respiration, se déroulent et consomment un volume d'oxygène supplémentaire à celui nécessité par la combustion du glucide.

On sait encore, que la relation "substrat métabolisé poids de l'organisme" est susceptible de modifier le quotient respiratoire. En principe, la croissance cellulaire atteint son maximum au moment où la quantité de substrat métabolisé accuse une valeur minimale. Ce moment critique est encore celui de l'orientation vers le bourgeonnement. La variation du quotient respiratoire figurerait donc ces changements d'état.

Une perturbation du quotient respiratoire théorique peut enfin résulter de la combustion incomplète d'un métábolite: les produits de la dégradation ne comportent pas de CO_2.

Ce bref rappel montre jusqu'à quel point la valeur du quotient res-

piratoire fournie par une expérience exprime un ensemble de réactions, souvent très difficiles à discerner.

Choisissons le système suivant: inoculation de la levure, prélevée d'une culture sur moût de bière gélosé, dans un Erlenmeyer de 100 ml., avec 30 ml. de moût de bière. Après culture aérée, durant 24 heures à 25° C., dans ce milieu, un échantillon de cette population, de densité connue, est transféré dans le milieu de mesure (milieu synthétique glucosé). Les valeurs du quotient respiratoire sont établies comme convenu (voir plus bas).

Malgré l'uniformisation des conditions expérimentales, nous enregistrons tantôt des quotients respiratoires à tendance décroissante, tantôt à tendance stable, tantôt, mais rarement nous enregistrons des quotients respiratoires à tendance croissante. Les valeurs globales peuvent être supérieures, égales ou inférieures à l'unité pour un même substrat (glucose).

Les valeurs du quotient respiratoire ont été calculées d'heure en heure, pour une période de six heures. Pour éliminer, dan la mesure du possible, les erreurs d'appréciation inhérentes à la diffusion et à la collection des gaz, nous avons adopté la convention suivante:

Établir la valeur moyenne des quotients respiratoires des trois premières heures d'expérience, puis celle des trois dernières heures. Les segments construits au moyen de ces deux valeurs, permettent de juger du caractère croissant, stable ou décroissant du quotient respiratoire au cours de l'expérience.

Des conclusions relatives à l'évolution du quotient respiratoire dans les systèmes biologiques étudiés ne sont permises qu'à la condition de comparer des expériences rigoureusement identiques. On séparera donc celles faites avec le glucose et celles faites avec l'acétate. Pour chacun des substrats respirables, on se bornera à considérer les expériences faites avec des microorganismes ayant subi le même régime.

Dix expériences faites en présence de glucose et d'acétate acussent une valeur *moyenne stable* du quotient respiratoire de 1,0 pour le glucose et de 1,1 pour l'acétate. Ces valeurs sont très proches des valeurs théoriques relatives à ces métabolites.

Trois expériences faites en présence de glucose ou d'acétate fournissent une valeur *moyenne stable* du quotient respiratoire de 0,6.

Neuf expériences faites en présence de glucose ou d'acétate révèlent

une *tendance décroissante* des valeurs moyennes du quotient respiratoire, atteignant une valeur moyenne minimale de 0,4.

Deux expériences faites en présence d'acétate, montrent une tendance *croissante* des valeurs moyennes du quotient respiratoire, atteignant une valeur moyenne maximale de 1,10, très proche de la valeur théorique relative à la combustion complète de l'acétate.

Le tableau VI rassemble les données obtenues, concernant les quotients respiratoires, dans nos expériences d'échanges gazeux.

TABLEAU VI

Exp. n.°	Substrat	Valeur moyenne du Q. R. par expérience	Valeur moyenne de la somme des Q. R.	Qualité de la tendance du Q. R.
I	Glucose	1,25	1,0	Stable
	»	0,90	1,0	»
	»	0,85	1,0	»
V	Acétate	1,10	1,1	Stable
VIII : 24 h.	»	1,10	1,1	»
VIII : 31 h.	»	1,20	1,1	»
IX	»	1,05	1,1	»
III	Glucose	0,6	0,6	Stable
XI	Acétate	0,6	0 6	Stable
XII : 24 h.	»	0,55	0,6	»
XVIII	Glucose	1,3 - 0,4	—	Décroissante
XIX	»	0,6 - 0,4	—	»
III	Acétate	0,9 - 0,4	Valeur moyenne minimale = 0,4	Décroissante
IV	»	0,6 - 0,3	»	»
VII	»	0,6 - 0,2	»	»
VIII	»	1,0 - 0,4	»	»
XII : 31 h.	»	0,9 - 0,4	»	»
XII : 38 h.	»	0,8 - 0,5	»	»
VI	»	0,8 - 0,3	»	»
XI	Acétate	0,6 - 1,1	Valeur moyenne maximale = 1,10	Croissante

Chaque fois que l'on part d'un même inoculum et que l'on opère dans des conditions expérimentales semblables, on reproduit le même type (tendance) d'evolution des valeurs du quotient respiratoire.

Si par contre, on s'adresse à des suspensions de levures, provenant d'un même inoculum, *mais différant* les unes des autres *par leur âge de culture,* on enregistre des variations imprévisibles du type des évolutions des valeurs du quotient respiratoire.

Pour les quotients respiratoires comme pour les intensités des échanges gazeux, *l'âge de la culture* s'affirme comme étant la cause déterminante de ces variations. L'expérience nous apprend en outre, qu'il ne s'agit pas d'une variation progressive, mais d'une *variation périodique.*

Interprétation des tendances stables, décroissantes et croissantes des quotients respiratoires au cours de la mesure.

Le cas apparemment le plus simple, est celui de la stabilité moyenne. Le quotient respiratoire a la même valeur au cours de toute l'expérience. En réalité, il faudrait une analyse expérimentale beaucoup plus étendue, pour interpréter les composantes de la moyenne enregistrée. En première approximation, on peut supposer que la levure respire le même métabolite dans le délai de l'expérience. Cette explication très simple n'exclut pas la possibilité suivante: compensation entre des réactions accessoires de signe opposé (Q. R. croissants ou décroissants) et d'intensités plus ou moins égales.

La tendance décroissante de l'évolution du quotient respiratoire correspond biochimiquement à une consommation d'oxygène progressivement plus grande que le dégagement de CO_2, soit que ce dernier reste constant, soit qu'il diminue. En fait, cette diminution du CO_2 prévaut, en raison de ce qui est dit au chapitre VII concernant l'autointoxication.

Nous avons cité plus haut trois causes expliquant la chute du quotient respiratoire:

a) Combustion incomplète d'un métabolite sans dégagement de CO_2. Cette hypothèse est écartée par les données de nos expériences.

b) Substitution d'un métabolite respirable à quotient respiratoire bas au métabolite respiré au début, à quotient respiratoire élevé. Cette supposition cadre mal avec les conditions de nos expériences, où le mé-

tabolite respirable est toujours offert en excès. Théoriquement, il y a toujours des substitutions possibles et partielles: la resynthèse au cours de l'acte respiratoire offre à la cellule des combustibles nouveaux, dont les quotients respiratoires ne sont pas nécessairement égaux á celui du métabolite exogène.

En fait, ces combustibles nouveaux ont peu de chances de se constituer durant la mesure (six heures) en milieu synthétique glucosé. Nous savons, en effet qu'après six heures, voir même 24 heures de séjour en moût de bière aéré, à 25° C., milieu plus riche, *la levure n'accumule aucun combustible responsable* d'une respiration endogène. Ce résultat doit être valable à plus forte raison pour le milieu synthétique glucosé L'analyse chimique d'une suspension de levures, a révélé une diminution du titre en azote et en lipides, au cours de la mesure en milieu synthétique à base d'acétate (substrat non assimilé par la levure).

c) Une consommation d'oxygène compétitive à celle de la respiration, s'institue au cours des opérations métaboliques concomitantes des réactions cataboliques respiratoires, sans aboutir à la formation de réserves respirables. Ce phénomène abaissera plus ou moins, le quotient respiratoire théorique.

Cette cause nous paraît exercer l'effet prédominant dans la chute constatée des valeurs du quotient respiratoire.

Kloeckera apiculata se comporte donc, différemment des *Saccharomyces,* chez lesquels l'aération augmente la synthèse des lipides et des hydrates de carbone lorsque du sucre leur est offert (Smedley-Maclean et Hoffert, 1923).

Un échantillon de population de levures qui accuse durant l'expérience una diminution marquée des valeurs du quotient respiratoire, se trouve dans un stade de synthèse, caractérisé par une tendance décroissante du quotient. Cet état correspond à une croissance cellulaire.

La *tendance croissante* de l'évolution du quotient respiratoire est rarement recontrée au cours de nos expériences. La périodicité qui ressort de toutes nos observations implique logiquement l'existence de cette tendance; étape entre une valeur moyenne basse du quotient et une valeur élevée de celui-ci.

Il faut supposer que cette phase croissante est de courte durée dans les oscillations périodiques. Donc, les chances de la rencontrer sont rares. Nous interprétons cette phase comme un ralentissement temporaire des

opérations "assimilation-croissance" et un démasquage de l'activité respiratoire stricte (retour au quotient théorique du glucose ou de l'acétate).

Il paraît judicieux de confronter ici les observations microscopiques (fig. 4) avec les données physiologiques. Certaines cellules, à croissance prolongée et bourgeonnement différé, illustrent, à l'échelon morphologique, *la tendance "assimilation-croissance"*, caractérisée par un quotient à tendance décroissante. D'autres, à croissance limitée et à bourgeonnement rapide, figurent, à l'échelon morphologique, les tendances caractérisées par des valeurs de quotients croissantes ou stables.

L'assimilation ou conversion des aliments en matière cellulaire peut avoir lieu dans des conditions ne permettant pas la multiplication. Ce processus se déroule jusqu'au moment où les conditions nécessaires au bourgeonnement sont atteintes.

