

Microbiología Española

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



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, distribuidas 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.

Dedicada 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 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
Nota previa sobre un virus de tipo "Ringspot" encontrado en <i>Petunia hybrida</i> Vilm, por Miguel Rubio Huertos	325
Inclusiones intracelulares producidas por diferentes virus del clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>), por Miguel Rubio Huertos...	331
Obtención de las formas "L" de <i>Cl. tetani</i> inducidas por glicocola, por C. González y Miguel Rubio Huertos	339
Aislamiento de una cepa poco virulenta del virus de la ornitosis, por A. P. García Gancedo	353
Resistencia a los antisépticos, de levaduras aisladas de mostos de manzana de Guipúzcoa, por Baldomero Iñigo y David Vázquez	373
Sensibilidad del <i>Bacillus cereus</i> a algunos antibióticos, G. Tejerina Domínguez	383
Estudio comparativo de diversas cepas de virus vacunal cultivadas sobre células Hela, por Carmen Gil, Angel P. García, M. ^a Luisa Alonso y Eduardo Gallardo	401
La semántica en el origen de la materia viva, por Román de Vicente Jordana	409
El principio de la materia viva como unidad funcional biológica, por Román de Vicente Jordana	413
Competencia de síntesis en el principio de la materia viva: razón y efecto del llamado fenómeno de citoarjesis, por Román de Vicente Jordana	423
Actividades de la Sociedad	439

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.

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.

INDICE

	Páginas
Actas de la Sociedad	85
Actividades de la Sociedad	439
Alonso, M. ^a Luisa.—Véase Gil, Carmen	
Callao, V., y Montoya, E.—Formación del aldehído acético en la fermentación acetono-butílica	193
Chodat, F. y Ramírez, C.—Etudes sur la périodicité des types d'échanges gazeux chez une levure: <i>Kloeckera apiculata</i> (Rees emend. Klöcker) Janke	265
Feduchy, E.—Véase Portolés, A.	
Fernández, F.—Sobre un nuevo método de tinción de bacilos esporulados	187
Gallardo, E., y Zuazo, M. ^a del Rosario de.—Ensayos experimentales sobre la formación de anticuerpos fijadores del complemento del virus vacunal, según las vías de inoculación utilizadas	87
Gallardo, E.—Véase Gil, Carmen	
García-Gancedo, A. P.—Aislamiento de una cepa poco virulenta del virus de la ornitosis	353
García-Gancedo, A. P.—Véase Gil, Carmen	
Gil, Carmen.—Influencia de diversos factores en el desarrollo del virus <i>Herpes simplex</i> en células Hela... ..	297
Gil, Carmen; García-Gancedo, P.; Alonso, M. ^a Luisa, y Gallardo, E.—Estudio comparativo de diversas cepas de virus vacunal cultivadas sobre células Hela	401
González, Cándida, y Rubio-Huertos, M.—Obtención de las formas L del <i>Cl. tetani</i> inducidas por glicocola	339
Iñigo, B., y Vázquez, D.—Los blastomicetos en las sidras de Asturias	161
Iñigo, B., y Vázquez, D.—Resistencia a los antisépticos, de levaduras aisladas de mostos de manzana de Guipúzcoa	373
Jordá, R.; López, M., y Regueiro, B.—Un nuevo <i>Streptomyces</i> con propiedades antibacterianas y antifúngicas	55
López, M.—Véase Jordá, R.	
Malo, J. L., y Regueiro, B.—Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. II. Influencia de los iones metálicos en la fermentación en superficie	65

	Páginas
<i>Malo, J. L., y Regueiro, B.</i> —Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. III. Influencia de los alcoholes en la fermentación en superficie	139
<i>Malo, J. L., y Regueiro, B.</i> —Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. IV. Factores que influyen en la fermentación en sumergido	243
<i>Montoya, E.</i> —Véase <i>Callao, V.</i>	
<i>Otero, R., y Regueiro, B.</i> —Estudios sobre metabolismo enzimático del <i>Streptomyces griseus</i> . I. Actividad α -glucosidasa ...	1
<i>Portolés, A., y Feduchy, E.</i> —Micosis urinarias subordinadas a la presencia de sustancias antibióticas	199
<i>Ramírez, C.</i> —Véase <i>Chodat, F.</i>	
<i>Regueiro, B.</i> —Véase <i>Otero, R.</i>	
<i>Regueiro, B.</i> —Véase <i>Jordá, R.</i>	
<i>Regueiro, B.</i> —Véase <i>Malo, J. L.</i>	
<i>Rosell, M.</i> —Véase <i>Rubio-Huertos, M.</i>	
<i>Rubio-Huertos, M., y Rosell, M.</i> —Estudio de un nuevo virus encontrado en <i>Petunia hybrida</i>	105
<i>Rubio-Huertos, M.</i> —Nota previa sobre un virus de tipo “Ringspot” encontrado en <i>Petunia hybrida</i> Vilm	325
<i>Rubio-Huertos, M.</i> —Inclusiones intracelulares producidas por diferentes virus del clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	331
<i>Rubio-Huertos, M.</i> —Véase <i>González, Cándida.</i>	
<i>Tejerina, Genoveva.</i> —Sensibilidad del <i>Bacillus cereus</i> a algunos antibióticos	383
<i>Vázquez, D.</i> —Véase <i>Iñigo, B.</i>	
<i>Vicente-Jordana, R. de.</i> —La semántica en el origen de la materia viva	409
<i>Vicente-Jordana, R. de.</i> —El principio de la materia viva como unidad funcional biológica... ..	413
<i>Vicente-Jordana, R. de.</i> —Competencia de síntesis en el principio de la materia viva: razón y efecto del llamado fenómeno de citoarjesis	423
<i>Zuazo, M.^a del Rosario de.</i> —Determinación de anticuerpos fijadores del complemento en sueros de conejos inmunizados con virus antivariólico (Conclusión.)	25
<i>Zuazo, M.^a del Rosario de.</i> —Véase <i>Gallardo, E.</i>	

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MADRID

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

NOTA PREVIA SOBRE UN VIRUS DE TIPO «RINGSPOT» ENCONTRADO EN *PETUNIA* *HYBRIDA* VILM

POR
MIGUEL RUBIO HUERTOS

Continuando el estudio de una serie de virus aislados de plantas de *Petunia* de algunos jardines privados de Madrid (1), describimos en este trabajo algunas de las características principales de uno de estos virus, el cual produce síntomas de ringspot sobre sus plantas huésped.

Transmisibilidad.

Es transmisible inoculando con la savia, utilizando carborundo como abrasivo.

No hemos probado la transmisión por insectos. El haber encontrado durante cuatro años plantas infectadas, siempre en los mismos lugares y no en otros, incluso cercanos, nos hace pensar en la posibilidad de que sea transmitido por el suelo, aunque no hemos podido hallar el mecanismo por el cual se efectúa la transmisión.

Plantas en que se ha probado la infectividad de este virus.

a) Plantas susceptibles:

Petunia hybrida Vilm.

Nicotiana glutinosa L.

Nicotiana tabacum L.

b) Plantas inoculadas no susceptibles:

Datura Stramonium L.
Lycopersicum esculentum Mill.
Capsicum frutescens L.
Vigna sinensis Endl.
Vigna sexquipedalis.
Phaseolus vulgaris.

*Sintomatología*a) *Síntomas externos:*

Las hojas de *Petunia* infectadas con este virus presentan típicos anillos concéntricos cloróticos (fig. 2) perfectamente delimitados. Los síntomas aparecen a los 10-12 días de la inoculación en las hojas jóvenes, aunque este tiempo de aparición de los síntomas no es constante, pues varía con la temperatura del invernadero y, en general, con el estado de crecimiento de la planta.