L'application intégrale des déductions précédentes au cas de l'acétate est impossible. L'expérience nous apprend en effet que, bien que respiré, dans certaines conditions, celui-ci n'est pas un matériau utilisable par *Kloeckera apiculata* à des fins plastiques. On devra donc, en principe, écarter de l'interprétation tout ce qui serait relatif aux opérations de synthèse, distinctes de l'acte catabolique respiratoire. Ici se présente un dilemme:

a) Admettre une respiration pure, sans réactions accessoires et concomitantes, principe difficile à accepter.

b) Admettre une assimilation nulle, définie par la méthode auxanographique classique, qui exclurait à la fois, croissance et bourgeonnement. Cette formule est excessive. L'auxanographie ne définit, en somme, que le bourgeonnement ou la multiplication et néglige les phénomènes "d'engraissement ou d'usure cellulaires". Or, les tendances décroissantes des valeurs du quotient respiratoire en présence d'acétate, démontrées par nos expériences, prouvent l'existence de métabolismes accessoires et concomitants de la combustion de l'acétate. Une preuve nous en est donnée par l'analyse chimique de levures respirant l'acétate en milieu synthétique aéré à 25° C. Au bout de quelques heures de séjour dans ce milieu, les cellules accusent une diminution de leurs constituants azotés et lipidiques. Les produits de ce métabolisme concomitant de la respiration de l'acétate ne forment pas de combustibles propres à une respiration endogène et ne suffisent pas pour déterminer le bourgeonnement de la levure.

TABLEAU VII

Résultats des microanalyses de Kloeckera apiculata *en présence d'acétate.*

ECHANTILLON	% d'azote	% de lipides
Cultivé en moût de bière, à 25° C., durant 24 heures (Témoin)...	8,95	1,74
Partie aliquote de la culture précédente transférée en milieu synthétique à base d'acétate, aéré à 25° C., durant 24 heures	7,56	1,51

CONCLUSIONS

Nos études du quotient respiratoire et des fluctuations de ses valeurs nous amènent aux conclusions suivantes:

Il est impossible de prévoir la tendance évolutive (décroissante, stable ou croissante) *des valeurs du quotient respiratoire d'une population de levures.*

D'autre part, le fait de rencontrer une valeur moyenne initiale du quotient respiratoire, supérieure, égale ou inférieure à l'unité (valeur théorique) est, à notre avis, le fruit du hasard. Lors du prélèvement d'un échantillon quelconque de population de levures, destiné à la mesure des échanges gazeux, on peut être en présence d'une population, se trouvant au début, au milieu ou à la fin de la demipériode d'une oscillation rythmique. Le délai expérimental de six heures ne couvre pas la durée d'une demi période; à plus forte raison, nos conditions expérimentales excluent l'enregistrement des manifestations d'une période entière (voir fig. 3).

Nous savons désormais, que *la variation de la tendance évolutive des valeurs du quotient respiratoire est liée principalement, à l'âge de la culture* (temps de culture de l'inoculum en milieu de multiplication).

Cela revient à dire que des inocula distincts possèdent des tonus physiologiques différents, dans la plupart des cas. Rencontrer deux inocula distincts avec des tonus semblables ne serait que pure coïncidence.

Nos expériences mettent en évidence *le caractère rythmique de ces fluctuations.*

Rappelons que cette conclusion principale résulte du procédé d'enquête employé: estimation fractionnée, en fonction du temps, des échanges gazeux réalisés au cours d'une seule et même expérience. Ce procédé diffère de la technique d'estimation globale des échanges gazeux. Cette dernière dissimule complement les phénomènes de périodicité que nous avons observés.

Disons pour terminer, que ce tonus physiologique est indépendant, en partie tout au moins, des réserves cellulaires respirables, et dépendant de la disponibilité rythmique des ferments cellulaires.

SOMMAIRE

Les particularités physiologiques inédites de *Kloeckera apiculata,* par nous étudiées sont les suivantes:

1. Assimilation positive du gluconate de calcium et négative des pyruvates de sodium, de calcium et de potassium, de l'acétate de sodium et de l'acide aspartique.
2. *Kloeckera apiculata* cultivé en moût de bière aéré à 25° C., n'accumule pas de métabolites respirables.
3. Le glucose est toujours métabolisé (respiré et assimilé) par *Kloeckera apiculata,* même en solution physiologique tamponnée, c. à d. en absence de tout aliment auxiliaire.
4. Un séjour a basse température (4° C.) de la levure, interromp temporairement l'activité métabolique, mais n'interromp pas le rythme des fonctions physiologiques étudiées: intensité des échanges gazeux et variation des valeurs du quotient respiratoire.
5. Le rythme des fonctions physiologiques étudiées persiste chez *Kloeckera apiculata* dépourvu de réserves respirables, en solution saline physiologique.
6. Le gluconate de calcium est assimilé et respiré, uniquement en milieu complet.
7. Le pyruvate et l'acétate ne sont jamais assimilés dans nos conditions expérimentales; pourtant, ils sont respirés en milieu synthétique.
8. L'intensité des échanges gazeux est liée à des variations de caractère périodique: il s'agit d'un *rythme endogène spontané.*

9. Les valeurs du quotient respiratoire sont liées à des variations de caractère périodique: il s'agit également, d'un *rythme endogène spontané.*

SUMMARY

A phenomenon of periodicity has been observed with regard to the intensity of gas exchange and respiratory quotient in *Kloeckera apiculata.* These fluctuations are not the result of variation in extrinsic factors but are dependent on an intrinsic periodicity of the yeast, "the endogenous rythm".

BIBLIOGRAPHIE

BAILLAUD, L. Année Biologique LXII; Ser. 3, T. 34, fasc. 7-8; 299-329, 1958.
BAILLAUD, L. et COURTOT. Ann. franç. Chronom. ser. 2, 9; 87-102, 1955.
BAILLAUD, L. et COURTOT. Ann. sci. Université de Besançon, ser. 2, Bot; 5, 1955.
BÜNNING, E. Entwicklungs und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Springer, Berlín, 1953.
KLEITMAN, J. Biological rythms and cycles. Physiol. Rev. 29; 1-30, 1949.
KRAHL, M. E. y G. H. A. CLOWES. J. Biol. Chem. 111; 355, 1935.
LODDER, J. et N. J. W. KREGER —Van Rij.— "The Yeasts". Amsterdam, 1952.
LOOMIS, W. F. et F. J. LIPMAN. J. Biol. Chem. 173; 807, 1948.
LYNEN, F. Ann. Chem. Justus Liebig., pg. 304, 1941-42.
PICKET, M. J. et C. E. CLIFTON. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46; 443, 1941.
PICKET, M. J. et C. E. CLIFTON. J. Cellular Comp. Physiol, 22; 147, 1943.
REINBERG et GHATA. Que sais je?, pg. 734, 1957. P. U. F. Paris.
SMEDLEY - MACLEAN et J. HOFFERT. Bioch. J. 17; 720, 1923.
UMBREIT, W. W. R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER. Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Burguess Pub. Co. Minneapolis, 1949.
WILES, A. E. J. Inst. Brewing, 59; 265, 1953.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN EL DESARROLLO DEL VIRUS HERPES SIMPLEX EN CELULAS HELA *

POR
CARMEN GIL FERNANDEZ

El desarrollo del virus Herpes simplex ha sido estudiado por diversos autores, en embrión de pollo y en ratón y modernamente en cultivo de tejidos.

Scott y cols. (1953 a) describen un período de latencia de cuatro a doce horas, en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, cuyo período es inversamente proporcional a la cantidad de inóculo. Las unidades infecciosas se multiplican por 10 cada dos horas, durante las diez horas siguientes, disminuyendo a continuación el ritmo de crecimiento.

Wildy (1954) observa en dicha membrana un crecimiento continuo desde las ocho a las veintidós horas después de la infección.

Yoshino (1956) y Yoshino y Taniguchi (1957) estudian el desarrollo del virus en embriones de un día, en los que se ha reemplazado la clara por dilución de yema en suero fisiológico, observando que la cantidad de virus liberada incrementa del segundo al quinto días.

Stulberg y Schapira (1953) obtienen el título más elevado en células de embrión de pollo del segundo al cuarto día, decreciendo después del quinto al séptimo.

Jawetz y cols. (1955) investigan con cepas de virus Herpes simplex adaptadas al ratón, por titulación intracerebral, observando un máximo del crecimiento acumulativo entre las setenta y las ciento veinte horas.

(*) Este trabajo ha sido realizado en la Sección de Virus del Departamento de Patología de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, durante el disfrute de una beca de la Fundación "Juan March", bajo la dirección del Prof. M. G. P. Stoker, a quien me complazco en expresar mi agradecimiento.

Refiriéndonos a cultivos de tejidos, Scott y cols. (1953 b) han estudiado el crecimiento de dicho virus en células de córnea de conejo, comprobando que la curva de crecimiento no difiere de la encontrada por ellos en embrión de pollo.

Kaplan (1957), trabajando con las mismas células, observa que después de un período de latencia de ocho horas, el crecimiento es exponencial hasta las treinta horas, en cuyo momento obtiene un promedio de 280 unidades infectivas formadoras de placas por célula, que determina por el método Dulbecco.

Sosa Martínez y cols. (1955), midiendo la infectividad en el ratón, afirman que la máxima cantidad de virus se produce en las células de riñón de conejo entre el tercero y el quinto días.

Barski y cols. (1955) no detectan virus en las mismas células a las nueve y media horas, siendo la producción máxima a las sesenta y una horas. Emplean diversos métodos para titular el virus.

También ha sido estudiado el virus Herpes simplex en células HeLa por Stocker (1958). Según dicho autor hay un período de latencia de nueve horas en las cuales el virus se desarrolla en el interior de las células, no liberándose al medio hasta después de las doce horas, aumentando a partir de ellas hasta las cincuenta horas. El número de unidades infecciosas productoras de placas por célula es de setenta y cinco a las veintiséis horas y ciento cuarenta y cuatro a las cincuenta horas.

Vemos, por tanto, que el período de latencia de seis a doce horas es aceptado por todos los autores, pero que el momento de máxima producción de virus oscila entre límites amplios. Esta diferencia puede atribuirse a haber operado con diversas cepas de virus y en células distintas.

Por nuestra parte hemos querido determinar el tiempo necesario para conseguir la máxima producción de virus en las células HeLa y al mismo tiempo comprobar la influencia de diversos factores que pueden modificar el rendimiento del virus.

Hemos estudiado la influencia de la temperatura, la de distintos medios de cultivo, así como el tiempo óptimo de producción de virus, intentando determinar si prolongando el cultivo después de la infección hasta la degeneración de las células podía conseguirse un mayor rendimiento de partículas víricas. Por último, hemos fijado la cantidad total que se recoge en el medio, en la superficie de las células con diferentes

lavados consecutivos con versinato sódico (versene) y en el interior de las células sometiéndolas a la desintegración.