En *Nicotiana glutinosa* los síntomas son muy parecidos a los que se producen en *Petunia*; ringspot típico y zonas cloróticas formando anillos y bandeados concéntricos; los síntomas aparecen algo más tarde que en *Petunia*.

Nicotiana tabacum. En esta planta los síntomas empiezan a los 8-12 días como un ligero mosaico poco conspicuo y más tarde se ven pequeños anillos concéntricos de diámetro reducido (4-8 mm.), pero que sólo se pueden apreciar bien mirando las hojas por transparencia. No presentan nunca síntomas de necrosis.

Los síntomas que hemos descrito en estas tres especies que hemos encontrado susceptibles, suelen desaparecer al cabo de dos meses de la inoculación y las plantas recobran el aspecto normal, lo que es muy corriente y típico en plantas infectadas con la mayoría de los tipos de virosis conocidas que causan la formación de anillos (ringspot) en las hojas de las plantas infectadas.

b) *Síntomas internos:*

Histopatología. Tanto las plantas de *Petunia* como las de *N. glutinosa* y *N. tabacum* infectadas con este virus presentan inclusiones intracelulares de dos tipos, unas granulares amorfas y otras cristalinas que

hemos descrito en otro trabajo (2). Las inclusiones cristalinas tienen características especiales que las hace distinguirse de otras inclusiones de tipo cristalino conocidas (fig. 2).

Forma del virus

En preparaciones observadas con el microscopio electrónico las partículas del virus aparecen como bastoncillos flexuosos de 300×15 milimicras, aproximadamente (3) (fig. 3).

Las características de infección (host range), sintomatología, la forma del virus y su histopatología le hacen diferenciarse claramente de los virus del tipo ringspot conocidos hasta ahora (4).

SUMMARY

A probably new virus of *Petunia* was found in Spain. This virus produces systemic infection with ringspot symptoms in *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* and *Petunia* species, but does not infect *Datura-stramonium* L., *Lycopersicum sculentum* Mill, *Capsicum frutescens* L., *Vigna sinensis* Endl, *Vigna sexquipedalis* and *Phaseolus vulgaris*. Inclusion bodies of amorphous and crystalline type are found in the cells of the host plants infected with this virus. The virus is flexuous rod-shaped as seen by electron microscopy; it is sap transmissible: Its host range and symptomatology differ from *Petunia* and ringspot viruses reported elsewhere.

REFERENCIAS

- (1) RUBIO, M. y ROSELL, M. 1959. Estudio de un nuevo virus encontrado en *Petunia hybrida*. Microbiología Española. 12, 105-138.
- (2) Trabajo presentado al Congreso de protección de plantas de Hamburgo. 1957.
- (3) El estudio de las inclusiones intracelulares al microscopio electrónico así como los datos estadísticos sobre medidas de las partículas del virus constituye un trabajo aparte, realizado en colaboración con el Dr. F. CATALINA, del Instituto "Daza de Valdés", de Optica, y que está pendiente de publicación.
- (4) SMITH KENNETH, M. A. Textbook of Plant Virus Diseases.



FIGURA 1.
Síntomas de ringspot en *Petunia*.

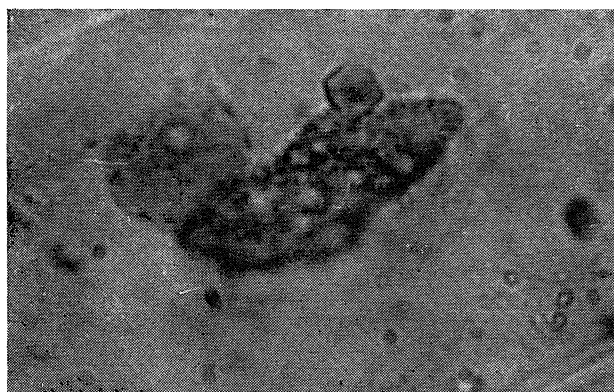


FIGURA 2.
Inclusiones producidas por el virus de la *Petunia* en *N. Tabacum*. Se ven junto al núcleo, una inclusión amorfa y otra cristalina.

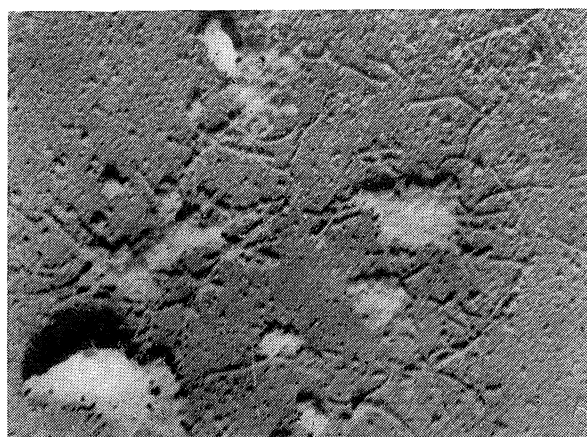


FIGURA 3.
El virus de la *Petunia*, visto al microscopio electrónico. x 15.000.

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

INCLUSIONES INTRACELULARES PRODUCIDAS POR DIFERENTES VIRUS DEL CLAVEL (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS*)

POR
MIGUEL RUBIO HUERTOS

Lo mismo que la mayor parte de las plantas que son propagadas vegetativamente, los claveles (*Dianthus caryophyllus*) se encuentran fuertemente atacados por virus; y lo que es más raro, apenas se les ha prestado atención en este aspecto hasta hace poco, a pesar de que en algunos países, incluido entre ellos España, la producción de claveles para la exportación constituye un capítulo de interés económico cada vez mayor.

Kassanis, en 1955, aisló de plantas de clavel cuatro virus diferentes, no relacionados serológicamente, que con los ya conocidos *Carnation mosaic* y *streak*, que es posible estén relacionados con los anteriores, son los que se conocen hasta la fecha. De ninguna de estas virosis ha sido estudiada hasta ahora la histopatología.

En el presente trabajo tratamos de iniciar los estudios histopatológicos de este grupo de virosis, describiendo el hallazgo de inclusiones intracelulares amorfas producidas por los virus *Carnation mosaic*, *Carnation vein-mottle* y otras de tipo cristalino producidas por un virus aislado en España y todavía no clasificado.

MATERIALES Y METODOS

Virus *Carnation mosaic* (mosaico del clavel), aislado en Madrid, en nuestro laboratorio, de plantas de clavel procedentes de tiendas de flores.

Un virus no identificado, de procedencia análoga al anterior, pero cuyas características difieren de los virus descritos infectando *D. caryophyllus*.

Los virus *Carnation vein-mottle* (moteado de las venas del clavel), y *Carnation mottle* (moteado del clavel), procedentes del "Laboratorium voor Bloembollenonderzoek", de Lisse (Holanda) *.

Los virus han sido conservados en el invernadero sobre plantas de *Dianthus caryophyllus*, *D. Barbatulus* y *Conphrena globosa* en los casos en que el virus ha sido transmisible a las tres especies.

Los métodos histológicos son los ya descritos por nosotros en trabajos anteriores (1950, 1956). En la mayoría de los casos, además de sobre la hoja, se han hecho las observaciones sobre tejido epitelial de la flor.

Las microfotografías han sido tomadas de preparaciones teñidas con floxina al 1 por 100 y montadas en agua, empleando una máquina "Leika" adaptada a un microscopio Zeiss con oculares 12×8 y objetivo de inmersión 160.

RESULTADOS

Virus Carnation mosaic.

Ha sido descrito por diferentes investigadores (Noordam, Thung y Van der Want; Ames y Thornberry), pero existe aun cierta confusión con respecto a si se trata de un virus solo o una mezcla de virus.

Nosotros hemos estudiado una virosis del clavel que presenta las características del virus *Carnation mosaic* y encontramos que presentaba dos tipos diferentes de inclusiones amorfas en la misma célula.

Se encuentran inclusiones amorfas o cuerpos X de dos tipos, granulares y ameboideos. Las inclusiones granulares son de un tamaño aproximadamente igual al del núcleo, ovoides con gránulos refringentes, poco compactas, no vacuoladas. Frecuentemente se encuentran pegados a ellas algunos plastidios fácilmente reconocibles por no teñirse con floxina, quedando de un color verde amarillento (fig. 1 B).

Las inclusiones ameboideas son más pequeñas que las granulares muy compactas, con los bordes perfectamente delimitados y una o varias vacuolas en su interior (fig. 1 A). Ambas inclusiones se tiñen de un rojo vivo con floxina, aunque las de tipo ameboideo, por ser más compactas, aparecen de un color más fuerte.

(*) Damos las gracias al Dr. van Slogteren, jefe de la Sección de Virus de dicho Laboratorio, por su amabilidad en facilitarnos estos virus.

Los dos tipos de inclusión se encuentran generalmente cerca del núcleo de la célula; las granulares muchas veces están casi rodeando el núcleo y las ameboideas junto a las granulares. En preparaciones hechas con epidermis de flor presentando la típica rotura del color (flores rojas, con manchas blancas alargadas muy numerosas y marcadas) es donde mejor se pueden observar las inclusiones.

Al ser extraídas de la célula según nuestros métodos citados, hemos observado que las inclusiones granulares tienden a disgregarse, mientras que las ameboideas se mantienen perfectamente íntegras (fig. 2).

Virus Carnation vein-mottle.

Las inclusiones producidas por este virus aparecen tanto en *Dianthus barbatus* como *D. caryophyllus*, aunque las hemos preferido estudiar en *D. barbatus* por verse con mayor claridad, a causa de que en *D. caryophyllus* existe una gran cantidad de sustancias ceras que recubren sus hojas y hacen necesario un tratamiento previo con disolventes de grasas para la observación, tratamiento que muchas veces produce distorsión y plasmolisis en las células.

Cuando las plantas tienen flores, entonces las observaciones se pueden hacer perfectamente en tiras de epidermis de la flor en *D. caryophyllus*.

Las inclusiones observadas (fig. 3) aparecen en casi todas las células epidérmicas de las hojas y flores desde los treinta días de la infección. Son cuerpos ovoides, encontrándose casi siempre cerca del núcleo y de un tamaño igual o un poco mayor que éste. Son refringentes, compactas, no son de tipo granular y al final en algunos aparecen vacuolas. Dan la reacción de Millon para proteínas y se tiñen bien con floxina y los colorantes usuales. Las inclusiones pueden ser extraídas fácilmente de las células sin disgregarse.

Virus del clavel no determinado.

En otro virus aislado del clavel, pero que no hemos podido llegar a clasificar por la muerte prematura de las plantas con él infectadas, encontramos inclusiones intracelulares de aspecto cristalino que se teñían muy bien con floxina y verde luz y daban la reacción de Millon.

Las inclusiones son de forma típica cristalina, formando placas romboidales muy refringentes y con bordes muy bien delimitados (fig. 4, 5 y 6), de diferentes tamaños, a veces mayores que el núcleo de la célula y generalmente encontrándose varias inclusiones a la vez en una misma célula. Los cristales en preparaciones sin teñir son transparentes e incoloros.

Los síntomas que presentaban las plantas de *D. caryophyllus* son muy similares a las del *Carnation mosaic*, o sea mosaico en las hojas y rompimiento del color en las flores. No hemos podido transmitir este virus a otras plantas por inoculación con la savia infectada.

Virus *Carnation mottle*.

De las hojas y flores de plantas infectadas con este virus hemos hecho preparaciones periódicas sin encontrar en sus células inclusiones de ningún género ni anomalías comparadas con células de plantas sin infectar.

DISCUSION

Las inclusiones intracelulares parecen ser una característica peculiar de las enfermedades producidas por virus, tanto en los virus de plantas como en aquellos que atacan al hombre y a los animales; sin embargo, de los numerosos virus de plantas que se conocen sólo se sabe que forman inclusiones alrededor de un 10 ó 12 por 100 de ellos. Esto, naturalmente, puede ser debido a dos causas principales: 1.^a, que no se ha estudiado la histopatología de todas las virosis conocidas, como hemos visto ahora en el caso de estas virosis del clavel, y 2.^a, en que algunos virus, se sabe positivamente, no producen inclusiones intracelulares en las células de sus huéspedes; el caso más conocido es el del virus *Cucumber mosaic* (mosaico del pepino) que ha sido perfectamente estudiado. A este grupo puede pertenecer el virus *Carnation mottle*. Creemos que un estudio histológico sistemático de las diferentes virosis nos haría ver que el número de virus que producen inclusiones es mucho mayor del que se cree hasta la fecha.

Respecto al hecho de que el virus *Carnation mosaic* produzca dos diferentes tipos de inclusiones en la misma célula, no es extraño, y buen

ejemplo de ello son las que hemos descrito en el virus *Brassica black ringspot* (1956) o las cristalinas y amorfas del Mosaico del tabaco; pero el hecho de que, en este caso, los dos tipos de inclusiones sean amorfos nos vienen a confirmar la posibilidad de que el virus *Carnation mosaic* sea en realidad una mezcla de virus diferentes que se multipliquen simultáneamente en las células de las plantas, formando cada virus su típica inclusión. Un caso parecido ha sido descrito por Koshimizu y Jizuka, en 1957, en virus de leguminosas; y otro caso es citado por Bawden, con los virus Mosaico del tabaco y *Severe etch* en infección simultánea.

RESUMEN

Se ha estudiado la histopatología de 4 virosis del clavel, encontrando que el virus *Carnation mosaic* produce dos tipos diferentes de inclusiones amorfas en las células de sus huéspedes, unas de tipo granular y otras de tipo ameboideo vacuoladas.

En plantas infectadas con el virus *Carnation vein-mottle* hemos podido observar la presencia de inclusiones ovoides, no granulares y vacuoladas. Sin embargo, en los estudios realizados en plantas infectadas con el virus *Carnation mottle* no hemos encontrado inclusiones intracelulares.

En una virosis del clavel que no hemos podido clasificar, se ha podido observar la presencia de inclusiones de aspecto cristalino.

Se discute la posibilidad de que el virus *Carnation mosaic* puede ser una mezcla de dos virus diferentes.

Hasta ahora no había sido descrita la producción de inclusiones intracelulares por ningún virus del clavel.

SUMMARY

The histopathology of *Carnation mosaic*, *Carnation vein-mottle* and *Carnation mottle* viruses, together with a virus not classified and isolated from *Carnation* plants in Spain has been studied. Two types of inclusion bodies, one granular and the other ameboid, have been observed associated with *Carnation mosaic* virus. *Carnation vein-mottle* virus also induces the formation of amorphous inclusion bodies in the cells of its

hosts. No inclusion bodies have been found in the plants infected with Carnation mottle virus. In a virus not yet identified, from Carnation plants crystalline-like inclusions have been found. The shape, size, location and staining properties of the inclusion bodies associated with the different carnation viruses are described.

The possibility of Carnation mosaic virus being a mixed infection is discussed in relation with the finding of two different types of inclusion bodies in the same cell in plants infected with the virus.