MATERIAL Y TECNICAS

Cepa de virus.

Cepa HFEM del virus Herpes simplex, variante de la HF de Melbourne, adaptada al huevo y al ratón, que es la que se cultiva en el laboratorio del Departamento de Virus de la Universidad de Cambridge, por pases sucesivos en embrión de pollo.

Tipo de células.

Procedente de la cepa HeLa (Gey) de un carcinoma humano de cuello de útero.

Medio nutritivo.

Para el mantenimiento normal del cultivo se emplea el medio siguiente:

Líquido de Gey	70 c. c.
Lactoalbúmina hidrolizada al 5 %	10 c. c.
Suero humano	20 c. c.

Al líquido se añade un c. c. de rojo fenol al 2 %, 100 u. de penicilina y 100 microgramas de estreptomicina por c. c. y bicarbonato sódico al 1 % en cantidad suficiente para ajustar el pH a 7,4.

Para la infección con virus se modifica la fórmula sustituyendo el suero humano por suero de conejo del modo siguiente:

Líquido de Gey	85 c. c.
Lactoalbúmina hidrolizada al 5 %	10 c. c.
Suero de conejo	5 c. c.

El rojo fenol, la penicilina, estreptomicina y el bicarbonato sódico, se emplean en la misma proporción que en la fórmula anterior.

Cultivo de las células.

Se hace en frascos exagonales de 200 c. c. de cabida y con paredes planas de 3 × 10 centímetros. En las caras que sirven de base se realiza el desarrollo de las células. Estos frascos sirven para disponer de un stock de células. Cuando dichas células forman una especie de epitelio continuo, se separa el medio nutritivo, se lava tres veces con solución salina tamponada exenta de calcio y magnesio (solución A de Dulbecco y Vogt 1954) y las células se desprenden de las paredes del frasco añadiendo verseone (versinato sódico) diluído al 1/20.000, mantenido en incubación con las células a 37° C. durante veinte minutos. Al cabo de este tiempo las células se disgregan por medio de una pipeta con pera de goma por sucesivos pipeteos, hasta conseguir una suspensión homogénea. Las células se cuentan en un hematímetro, y se distribuyen en nuevos frascos a razón de 1×10^6 células por frasco. Se añaden 10 c. c. de medio nutritivo en cada uno de ellos y se mantienen en estufa en posición horizontal a 37° C.

Experimentos con virus.

Los frascos se siembran con 2×10^6 células; después de uno o dos días de crecimiento, cuando aparece una capa uniforme de células, se lavan tres veces con 10 c. c. de solución salina tamponada PBS (Dulbecco & Vogt, 1954) a 37° C. Se añaden 2 c. c. de virus y se deja en contacto con las células dos horas en estufa a 37° C. Al cabo de dicho tiempo se separa el virus con una pipeta Pasteur y se lava tres veces con 100 c. c. de PBS añadiendo medio nutritivo con suero de conejo; a continuación se llevan de nuevo a la estufa a 37° C.

Titulación del virus.

Se efectúa en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo de doce días de incubación. La inoculación se hace siguiendo la técnica de Nadaje y cols. (1955) modificada por Stoker y Ross (1958). La lectura de las lesiones producidas se realiza a las cuarenta y ocho horas después de la inoculación.

PARTE EXPERIMENTAL

a) *Elección de la dosis de virus para la infección celular.*

Quisimos determinar si el volumen de inóculo intervenía en la infección celular, pues no es conveniente rebajar el título, ya que si se diluye, al aumentar el volumen, aunque el número de partículas víricas sea el mismo, la posibilidad de contacto de éstas es menor y, por tanto, el poder infectante disminuye.

Pero en cambio, puesto que es la capa que recubre las células la que toma parte activa en la infección, intentamos comprobar si utilizando tan sólo la cantidad de líquido suficiente para recubrir el cultivo, la infección se realizaba con la misma marcha o si se retrasaba o disminuía. En el primer caso se lograría una economía de simiente y, por tanto, ahorro de trabajo.

En este experimento sembramos dos series de ocho frascos, Serie 1 con 4 c. c. de simiente y Serie 2 con 2 c. c. de título $1{,}0 \times 10^7$ que comprobamos que era la cantidad mínima para lograr un recubrimiento perfecto del cultivo.

La marcha seguida es la misma descrita anteriormente, pero sin lavar con PBS, es decir, sin eliminar el virus del medio, lo que obligaba a emplear un frasco control, con virus pero sin células, para obtener por diferencia la cantidad del mismo liberada por las células infectadas.

Para evitar este control, en los sucesivos experimentos se separaba el virus con una pipeta Pasteur y se lavaba con PBS.

A las distintas horas señaladas en el cuadro I se toman dos frascos cuyo medio nutritivo se mezcla y se titula. A las células se les añade 5 c. c. de versene al 1 : 5.000 y se llevan a incubar a 37° durante cinco minutos, al cabo de los cuales se agitan los frascos y las células se separan de las paredes. Se centrifuga la suspensión cinco minutos a 1.000 r. p. m. y se titula el líquido sobrenadante (primera fracción versene).

CUADRO I

Tiempo en horas	Serie 1. T × 10^6		Serie 2 T × 10^6		T × 10^5 — Control
	Medio	Versene	Medio	Versene	
16	3,1	2,5	3,1	2,0	6,6
26	1,3	2,5	1,0	1,6	5,8
36	2,0	3,5	4,4	5 0	x
46	10,0	16,0	3,1	3,0	3,3
	16,4	24,5	11,6	11,6	

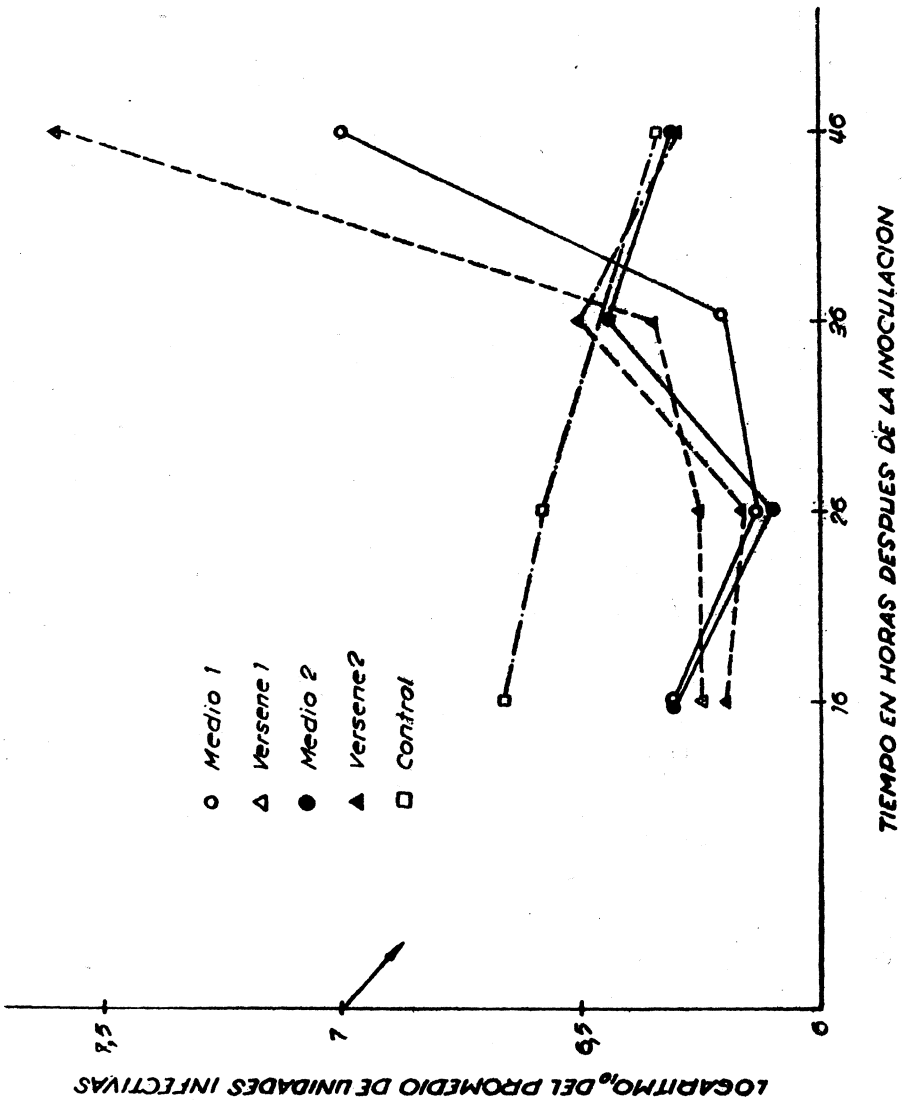
En la gráfica 1 figuran las curvas de liberación de virus de ambos experimentos o de ambas series. Se aprecia que la máxima producción de virus se alcanza más rápidamente con la menor dosis de inóculo. Existe una concordancia entre los títulos de la fracción versene y los del medio en las distintas horas, pero manteniéndose más elevada la primera a partir de las veintiséis horas.

b) *Producción de virus en diferentes períodos de tiempo.*

La técnica seguida ha sido la indicada al hablar del material y técnicas, por lo que no hemos de insistir en su descripción.