BIBLIOGRAFIA

- AMES, B. W. y THORNBERRY, H. H. 1952. Carnation mosaic virus; properties and electron microscopy. *Phytopath.* 42, 289-291.
- BAWDEN, F. C. 1950. Interference phenomena with plant and bacterial viruses. *Viruses* 1950. California Institute of Technology.
- KASSANIS, B. 1955. Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. Appl. Biol.* 43, 103-113.
- KOSHIMIZY, Y. y JIZUKA, N. 1957. Origins and formation of intracellular inclusions associated with two leguminous virus diseases. *Protoplasma*, XLVIII, 113.
- NOORDAN, D.; THUNG, T. H. y VAN DER WANT. 1951. Onderzoekingen over Anjermosaiek I. *Tijdschr. Pl-ziekten*, 57, 1-15.
- RUBIO HUERTOS, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares, producidas por virus, en las plantas. *Microbiol. Españ.* III, 3-4, 207-232.
- RUBIO HUERTOS, M. 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. *Phytopath.* 46, 10, 553-556.
- SMITH, K. M. 1957. A textbook of plant virus diseases. 2.^a Ed. Churchill C. d. London.

FIGURA 1.

Virus Carnation mosaic, los dos tipos de inclusiones en una misma célula: A, inclusión ameboidea, y B, inclusión granular. El núcleo de la célula está fuera de foco, debajo y un poco a la derecha de la inclusión B.



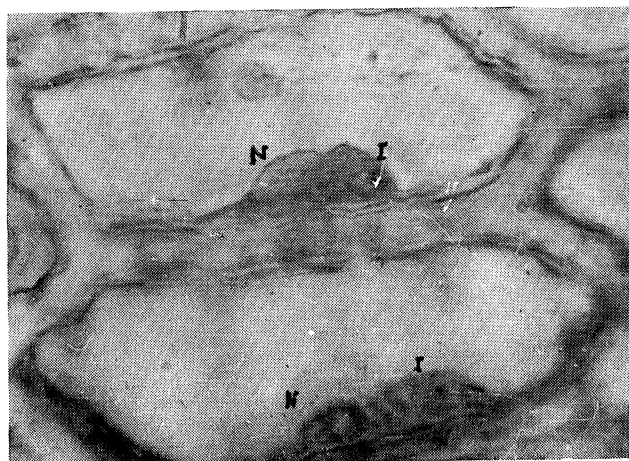
FIGURA 2.

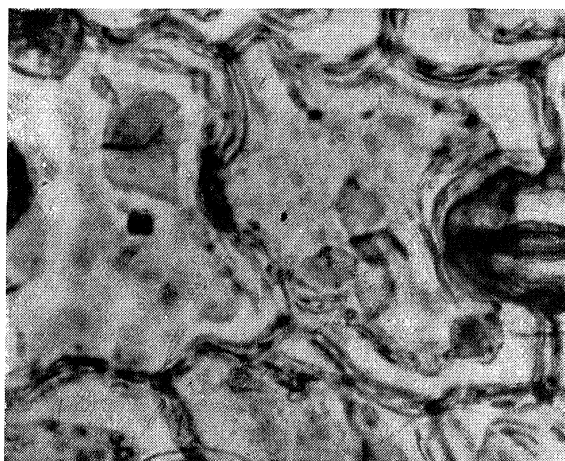
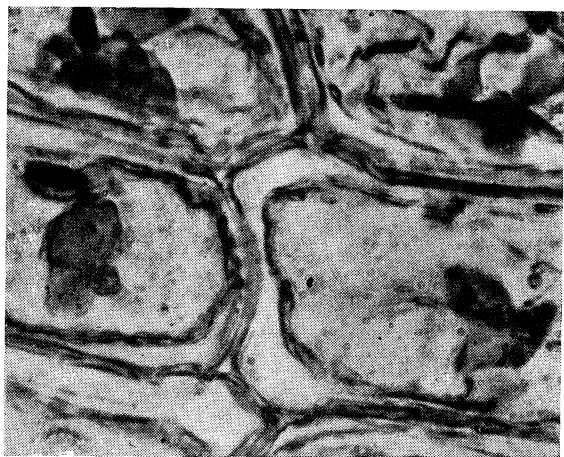
Virus Carnation mosaic. Una inclusión ameboidea extraída intacta de la célula, sobre agua destilada.



FIGURA 3.

Virus Carnation vein-mottle
N, núcleo; I, inclusión amorfa.





FIGURAS 4, 5 Y 6.

Virus del clavel no determinado: inclusiones de aspecto cristalino.

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

OBTENCION DE LAS FORMAS "L" DE *CL. TETANI* INDUCIDAS POR GLICOCOLA *

POR
C. GONZALEZ y MIGUEL RUBIO HUERTOS

Los primeros trabajos sobre la obtención de formas L en *Cl. tetani* se deben a Dienes (1), que consigue estas formas cultivando las bacterias en placas de agar con penicilina o sometiendo la forma normal a la acción de los productos metabólicos procedentes de los cultivos viejos en caldo.

Las formas L obtenidas por cualquiera de los dos procedimientos, presentan caracteres análogos y son semejantes a las conseguidas en otras bacterias aerobias Gram-positivas o Gram-negativas.

Según Dienes, las formas L de *Cl. tetani* no revierten a la forma normal, y de sus experimentos realizados sobre ratones, concluye que no son patógenas, lo cual hasta ahora parece ser la regla general en las formas L de bacterias patógenas investigadas, con la excepción de los resultados obtenidos por Tulasne y Lavillaureix (7,8) con *Vibrio* E-25, en los que vieron que sus formas L son altamente tóxicas para los ratones, por la producción de una endotoxina.

Con estos precedentes, nos propusimos obtener las formas L de *Cl. tetani* mediante la acción de soluciones de glicocola, de modo semejante a como ha sido utilizada por uno de nosotros en otros trabajos (2, 3, 4), y además, a ser posible, estudiar si las formas L obtenidas conservan o no su poder patógeno.

(*) Trabajo leído en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, en Madrid, el día 28 de noviembre de 1958.

Un resumen del mismo se ha presentado al Simposio sobre "Biología de los organismos del grupo de la pleuroneumonía", organizado por la Academia de Ciencias de Nueva York. Enero, 1959.

MATERIAL Y MEDIO DE CULTIVO

Empleamos el medio VF de Prévot, con glucosa al 2 por 1.000 y agar al 7,5 por 1.000, en tubos de Weinberg, a los que se añade, una vez fundidos y desaireados, aproximadamente 1,5 c. c. de una solución de glicocola al 10 % previamente estéril; de modo que la concentración final del aminoácido en el medio es, aproximadamente, de 3,5 %.

Las cepas utilizadas nos han sido proporcionadas por el Dr. Otegui y Dr. Prévot, de los Institutos IBYS, de Madrid, y Pasteur, de París, respectivamente, y han sido conservadas en el laboratorio dos años en tubo cerrado con medio V F.

Tinciones: Se han empleado las tinciones Gram, tinción de pared celular con ácido tánico y cristal violeta, y tinciones simples, principalmente con fucsina para las microfotografías.

Las microfotografías han sido realizadas con una máquina "Leika" adaptada a un microscopio Zeiss normal y de contraste de fases.

RESULTADOS

El ciclo L.—Sembramos los tubos según el procedimiento usual para bacterias anaerobias; incubados a 37° C. se desarrollan las primeras colonias a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas de incubación.

Colonias A.—Las primeras colonias que aparecen, colonias que llamaremos A, son microscópicamente semejantes a las normales: redondas, de aspecto algodonoso, de 1 a 2 mm. de diámetro, pudiendo alcanzar 3 en días sucesivos. Creemos corresponden a las colonias de tipo D de Condrea (5). Estas colonias están formadas preferentemente por filamentos largos y bacterias de tamaño normal, pero nunca se han visto formas esporuladas (fig. 1). Después de tres o cuatro días de incubación, aparecen formas mazudas, cuerpos hinchados en el extremo de la bacteria (fig. 2) y formas discoidales que corresponden a la fase "L grande" estudiada en otros microorganismos (fig. 3). Las formas "L grande", llenas de gránulos refringentes, desaparecen a medida que el cultivo envejece, siendo sustituidas en la colonia por formas granulares pequeñas. Al mes o mes y medio de la siembra se observa, a veces, en

la misma colonia y junto con los elementos granulares, formas esporuladas y de aspecto normal del *Cl. tetani*.

Resembrando estas formas L grandes y granulosas en medio de cultivo nuevo, sin glicocola, antes de que hayan aparecido las formas normales esporuladas o no, se regenera la bacteria primitiva.

Colonias B.—Después de quince o veinte días de incubación observamos la presencia de colonias lenticulares y lenticulares-compuestas de 1,5 a 2 mm. de diámetro; por su morfología microscópica parecen corresponder a las colonias L de Condrea, pero están constituidas por formas esféricas globosas de 2,5 a 4 micras de diámetro, aproximadamente, agrupadas en masas, en forma de racimos (fig. 5). Les llamamos colonias B.

Posteriormente hemos visto que estas colonias B pueden presentarse bajo un aspecto irregular, algodonosas, y estar integradas en un principio por una mezcla de estos elementos esféricos, reunidos en racimos y por formas L grandes.

Estas colonias pueden aislarse trasplantándolas a un nuevo tubo del mismo medio, en donde siguen creciendo, conservando la misma morfología y disposición. Al cuarto o quinto trasplante, hechos a intervalos de setenta y dos horas, pueden resemejarse en medio VF glucosado sin agar ni glicocola, en donde crecen conservando la misma morfología durante varios pases.

Estos elementos esféricos son fuertemente Gran-positivos, a diferencia del *Cl. tetani* en su forma normal, que, como es sabido, se decolora muy fácilmente.

Evolución de la colonia B.—Durante cinco meses conservamos en el laboratorio las colonias B en tubos cerrados de medio VG glucosado, VF glucosado con glicocola; VF agar y VF agar y glicocola.

Cuando las colonias B se resiembran frecuentemente en estos medios, evolucionan según dos líneas generales:

a) Si los medios en donde se cultivan tienen siempre glicocola, los elementos esféricos agrupados en racimos, con una disposición espacial, tienden a aumentar de tamaño (7, 9 u 11 micras) al mismo tiempo que se disponen en grupos planos cuyos elementos son menos simétricos: ovales, irregulares, etc., presentando algunos de ellos una envoltura viscosa a manera de un mucílago e incluso de una cápsula. En la colonia alternan con sus formas esféricas primitivas, dispuestas

aun en racimos, hasta que unas y otras se desintegran en elementos granulosos que, al ser resembrados en medio nuevo, pueden regenerar la forma normal.

b) Si las resiembras se hacen alternativamente en medio, con o sin glicocola, estas formas en racimo desarrollan filamentos gruesos que se presentan como prolongaciones de las masas globosas, que en nada se asemejan a las formas normales del tétanos. Hemos visto que estos filamentos son cadenas de bacilos cortos y gruesos, dispuestos unos a continuación de otros, de un diámetro transversal aproximado de 2 a 3 micras. (Figs. 8, 9 y 14.)

Si las resiembras son numerosas y se hacen a intervalos de veinticuatro horas, en la misma colonia, junto con estos filamentos, se ven las formas esféricas aisladas de los racimos, bacterias normales y algunas esporuladas.

Experimentos de patogeneidad.

Cobayos y ratones se han inoculado con diluciones del sobrenadante de un centrifugado de un cultivo de veinticuatro horas de la colonia B, sembrada en medio VF glucosado sin glicocola. A las dieciocho horas de inoculación los cobayos presentaron tétanos declarado y los ratones murieron antes de transcurrir este tiempo.

El sedimento del centrifugado del mismo cultivo, después de lavado varias veces hasta eliminar los restos de toxina, se suspendió en 10 cm.³ de solución salina y se inoculó a 6 ratones 0,1 cm.³ de la suspensión, por vía subcutánea. Veinticuatro horas después todos los animales murieron con los síntomas clásicos de tétanos, habiendo podido aislarse de tres de ellos las formas esféricas grandes, resembrando un trozo de tejido subcutáneo tomado del lugar en donde se hizo la inoculación (figs. 15-17). Las formas esféricas grandes crecieron en el primer tubo sembrado con el trozo de tejido subcutáneo mezcladas con los elementos esféricos más pequeños; en las resiembras sucesivas desaparecen estas formas grandes quedando exclusivamente los elementos esféricos pequeños agrupados en racimos. Así, pues, estas formas redondas de 2,5 a 3 micras de diámetro, parecen ser los elementos estables de la colonia que llamamos B.

En extensiones hechas frotando sobre el porta con un trozo del tejido subcutáneo, se han visto preferentemente las formas grandes, algunas

esféricas pequeñas, pero nunca la forma normal de *Cl. tetani* que tampoco creció en los tubos sembrados con el tejido subcutáneo (figs. 18, 19, 20 y 21).

DISCUSION

El tipo de colonia B que acabamos de describir con sus elementos esféricos dispuestos en racimos y con las que se han realizado las pruebas de patogeneidad, creemos no ha sido observada por nosotros ni como perteneciente al ciclo L de las bacterias Gram-positivas o Gram negativas hasta ahora estudiadas, ni tampoco en su crecimiento normal. Como sólo se presenta cuando la bacteria entra en el ciclo L inducida por la glicocola, parece lógico pensar que deba considerarse como una fase más, dentro de este ciclo. En apoyo de nuestra hipótesis tenemos el hecho de que otras bacterias anaerobias no esporuladas Gram-positivas y Gram negativas, cuyo ciclo L estudiamos actualmente y que serán objeto de próximas publicaciones, presentan también el mismo tipo de colonia.

Lavillaureix, en 1954 (6), trabajando con una cepa patógena de *Vibrio*, obtiene las formas L; de sus experimentos en los ratones concluye que dichas formas L, aisladas de los animales muertos, conservan las 3/4 partes del poder patógeno de la cepa normal.

Posteriormente, Tulasne y Lavillaureix (6, 7, 8), como hemos dicho antes, continuando estos trabajos con la misma cepa de *Vibrio* EZ5, demostraron el poder patógeno y tóxico de la forma L, inoculando a los ratones un cultivo muerto por el calor, así como la endotoxina extraída de las formas L, según el procedimiento de Boibin. En ambos casos los animales morían con síntomas análogos a los que presentaban cuando se inoculaban con la forma normal del *Vibrio* o su endotoxina, extraída de los cuerpos bacterianos por el mismo método de Boibin.

De nuestros experimentos con *Cl. tetani*, parece poder deducirse que la toxina elaborada por la colonia B tiene, por lo menos, el mismo poder patógeno que la cepa normal.

Actualmente estamos realizando un trabajo encaminado a obtener pruebas cuantitativas que puedan confirmar nuestra idea.

Así, pues, los trabajos realizados por los autores que acabamos de citar y nuestra propia experiencia demuestran que, al menos en algunos casos, las formas L de algunas bacterias patógenas son capaces no sólo

de causar la muerte de los animales de experiencia, sino de provocar en ellos una enfermedad con una evolución análoga a la que ocasionaría la inoculación de la misma bacteria en su forma normal, o sea, la producción de toxina no parece resentirse de las condiciones en que se encuentra la pared celular de las bacterias modificadas a través del ciclo L.

Agradecimiento. Agradecemos muy sinceramente a los Doctores Prévot, del Instituto Pasteur de París, y Otegui, del Instituto IBYS de Madrid, la amabilidad que han tenido al proporcionarnos las cepas de *Cl. tetani*, con las que hemos realizado nuestro trabajo.

RESUMEN

- 1) Se han obtenido las formas L en dos cepas de *Cl. tetani* inducidas por glicocola, a la concentración de 3,5 %.
- 2) Se estudia y describe la aparición y evolución de una forma nueva de *Cl. tetani*, dentro del ciclo L de dicho microorganismo.
- 3) Se aísla esta forma y se la estabiliza conservándola en los medios corrientes del laboratorio sin glicocola.
- 4) Demostramos experimentalmente que la forma L de *Cl. tetani* obtenida por nosotros es tóxica y patógena para los cobayos y ratones.