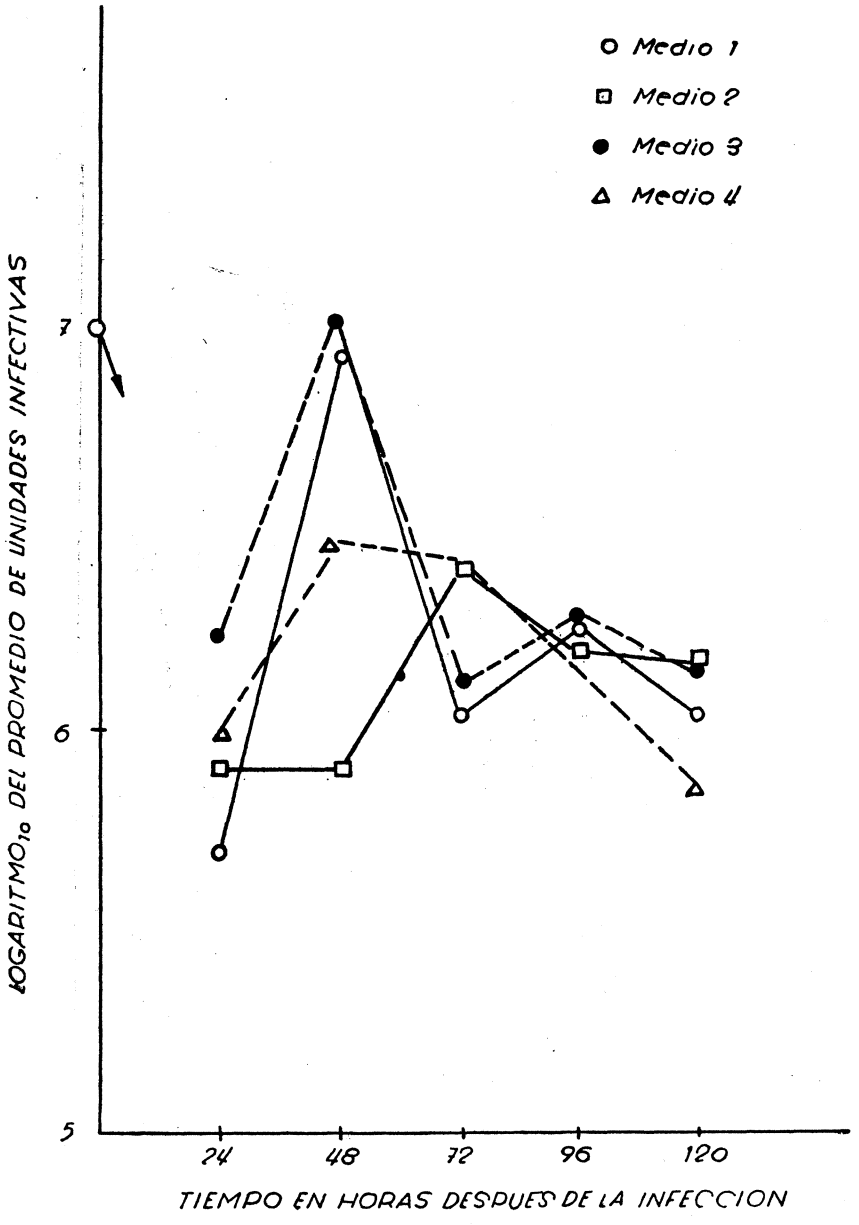
El cultivo de cuatro frascos se ha mantenido hasta la destrucción total del mismo, que tuvo lugar a los cinco días después de la infección. Los datos de cada frasco se anotan separadamente. En este intervalo se hacen tomas diarias del medio y se titula para la presencia del virus. En el cuadro II aparecen los resultados de dicha titulación, y en la gráfica número 2 se anotan las curvas de crecimiento.

Como puede verse por esta curva, el máximo de liberación de virus al medio ocurre a las cuarenta y ocho horas, en tres frascos, y a las setenta y dos, en otro.



GRÁFICA 1

Cantidad de virus herpes liberado al medio y en la fracción versene, utilizando diferentes dosis de inóculo: 4 c. c. de inóculo (Medio 1 y Versene) y 2 c. c. (Medio 2 y Versene 2).



GRÁFICA 2

Cantidad de virus herpes liberado al medio en diferentes períodos de tiempo.

CUADRO II

Tiempo en horas	Título de virus en el medio (T × 10^6) — Frascos			
	1	2	3	4
24	0,5	0,8	1,7	1,0
48	8,5	0,8	10,7	2,9
72	1,1	2,5	1,3	2,5
96	1,8	1,6	1,9	1,6
120	1,1	1,5	1,4	0,7
	13,0	17,2	17,0	8,7

c) *Influencia de lavado con PBS frío* (4° *C.*) *y caliente* (37° *C.*)

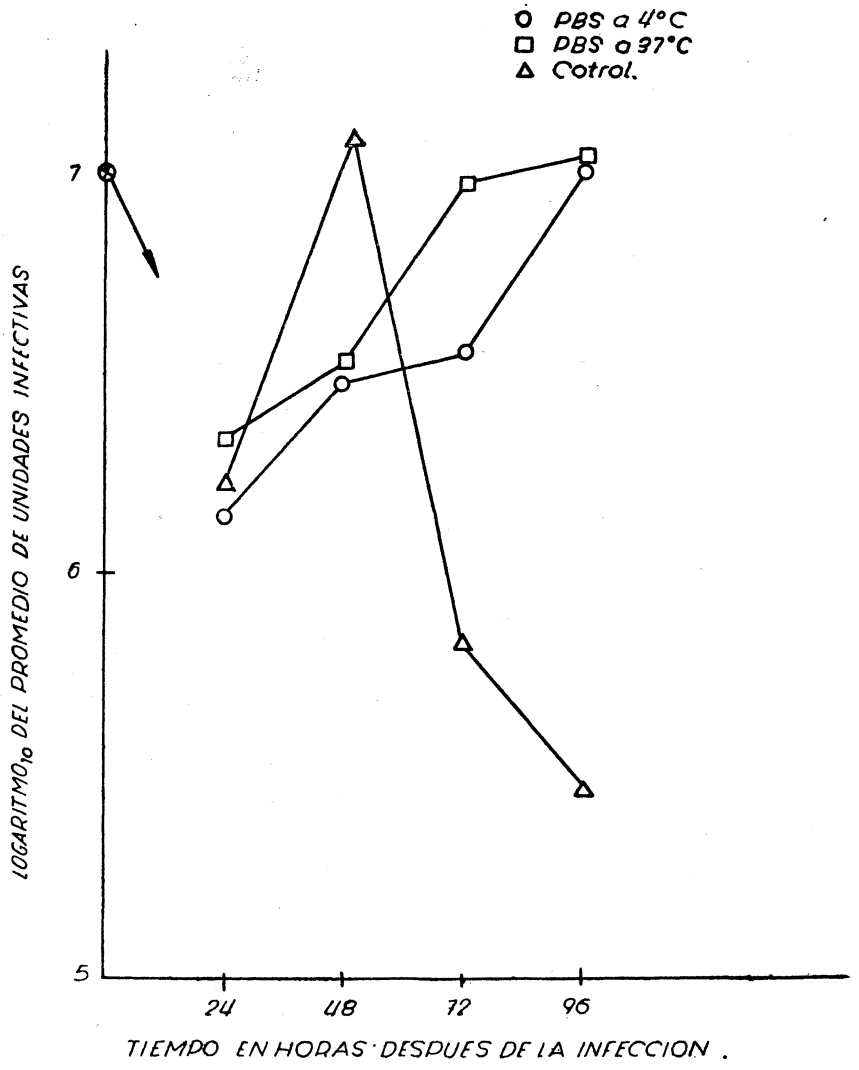
Para comprobar la influencia del lavado en las células y el cambio de medio diario en la producción de virus, hemos hecho dos experimentos empleando seis frascos en cada uno de ellos. Dos se lavan con PBS frío, dos con PBS caliente y dos que servían de control se dejan sin lavar.

El cuadro III proporciona los datos numéricos obtenidos y la gráfica 3 las curvas correspondientes al logaritmo del virus en el medio.

CUADRO III

Tiempo en horas	Título × 10^6		
	PBS (37° C.) — Medio	PBS (4° C.) — Medio	Control — Medio
24	1,4	2,2	1,7
48	3,0	3,4	12,0
72	3,6	9,5	0,7
96	10,0	11,0	0,3

Puede observarse que el lavado con PBS y el cambio de medio prolonga el período de vida activa de las células, con liberación de virus al medio. Se observa un retraso en la producción máxima de virus en estas



GRÁFICA 3

Cantidad de virus herpes, liberado al medio lavando las células diariamente con PBS frío, caliente y sin lavar.

condiciones respecto al testigo. La máxima cantidad de virus corresponde a los frascos tratados con PBS frío, siguiendo los lavados con PBS caliente y por último con poca diferencia los controles.

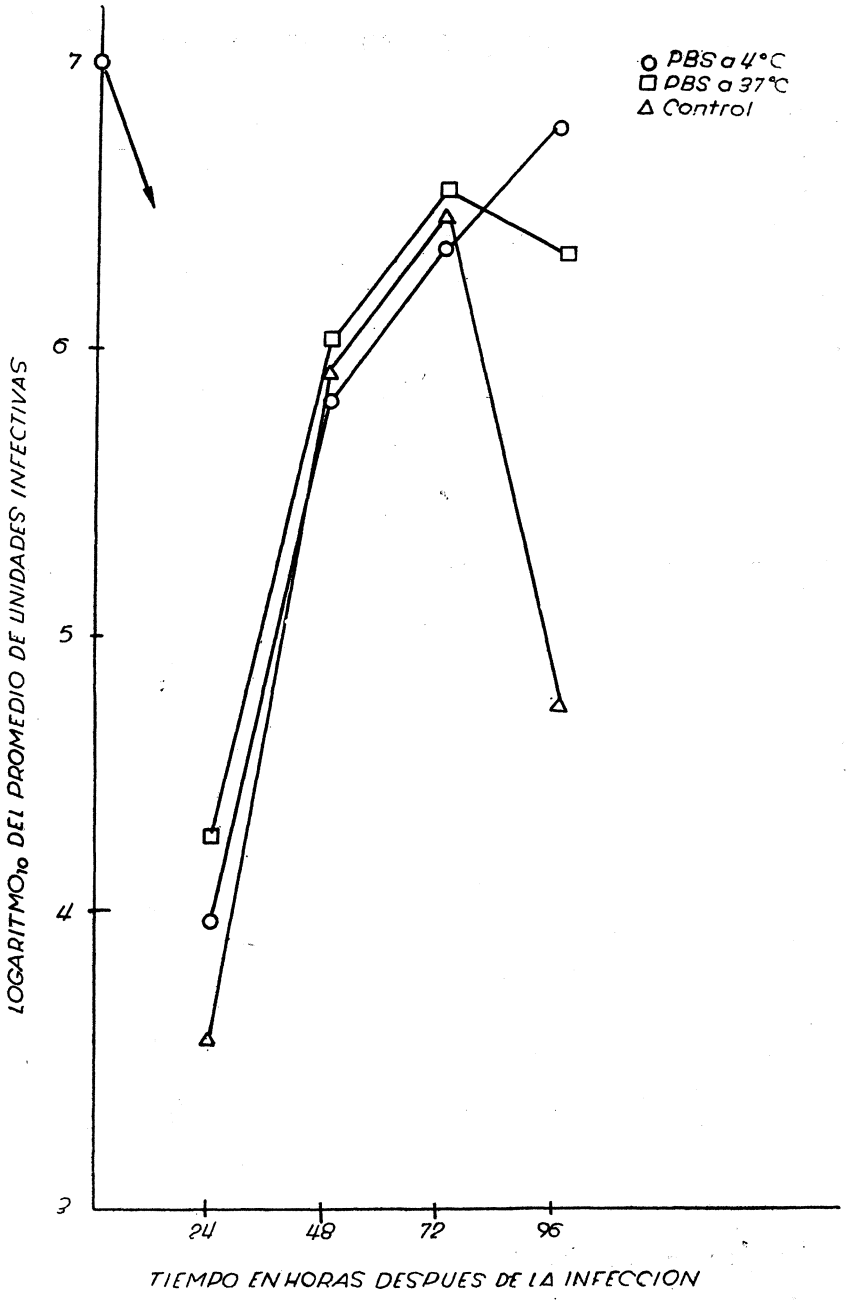
En el segundo experimento se calculó el total de producción de virus por un lado en el medio, por otro en las células y, finalmente, en el líquido del lavado. Las cantidades totales se cifran en $3{,}6 \times 10^7$ en los frascos lavados con PBS frío, $2{,}2 \times 10^7$ en los lavados con PBS caliente y $1{,}0 \times 10^7$ en los controles (Cuadro IV).