SUMMARY

Glycine induced L-forms of *Cl. tetani* from two toxigenic strains had been studied. We have shown that these L forms retained their toxicity and pathogenecity for the laboratory animals used (mice and guinea pigs).

BIBLIOGRAFIA

- (1) DIENES 1950. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 75, 412.
- (2) RUBIO HUERTOS. M. 1955. Public. del C. S. I. C.
- (3) RUBIO HUERTOS. M. 1957. Microbiol. Esp. 10, 361-386.
- (4) MORENO SAN MARTÍN y RUBIO HUERTOS. 1958. Microbiol. Esp. 11, 327-342.
- (5) CONDREA. 1931. C. R. Soc. Biol. 107, 188.
- (6) LAVILLAUREIX. 1954. C. R. Acad. Sc. 239, 1155.
- (7) TULASNE y LAVILLAUREIX. 1954. C. R. Soc. Biol. 148, 2080.
- (8) TULASNE y LAVILLAUREIX. 1955. C. R. Soc. Biol. 149, 180.

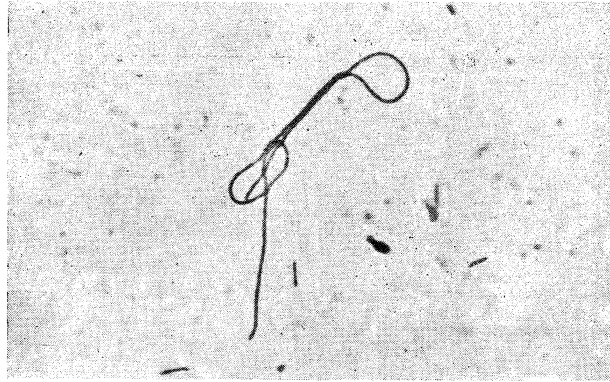
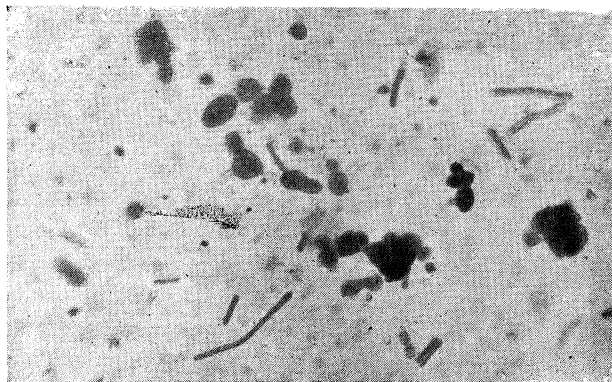


FIGURA 1.
Cl. tetani sometido a la acción de la glicocola. Cultivo de cuarenta y ocho horas.



FIGURAS 2 y 3.
El mismo cultivo después de cuatro días de incubación. Formas mazudas y L. grandes con algunas bacterias normales.

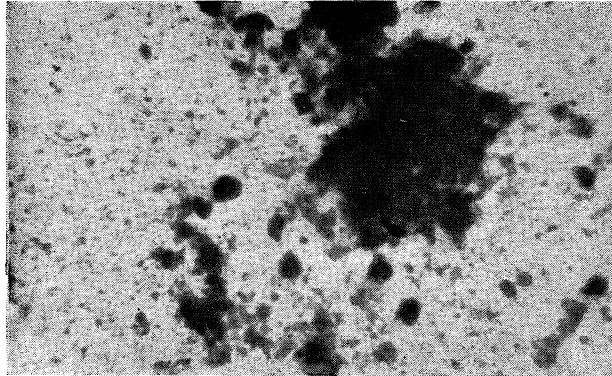


FIGURA 4.

Cultivo viejo del *Cl. tetani* con glicocola. Masas granulares y algunas formas L grandes.

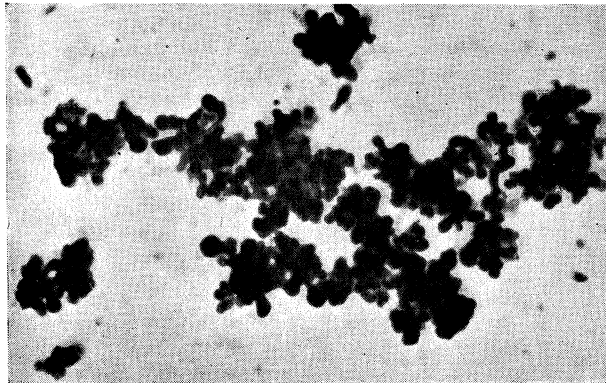
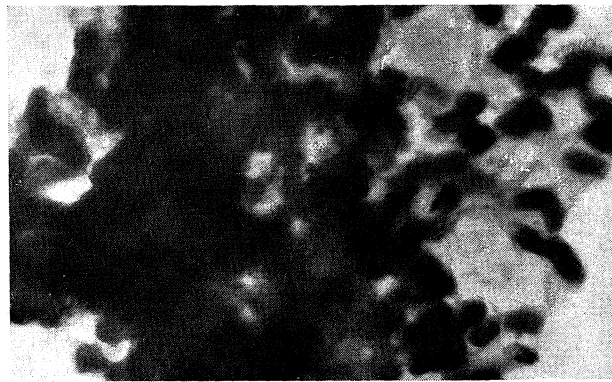
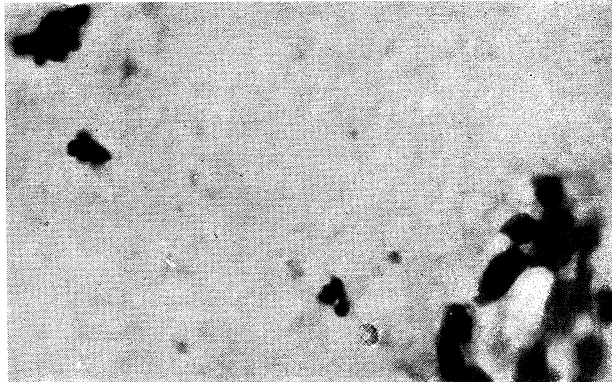


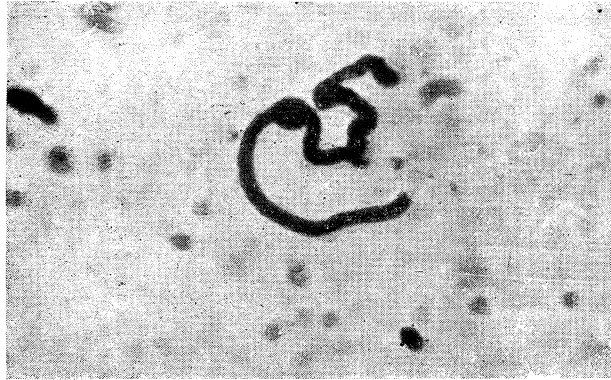
FIGURA 5.

Elementos esféricos de *Cl. tetani* agrupados en racimos que hemos llamado colonias B. Se han aislado de un cultivo en medio VF glucosado y agar.

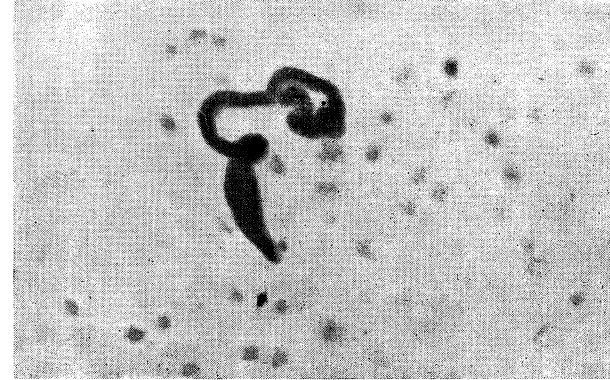


FIGURAS 6 y 7.