CUADRO IV

Tiempo en horas	Título $\times 10^5$							
	PBS frío			PBS caliente			Control	
	Medio	Células	Lavado	Medio	Células	Lavado	Medio	Células
24	0,1	$7{,}0 \times 10^2$	$1{,}1 \times 10^2$	0,2	$1{,}3 \times 10^3$	$1{,}8 \times 10^2$	0,04	$1{,}6 \times 10^3$
48	6,7	$4{,}1 \times 10^6$	$3{,}7 \times 10^4$	11,0	$5{,}0 \times 10^6$	$8{,}1 \times 10^4$	8,3	$1{,}5 \times 10^6$
72	23,0	$2{,}3 \times 10^7$	$1{,}5 \times 10^5$	36,0	$1{,}0 \times 10^7$	$1{,}3 \times 10^5$	30,0	$9{,}1 \times 10^6$
96	60,0	—	—	22,0	—	—	0,6	—
	89,8	$27{,}1 \times 10^6$	$18{,}7 \times 10^4$	69,2	$15{,}0 \times 10^6$	$21{,}0 \times 10^4$	38,9	$10{,}6 \times 10^6$

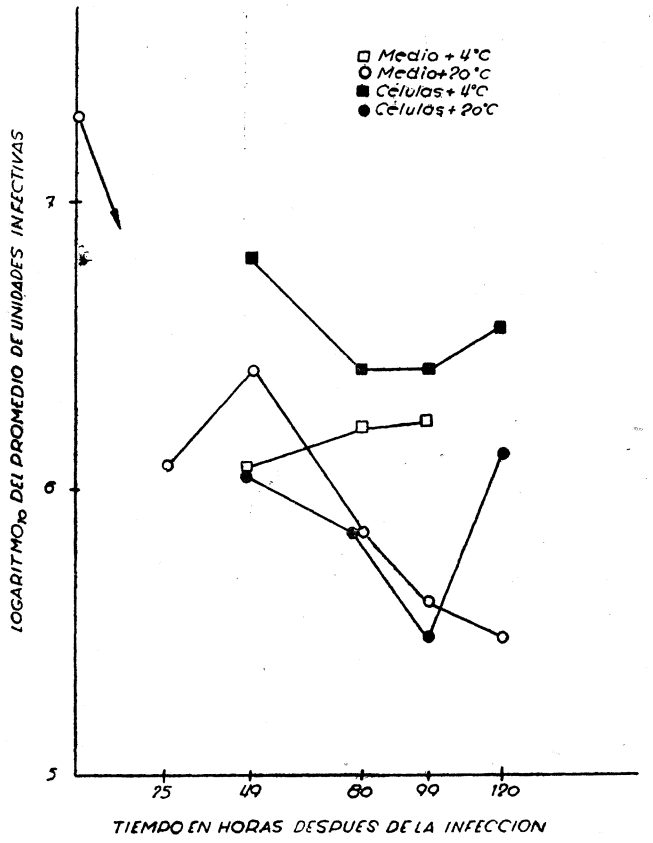
d) *Influencia de la temperatura.*

Se infectan seis frascos siguiendo la técnica general. Se incuban a 37° durante cuatro horas, y transcurrido ese tiempo, 3 frascos se dejan a temperatura ambiente, y otros 3 se llevan a 4° C. durante un período de cinco horas. Seguidamente se llevan a incubadora a 37°. Se estudia la producción de virus a las veinticinco, cuarenta y nueve, ochenta, noventa y nueve y ciento veinte horas. El cuadro número V y la gráfica 5 muestran la producción de virus liberado al medio en el interior de las células, en los intervalos citados. Los títulos más elevados corresponden a los cultivos que se mantuvieron a 4°, tanto en el contenido de virus en las células como en el medio.



GRÁFICA 4

Cantidad de virus herpes, liberado al medio lavando las células diariamente con PBS frío, caliente y sin lavar.



GRÁFICA 5

Cantidad de virus herpes, liberado al medio y en las células manteniéndolas a diferentes temperaturas.

CUADRO V

Tiempo en horas	Temperatura = 4° C.		Temperatura ambiente	
	Medio	Células	Medio	Células
25	1,0	—	1,2	—
49	1,2	6,2	2,6	1,1
80	1,6	2,6	0,7	0,7
99	1,7	2,6	0,4	0,3
120	0	3,7	0,4	1,3
	5,5	15,1	5,3	3,4

e) *Influencia de la glucosa y glutamina.*

Se siembran 40 frascos de insulina con 150.000 células en cada uno; al cabo de dos días aparece una capa celular completa; se retira el medio, se lavan tres veces con PBS y se inoculan con 0,2 c. c. de virus de título $5{,}0 \times 10^6$ en las condiciones señaladas anteriormente. Se añaden a continuación los siguientes medios:

A 10 frascos, medio con glutamina.
B 10 frascos, medio con doble cantidad de glucosa.
C 10 frascos, medio con glucosa (doble cantidad) y glutamina.
D 10 frascos testigos con medio normal.

Los resultados se señalan en el cuadro VI.

La glutamina parece tener una acción inhibidora, ya que la cantidad de virus en células y en medio en las dos series de frascos es sensible-

CUADRO VI

Tiempo en horas	Título $\times 10^6$							
	A		B		C		D	
	Medio	Células	Medio	Células	Medio	Células	Medio	Células
144	0,8	2,0	9,0	29,7	9,4	15,0	3,1	5,8

mente menor que en los medios glucosados, mientras que el aumento de glucosa parece aumentar el rendimiento de virus.

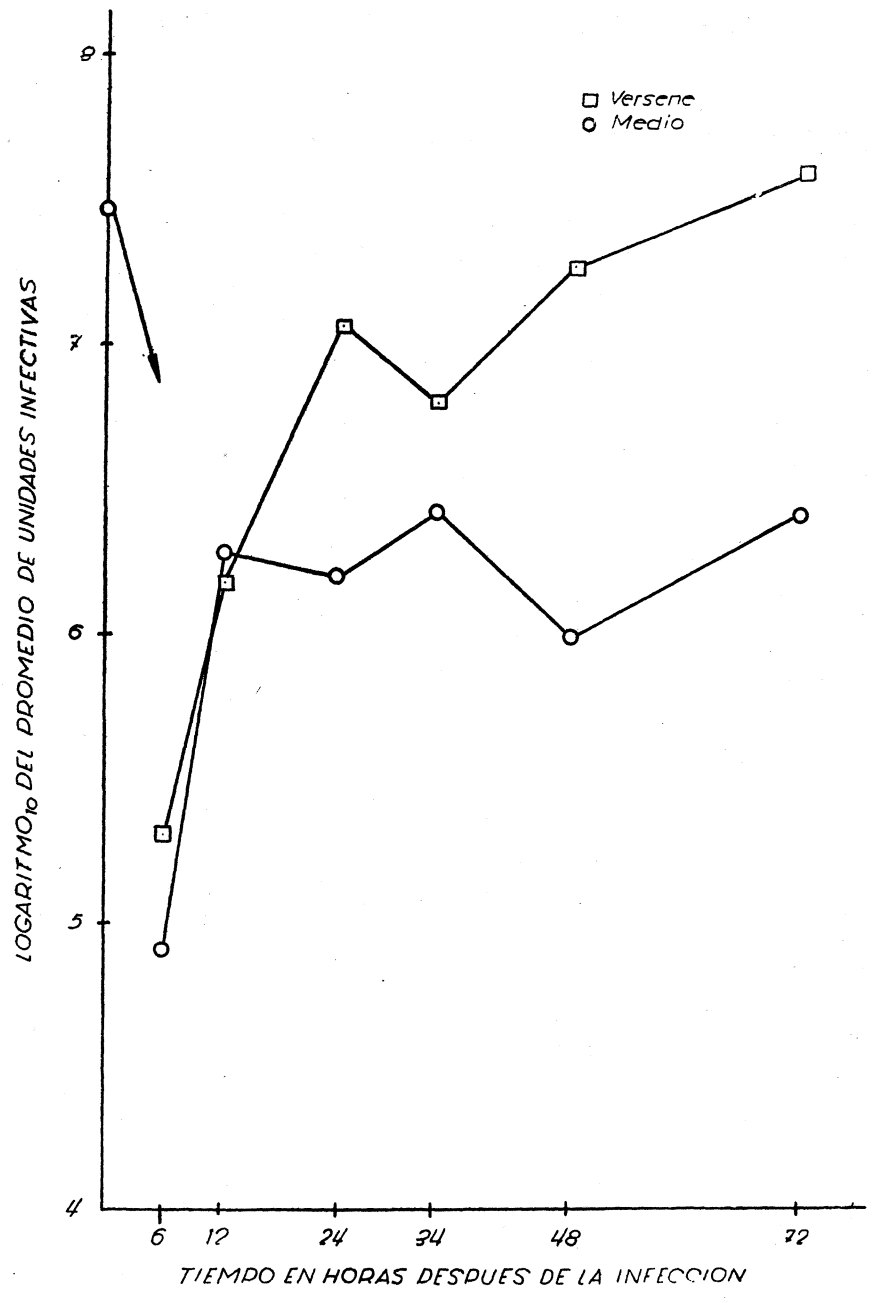
f) *Virus en el medio y en la superficie celular. Fracciones versene sucesivas.*

Con miras a la obtención de virus lo más puro posible, se ensayó la cantidad del mismo que podía extraerse de la superficie celular con sucesivos tratamientos con versene.

En un experimento preliminar se inoculan 12 frascos según la técnica general y se recoge el medio de cada dos de ellos a las seis, doce, veinticuatro, treinta y cuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas. Se añade después versene, obteniendo una primera fracción versene de los mismos. Como quiera que el rendimiento máximo de virus estaba comprendido entre las cuarenta y ocho y las setenta y dos horas, creímos que podríamos obtener diferentes fracciones en los dos últimos períodos de tiempo. Efectivamente, obtuvimos cinco fracciones versene a las cuarenta y ocho horas y otras cinco a las setenta y dos horas, como puede verse en el cuadro y en la gráfica número 7.

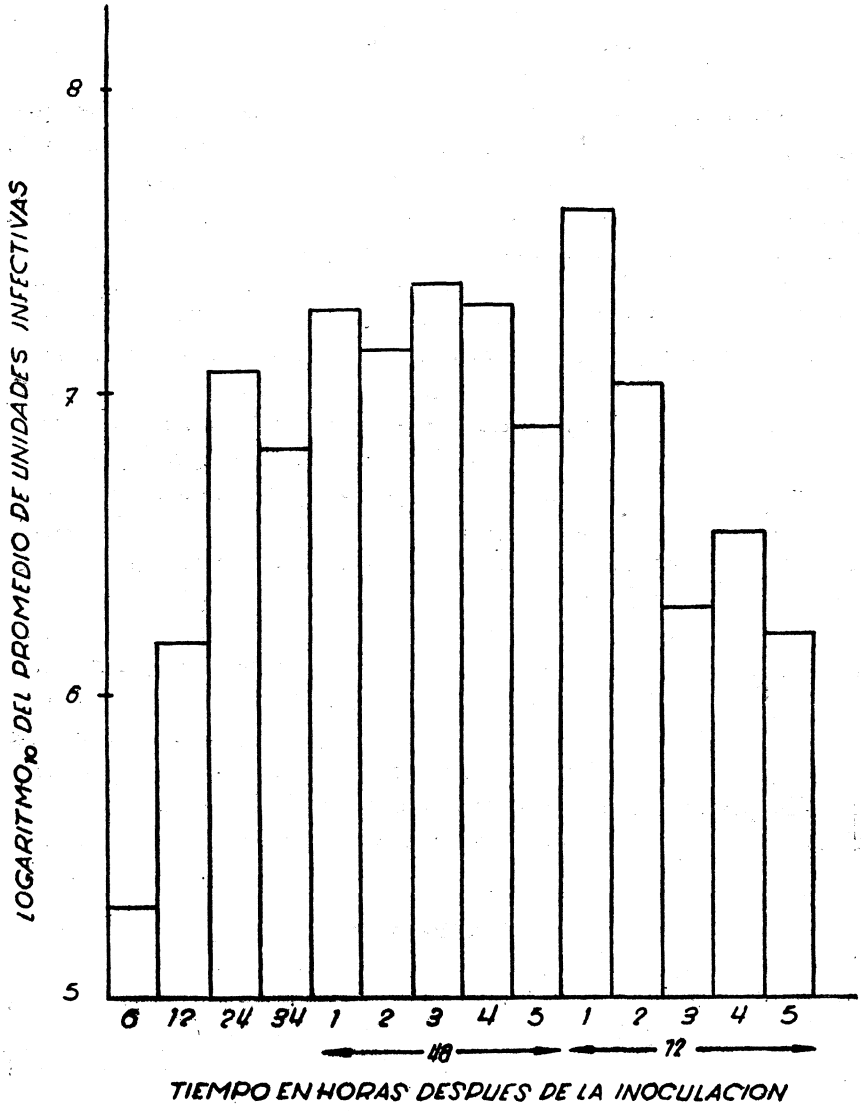
CUADRO VII

Tiempo en horas	Título $\times 10^6$						
	Medio	FRACCIONES VERSENE					
		1.°	2.°	3.°	4.°	5.°	Suma
6	0,8	0,2	—	—	—	—	0,2
12	19,0	1,5	—	—	—	—	1,5
24	16,0	10,2	—	—	—	—	10,2
34	27,0	6,5	—	—	—	—	6,5
48	10,0	19,6	14,0	23,0	20,0	8,0	84,6
72	27,0	41,0	11,0	2,0	3,5	1,6	59,1



GRÁFICA 6

Cantidad de virus herpes, liberado al medio y obtenido de la superficie celular en la primera fracción Versene.



GRÁFICA 7

Cantidad de virus herpes, obtenido por sucesivas fracciones Versene.

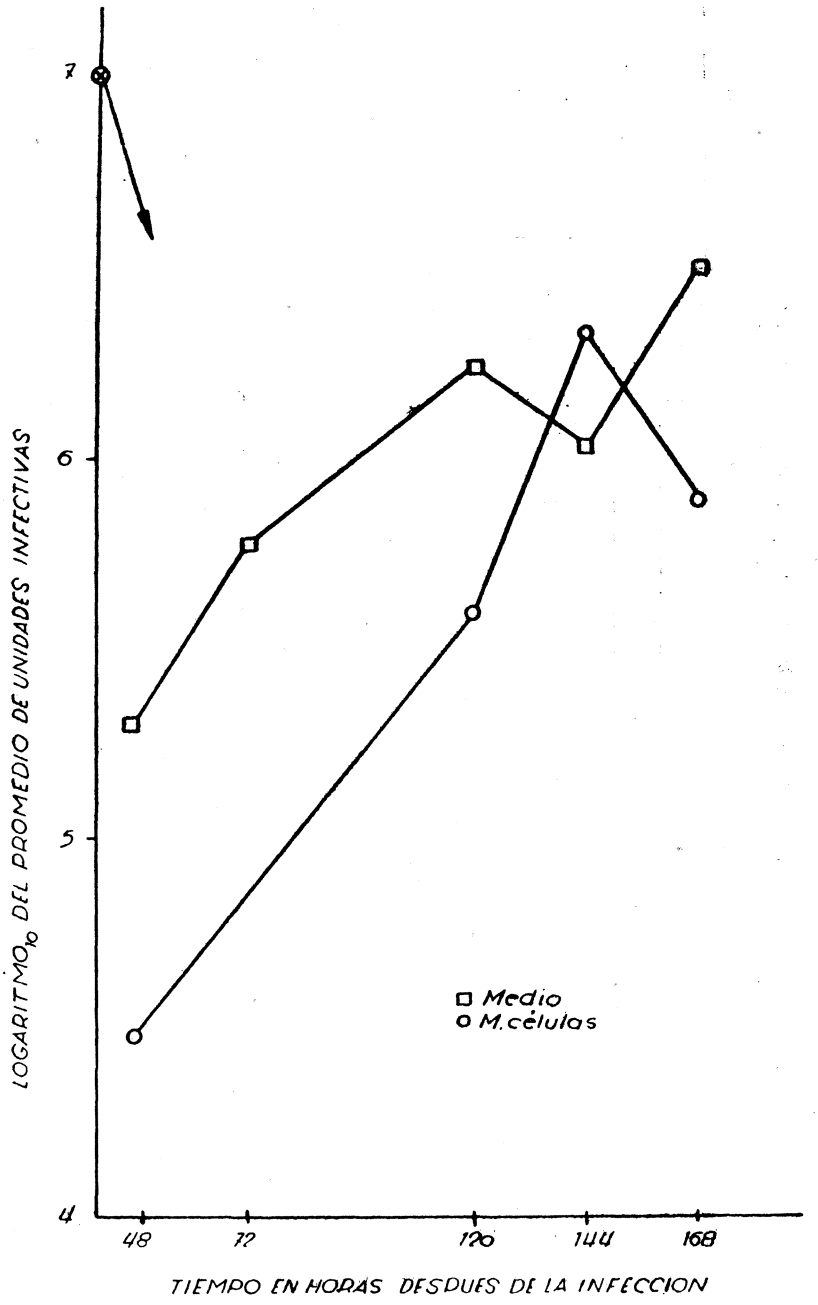
g) *Rendimiento total de virus.*

Probada la posibilidad de extraer diferentes fracciones versene, quedaba por comprobar la cantidad total de virus que corresponde a la suma del virus en el medio, en las distintas fracciones versene y en el interior de las células. Quisimos determinar también si el virus de las fracciones versene estaba realmente en la superficie celular o bien si en las distintas incubaciones con el versinato se rompían las células y parte del líquido obtenido llevaba virus del interior de aquéllas. También si podían obtenerse más fracciones versene, llegando hasta diez consecutivas. Para ello realizamos las pruebas siguientes: en la primera de ellas se titula el virus obtenido de tres frascos, tanto en el medio como en el interior de las células que se encuentran muertas flotando en aquél. (Gráfica número 8). A las ciento sesenta y ocho horas se añade versene a las células y se obtienen sucesivas fracciones. Las células de la última se rompen por congelación-descongelación a base de diez cambios sucesivos de nieve carbónica a baño a 37°.

En este experimento se tuvo cuidado al resuspender las células en las sucesivas fracciones versene de pipetear el mismo número de veces para que la acción mecánica del versene sobre las células fuera siempre la misma. Como se aprecia en el cuadro VIII y gráfica número 9 se obtienen títulos decrecientes en las sucesivas fracciones. Se comprueba también que las células al final de la prueba contienen en su interior cantidad de virus mayor que la obtenida en la primera fracción versene.