Evolución de las formas esféricas de la colonia B cuando se siguen cultivando en medios con glicocola. Racimos de formas esféricas junto con masas de elementos más grandes e irregulares.



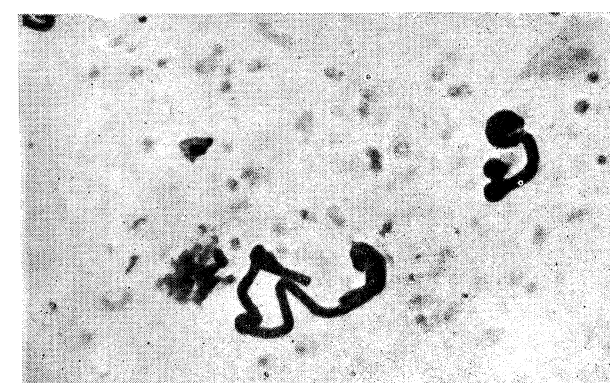
8



9



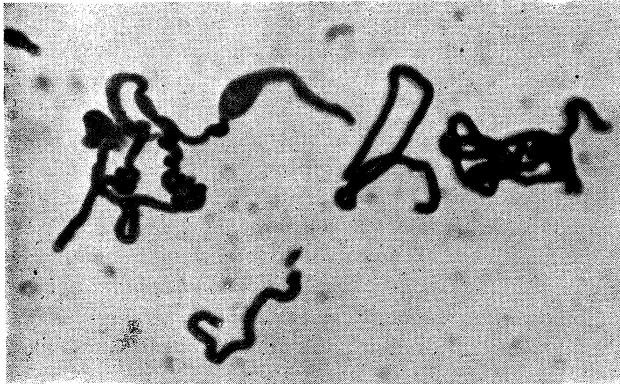
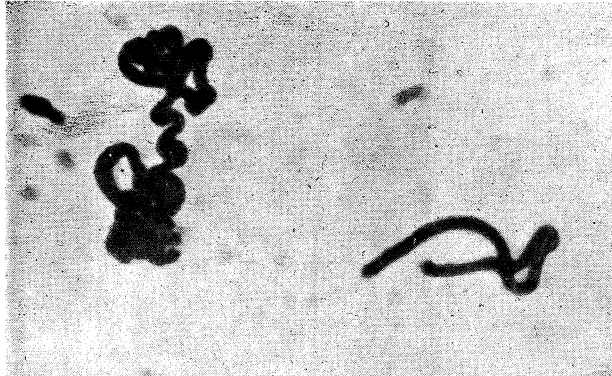
10



11

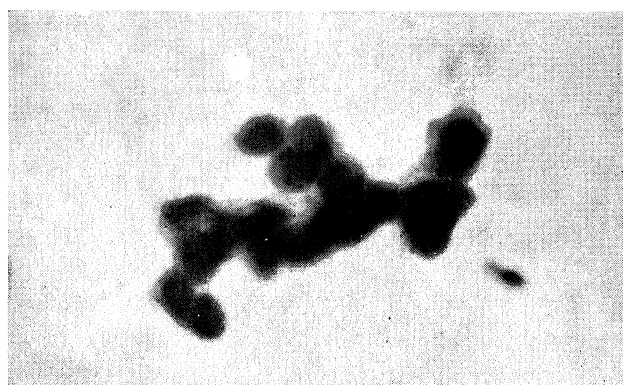
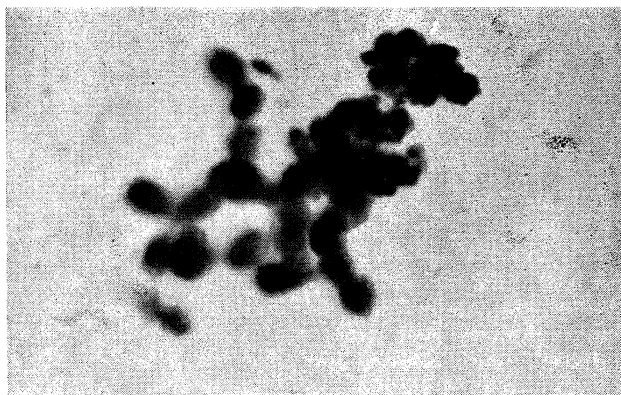
FIGURAS 8-II.

Evolución de las formas esféricas de *Cl. tetani* cuando se las cultiva alternativamente en medios con y sin glicocola.



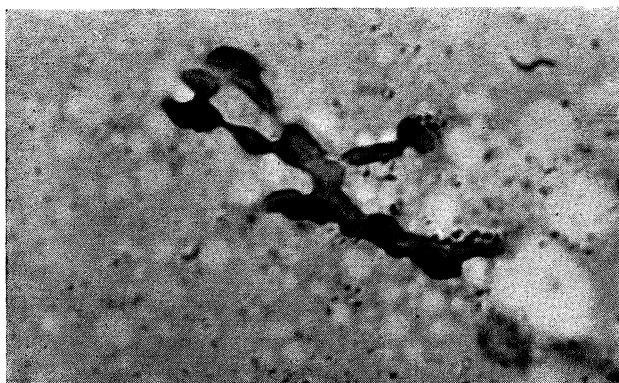
FIGURAS 12-14.

Evolución de las formas esféricas de *Cl. tetani* cuando se las cultiva alternativamente en medios con y sin glicocola.



FIGURAS 15-17.

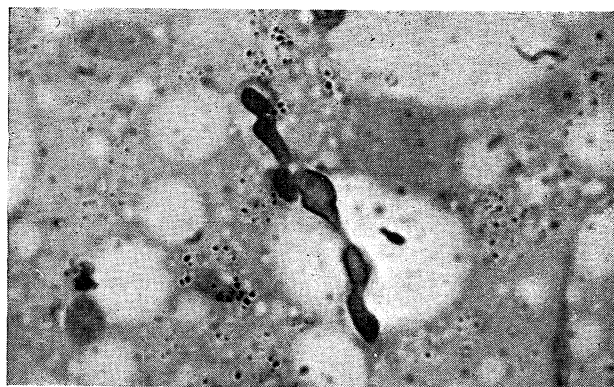
Formas esféricas aisladas del cultivo sembrado con el fragmento de tejido subcutáneo de los ratones inoculados con los elementos esféricos de la colonia B de *Cl. tetani*.



FIGURAS 18-19.

Frotis hechos a partir del tejido subcutáneo de los ratones muertos de tétanos, inoculados con las formas esféricas de la colonia B del *Cl. tetani*.

Tinción simple con fucsina fenicada.



FIGURAS 20-21.

Frotis hechos a partir del tejido subcutáneo de los ratones muertos de tétanos,
inoculados con las formas esféricas de la colonia B del *Cl. tetani*.
Tinción simple con fucsina fenicada.

AISLAMIENTO DE UNA CEPA POCO VIRULENTE DEL VIRUS DE LA ORNITOSIS

POR
A. P. GARCIA GANCEDO

La ornitosis es una enfermedad producida por un virus perteneciente al grupo de la psitacosis-linfogranuloma venéreo, que ataca a diferentes especies de aves, principalmente palomas, de forma inaparente casi siempre, pudiendo transmitirse al hombre de forma ocasional.

El parentesco entre ornitosis y psitacosis es tan estrecho que muchos autores las consideran una sola enfermedad. Pero, tanto clínica como experimentalmente, se encuentran diferencias suficientes para individualizarlas.

La ornitosis fue individualizada por Meyer (1) y sus colaboradores, Meyer Eddie y Yanamura (2), siendo ya posteriormente objeto de numerosos estudios por diversos investigadores.