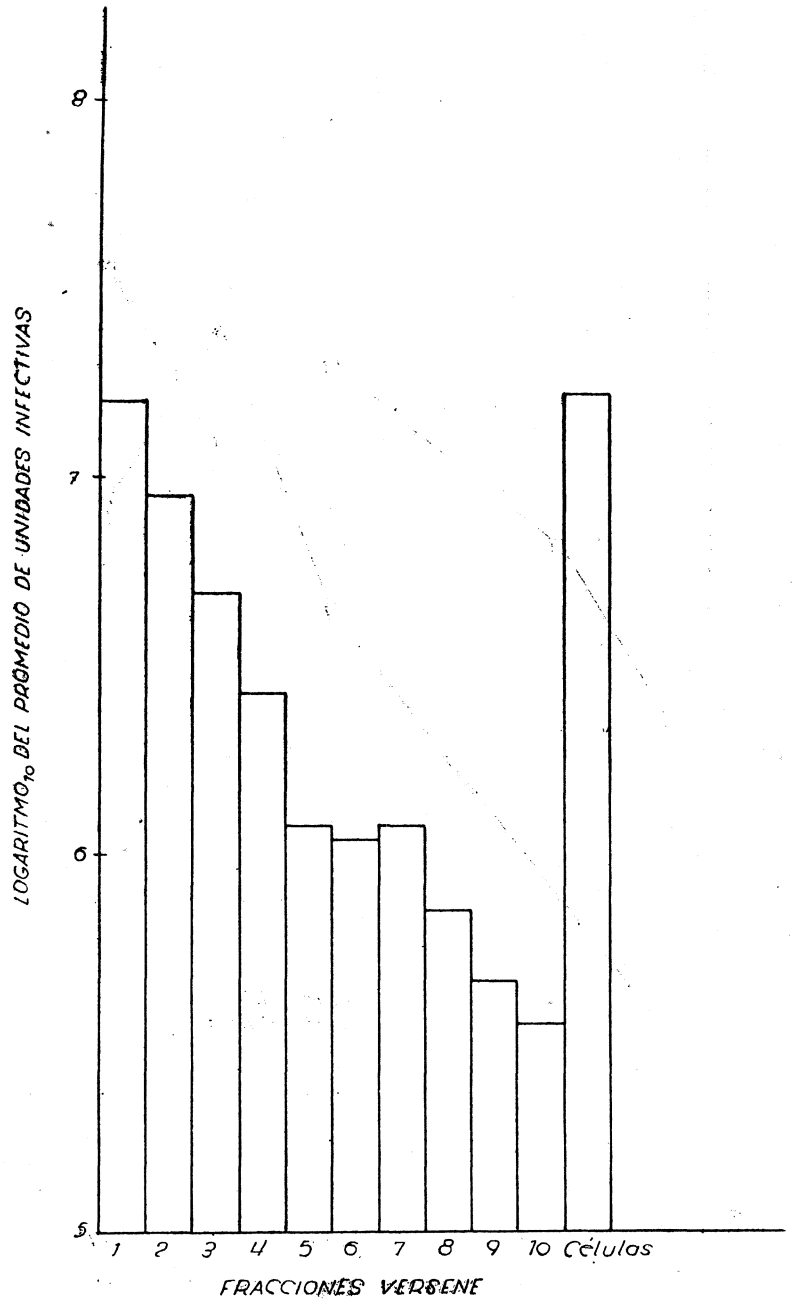
CUADRO VIII

Tiempo en horas	$T \times 10^6$ — Medio	Título $\times 10^5$										
		Células del medio	FRACCIONES VERSENE									
			1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	7.ª	8.ª	9.ª	10.ª
48	0,2	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—		—
72	0,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120	1,8	4,0	—	—	—		—	—	—	—	—	—
144	1,1	22,0	160	90	40	27	20	10	20	6,1	3,7	2,6
168	3,3	8,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—



GRÁFICA 8

Cantidad de virus herpes, obtenido de la superficie celular por sucesivas fracciones versene y de las células, desintegrándolas por diez cambios sucesivos de baño-María a 37° C. y nieve carbónica.



Gráfica 9

Cantidad de virus herpes, producido en las células Hela. Titulación hecha en el medio (virus liberado) y en las células, desintegrándolas por diez cambios sucesivos de baño-María a 37° C. y nieve carbónica.

En la segunda prueba se siembran 36 frascos siguiendo la misma técnica y se titula el virus producido en diferentes tiempos, en el medio de cultivo, en las células flotantes en el mismo, en las fracciones versene y, finalmente, en las células después de obtener la última fracción versene. Se comprueba una vez más la mayor cantidad de virus en las células que en las fracciones versene y en éstas a su vez mayor que en el medio. (Cuadro IX y gráficas números 9 y 10.)

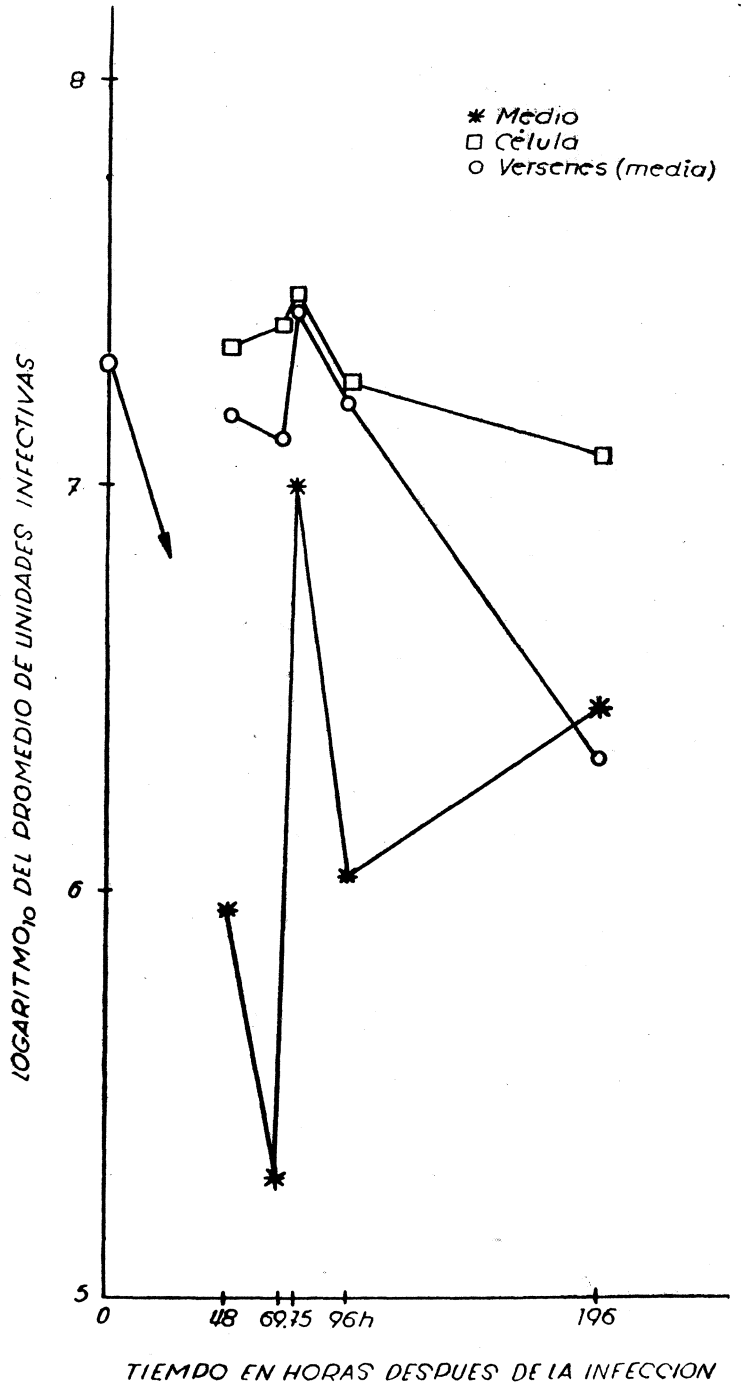
La máxima cantidad de virus se obtiene a las setenta y cinco horas.

La comparación entre el método de desintegración celular por diez cambios sucesivos de nieve carbónica a estufa a 37° C. y el empleo de un triturador mecánico para romper las células en agua destilada demuestra que la cantidad de virus obtenida por el primer procedimiento es notablemente mayor.

La gráfica número 11 muestra el número total de partículas víricas infectivas producidas por cada célula desde las cuarenta y ocho a las ciento sesenta y ocho horas a partir de la infección.

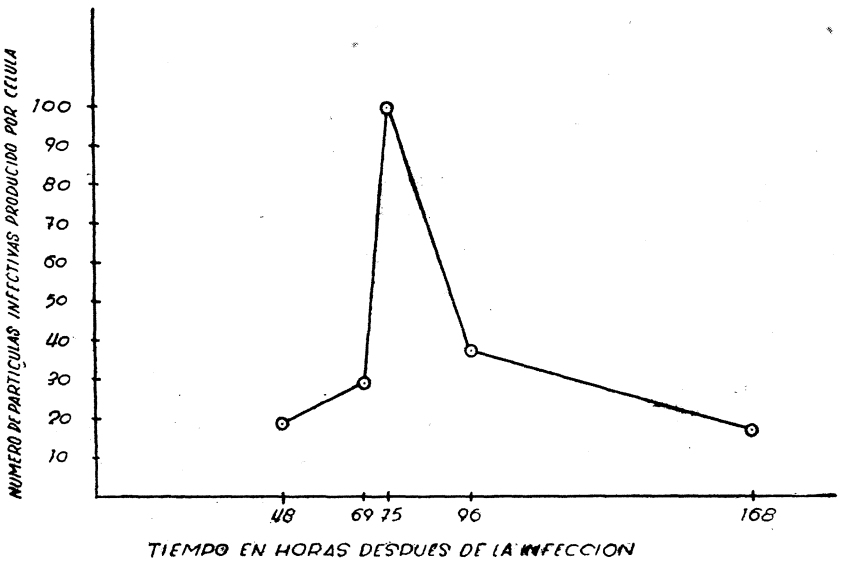
CUADRO IX

Tiempo en horas	Título × 10^6						Congelando-Descongelando T × 10^7		Triturador mecánico T × 10^6 — Células Versene	TOTAL virus × célula
	Medio	FRACCIONES VERSENE					Células Versene	Células medio		
		1.°	2.°	3.°	4.°	5.°				
48	0,9	2,2	7,1	3,5	2,0	0,8	2,2	1,2	5,9	19
69	0,2	0,5	2,7	2,3	2,5	3,0	2,5	2,1	4,0	29
75	10,4	4,2	3,8	4,7	10,0	4,3	2,9	2,8	1,0	100
96	1,1	4,6	2,4	3,8	2,9	3,1	1,8	0,2	3,9	38
168	2,9	1,0	1,2	—	—	—	1,2	1,2	5,1	18



GRÁFICA 10

Cantidad total de virus herpes obtenido del medio, de las fracciones versene y de las células.



GRÁFICA II

Cantidad total de virus herpes producido por las células Hela en diferentes horas. Cada punto de la figura representa la suma de partículas infectivas liberados al medio en la superficie celular en el interior de las células.

DISCUSION

El primer experimento realizado demuestra que la siembra de 2 centímetros cúbicos de simiente de virus, en frascos de cultivo de 200 centímetros cúbicos de capacidad, es suficiente en cuanto al poder infectante, aunque el título que se obtiene es ligeramente más bajo que cuando se emplean 4 c. c. de la misma.

Parece deducirse que son las partículas víricas que están en contacto con el cultivo las que se absorben por las células, por lo que la infección es independiente del espesor de la capa líquida que se utilice, con tal de que la superficie celular esté totalmente cubierta por la simiente.

Ahora bien; hemos obtenido diferencias del orden de una unidad logarítmica, en la cantidad de virus liberado al medio, en cada cultivo, aunque se han empleado las mismas dosis de inóculo y se ha operado con

idéntica cepa del mismo y de células HeLa, y se han mantenido en iguales condiciones.

Este hecho podría estar en relación con la presencia de los diversos tipos de virus señalados por Grey y cols. 1958 (proliferativo, no proliferativo y citopatogénico con formación de células gigantes), pero nos inclinamos a creer que se trata más bien de diferentes respuestas de las células a la infección vírica, dependientes del estado fisiológico de las mismas; como, por ejemplo, la fase de mitosis en que se encuentren. No podemos deducir ninguna conclusión a este respecto, por no haber dispuesto de células sincronizadas. El período de máxima liberación de virus se extiende de las cuarenta y ocho a las setenta y dos horas a partir de la infección, cifras que están dentro de los límites señalados por los distintos autores, que hemos descrito en el comienzo de este trabajo. La consecuencia es que si se desea obtener el mayor rendimiento en virus, podría ser interesante prolongar el tiempo de cultivo hasta su destrucción total, haciendo tomas diarias a partir de las cuarenta y ocho horas.

Hemos conseguido demostrar que el cambio de medio cotidiano y los lavados sucesivos con PBS aumentan la cantidad de virus liberado al medio, recogiéndose cada día igual cantidad que la acumulativa que se obtiene normalmente cada tres días sin dicho requisito. Es indudable que en este caso interviene la inactivación del virus por la temperatura de incubación a 37° C. en la disminución de rendimiento, pero quizá hay otro factor que no se ha tenido en cuenta.

Efectivamente, Morgan (1954) y Stocker y cols. (1958) han observado con ayuda del microscopio electrónico la localización de numerosas partículas víricas en las invaginaciones de la membrana celular.

Esta acumulación de virus en la superficie celular pudiera actuar como una barrera que impide la liberación de nuevas partículas, por lo cual la dislocación de la misma, a consecuencia del lavado con PBS y el cambio de medio, pudiera permitir la afloración a la superficie de nuevas partículas. Esto acarrearía una disminución de virus en el interior de las células y, por tanto, explicaría la supervivencia mayor de las sometidas a este método, como hemos observado en nuestro trabajo.

No puede tampoco descartarse que algunas de las partículas víricas de la superficie celular pasen de nuevo a su interior, agravándose así la infección. Es difícil comprobar si las partículas infectivas liberadas por una célula son capaces de reinfectarla de nuevo en estas condiciones.

El aumento de partículas víricas que hemos señalado cuando se mantiene el cultivo a 4° C., después de la infección, en lugar de llevarlo seguidamente a 37° C., se explica en parte por la inactivación resultante de esta temperatura, pero a nuestro juicio interviene asimismo el hecho de que a 4° C. se favorezca la adsorción y la invasión de las células, o más probablemente que éstas, por su actividad amortiguada, no pueden reaccionar adecuadamente ante la infección, que se manifiesta con mayor intensidad.

El sensible aumento de la cantidad de virus total que se recoge cuando se obtienen varias fracciones versene puede tener interés para el estudio de la naturaleza y composición química de aquél, por ser el virus que se separa en ellas, lo mismo que el recogido del medio, mucho más puro que el del interior de las células.

CONCLUSIONES

1) Se ha encontrado que la producción máxima de partículas víricas infectivas para la membrana corioalantoidea del embrión de pollo en los cultivos de virus Herpes simplex en células HeLa, tiene lugar entre las cuarenta y ocho y las setenta y dos horas. El número medio por célula de unidades infectivas productoras de lesiones es aproximadamente de cien a las setenta y cinco horas después de la infección.

2) Los títulos de virus más elevados corresponden en orden decreciente a 1° interior de las células, 2° fracciones versene, 3° medio nutritivo.

3) Tratando las células con versene, se obtienen, por lo menos, diez fracciones sucesivas con partículas infectivas procedentes de la superficie celular, con títulos progresivamente decrecientes.

4) Llevando las células a las cuatro horas de la infección a la temperatura de 4° C., y manteniéndolas a esa temperatura durante cinco horas, se nota un incremento de partículas infectivas en el interior de las células, pero sin liberación al medio.

5) La adición de glutamina al medio decrece el número de partículas infectivas. Por el contrario si se duplica la cantidad de glucosa se triplica la producción.

6) El procedimiento mejor para desintegrar células y obtener virus es el proceder a congelación en nieve carbónica y descongelación a 37° centígrados alternadas repitiéndolas diez veces. Este método da mejores resultados que el desintegrarlas por medio de un triturador mecánico en agua destilada.

RESUMEN

Se han estudiado las condiciones óptimas para el cultivo del virus Herpes simplex en células HeLa. La máxima producción corresponde a un período comprendido entre las cuarenta y ocho y las setenta y dos horas después de la infección. Las condiciones óptimas que se han encontrado son: *a*) Lavado con PBS y cambio de medio diario. *b*) Mantenimiento de las células a 4° C., durante cinco horas después de la infección. *c*) Doble cantidad de glucosa en el medio. La presencia de glutamina disminuye la producción de virus. Se puede obtener virus de la superficie celular tratando las células con 10 fracciones sucesivas versene.

SUMMARY

A study has been made of the optimum conditions to grow Herpes simplex virus in HeLa cells. The maximum production is always obtained between 48 and 72 hours after infection. The optimum conditions are found to be: *a*) Daily washing with PBS and changing medium. *b*) Keeping the culture at 4° C. for about 5 hours after infection. *c*) Doubling the amount of glucose in the medium. The presence of glutamine decreases the production of virus. Appreciable production, can be obtained from the cells surface in up to 10 succesive versene fractions.

BIBLIOGRAFIA

BARSKI, G.; LAMY, M. y LEPINE, P. 1955. Culture de cellules trypsineés de rein de lapin et leur application a l'étude des virus du groupe herpetique. Ann. Inst. Pasteuer, 89, 415.

DULBECCO, R. y VOGT, M. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. 99,167.

GRAY, A.; TOKUMARU, T. y SCOTT. 1958. Different cytopathogenic effects observed in HeLa cells infected with Herpes simplex virus. Arch. f. Virusforsch. 8, 59.

JAWETZ, E.; COLEMAN, V. R. y MERRIL, E. R. 1955. Studies on Herpes simplex virus. VII Immunological comparison of strains of Herpes simplex. J. Immunol. 75, 28.

KAPLAN, A. S. 1957. A Study of the Herpes simplex virus rabbit kidney cell system by the plaque technique. Virology 4, 435.

MORGAN, C.; ELLISON, S. A.; ROSE, H. M. y MOORE, D. H. 1954. Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. I. Herpes simplex virus. J. Exp. Med. 100, 195.

NADAJE, J.; TAMM, I. y OVERMAN, J. R., 1955. A new technique for dropping the chorioallantoic membrane in embryonated chicken eggs. J. Lab. clin. Med. 46, 648.

SCOTT, T. F.; CORIELL, L. L.; BLANK, H., y GRAY, A. 1953 a. The growth curve of the virus of Herpes simplex on the chorioallantoic membrane of the embryonated hen's egg. J. Immunol. 71, 134.

SCOTT, T. F.; BURGOON, C. F.; CORIELL, L. L. y BLANK, H. 1953 b). The growth curve of the virus of Herpes simplex in rabbit corneal cells grown in tissue culture with parallel observations on the development of the intranuclear inclusion body. J. Immunol. 71, 385.

SOSA-MARTÍNEZ, J.; GUTIÉRREZ-VILLEGAS, L. y SOSA, R. M. 1955. Propagation of Herpes simplex virus in tissue culture of rabbit kidney. J. Bacteriol. 70, 391.

STOKER, M. G. P.; SMITH, K. M. y ROSS, R. W. 1958. Electron microscope studies of HeLa cells infected with Herpes virus. J. gen. Microbiol. 19,244.

STOKER, M. G. P. y ROSS, R. W. 1958. Quantitative studies on the growth of Herpes virus in HeLa cells. J. gen. Microbiol. 19, 250.

WILDY, P. 1954. The growth of Herpes simplex virus. Austral. J. exp. Biol. Med. Sci. 32, 605.

YOSHINO, K. 1956. Infection of one day old fertile hen's egg with Herpes simplex virus. J.Immunol. 76, 301.

YOSHINO, K. y TANIGUCHI, H. 1957. Further studies on the growth of Herpes simplex virus in the egg-white-replaced one day egg. Jap. J. Med. Sci. & Biol. 10, 257.

Depósito legal: M. 702. 1958.

Artes Gráficas REYES. - Jerónima Llorente, 15 - MADRID