Meyer propuso reservar el nombre de psitacosis a la forma aguda de la enfermedad transmitida por aves psitácideas y dar el de ornitosis a la enfermedad producida por virus en otras aves, que presenta síntomas más benignos que la anterior, aunque antigénicamente ambas son análogas.

La infección por este virus es poco o nada contagiosa de hombre a hombre, pudiendo producir síndromes pulmonares agudos del tipo de la neumonía atípica primitiva. Según Lépine (3), puede presentar tres tipos clínicos: tipo neumónico, tipo gripal y tipo tifoide.

Entre los pájaros, la ornitosis es una enfermedad muy común, que generalmente cursa sin síntomas y muy frecuentemente crónica, ya que se establece cierto equilibrio entre el organismo huésped y el virus. Equilibrio que puede alterarse por cualquier causa, dando lugar a una epizootia. Estas se han observado en pájaros silvestres, aunque se han estudiado comúnmente en aves domésticas.

Los animales suelen infectarse muy jóvenes, y parece ser que hay casos de infección congénita. Meyer, 1942 (4), demostró la existencia del virus en ovarios de animales enfermos; Davis (5) y Vogel, 1949, en pollos procedentes de huevos puestos por animales enfermos.

El virus se transmite principalmente en las heces desecadas procedentes de animales enfermos o portadores, y más difícilmente por finisimas gotitas procedentes del aparato respiratorio y, a veces, incluso por picaduras de los animales. Algún autor cita como probable la vía digestiva.

En las ciudades, el reservorio de este virus son casi exclusivamente las palomas, y ello da origen a epidemias de relativa importancia. En varias ciudades se han hecho estudios sobre las palomas ciudadanas, y siempre se ha encontrado una infección crónica en éstas. Labzoffsky (6) en Toronto, Davis y Ewing (7) en Baltimore, Lépine (8) en París Patignani (9) y Babudieri en Italia.

El citado virus se ha encontrado en las aves siguientes: petreles, gallinas, pavos, ánades, palomas, tórtolas, pinzones, gorriones, canarios. Y en los mamíferos: terneras, carneros, gatos, ratón de laboratorio, hamster y opossum.

Lépine (8) indica que del 1 de febrero de 1950 al 1 de junio de 1951, sobre 368 exámenes serológicos practicados en el Servicio de Virus del Instituto Pasteur de París, en sueros de enfermos presentando síndromes pulmonares agudos, se encontraron 23 casos positivos frente al antígeno ornitósico. Es decir, 6,25 % de los casos eran debidos a infección ornitósica.

El virus se encuentra, como hemos dicho ya, en las heces y en el bazo. Generalmente se le pone de manifiesto por inoculación intracerebral en ratón o en saco vitelino de embrión de pollo.

Tiene un tamaño determinado por filtración por Lazarus Eddie y Meyer (10), de 200 a 300 m μ de diámetro, siendo de forma esférica. Kurotchkin, Libby, Gagnon (11) y Cox, por microscopia electrónica, encuentran un diámetro de alrededor de 450 m μ . Es un virus de los de mayor tamaño, y su estructura es compleja. Comparte muchas características de las rickettsias.

El diagnóstico no puede hacerse sin el laboratorio, mediante el aislamiento del virus o por métodos serológicos. Entre estos últimos, River y Bery (12) demuestran que los anticuerpos neutralizantes aparecen en

muy poca cantidad, y a menudo no son detectables; por ello la reacción de neutralización no es utilizable. Sin embargo, los anticuerpos fijadores del complemento, según Bedson (13), aparecen en cantidad suficiente para realizar el diagnóstico mediante la reacción de fijación del complemento. Aun más sensible es la reacción de inhibición de la fijación del complemento.

Algunos investigadores: Bland y Canti (14), Burnet y Rountree (15), Yanamura y Meyer (16), determinan la existencia de un ciclo vital de desarrollo, que es como sigue:

Un corpúsculo elemental penetra en una célula sana desarrollando en ella un cuerpo de inclusión de mayor tamaño que el corpúsculo elemental. El cuerpo de inclusión se rodea de una cubierta, dentro de la cual aquél se multiplica por división. Primeramente los nuevos corpúsculos son del mismo tamaño que el original, pero proporcionalmente al aumento de su número su tamaño decrece, apareciendo los corpúsculos elementales genuinos. Mientras se ha realizado esta multiplicación, la envoltura ha crecido formando una vesícula que puede alcanzar el tamaño de $1\ \mu$ y contiene entonces numerosos corpúsculos elementales. A las 48 o 72 horas, la vesícula se rompe, liberando los corpúsculos elementales que pueden infectar otras células, repitiendo el ciclo.

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento del virus.—Se recogieron diez muestras de heces recientes, en un palomar situado en el casco urbano de Madrid.

Para la obtención y concentración del virus se utiliza el método de extracción por agua, ya que el método del éter es más eficaz pero destruye algunos tipos de virus, generalmente los del grupo psitacosis-ornitosis-linfogranuloma venéreo.

Se opera de la forma siguiente: se tritura cada muestra de heces por separado, en morteros, agregándose agua destilada estéril hasta obtener una suspensión 1/5, que sea lo más homogénea posible. Se centrifugan aproximadamente 10 cm.^3 de material de cada muestra, a 5.000 r. p. m. durante una hora. Se desecha el sedimento y al sobrenadante se le añade estreptomicina ($0,1\text{ g./cm.}^3$). No se pone penicilina porque los virus de este grupo son sensibles a ella. Se coloca en matraces y se deja

en incubación a 4° durante veinticuatro horas. De estos extractos líquidos se hacen siembras en aerobiosis y anaerobiosis en tubos de Hall, resultando estériles.

A partir de estos extractos se inoculan embriones de pollo de ocho días de incubación, en saco vitelino, según la técnica de Cox, con 0,25 cm.³ a cada uno.

Mueren los huevos inoculados con las muestras 1, 5, 6, 7 y 10. Se recogen las membranas vitelinas de éstos, asépticamente, y se hacen siembras para ver si hay infección bacteriana, cosa que ocurre con la muestra 7, que se desecha.

Al mismo tiempo, de cada vitelina previamente lavada con solución salina estéril, se hacen preparaciones por calco y se tiñen según los métodos de Machiavello, Giemsa tamponado a pH 7,2 y veinticuatro horas a 37°, Castañeda modificado por Lépine, y Wolff. (El empleo de la técnica de Wolff (20), que se usa para la tinción de rickettsias, nos ha sido sugerido para este virus por la Dra. Carmen Gil (21) por su gran rapidez y porque da excelente resultado para la tinción de las rickettsias productoras de la fiebre Q.)

Con la tinción de Machiavello muy pocas veces se han conseguido buenas preparaciones. Esto le ha sucedido también a Preben Moller Christensen (17), según indica en su magnífico trabajo "Ornithosis. A study of virus and antigen". Por ello, después de repetidos ensayos, decidimos dejar de utilizarla.

Resultaron positivas las preparaciones procedentes de las vitelinas números 5, 6 y 10. El resto, negativas.

Se hace un segundo pase en huevo con las vitelinas procedentes de 5, 6 y 10. Las vitelinas procedentes del 5 y 6 resultaron positivas y las del 10 negativas.

El resto de los huevos inoculados con las demás muestras sobreviven y se abren a los dieciocho días de incubación y tras diez días de la inoculación. Se hacen preparaciones, resultando todas negativas.

Continuamos haciendo pases con las cepas 5 y 6, en embriones de siete a ocho días. Siempre se desechan las vitelinas que presentan contaminación bacteriana, lo cual se determina mediante siembras y en las preparaciones. Las vitelinas se conservan en frascos estériles de tapón esmerilado, a la temperatura de -20°.

Con la cepa 5 hemos realizado 14 pases, y con la cepa 6, 17 pases.

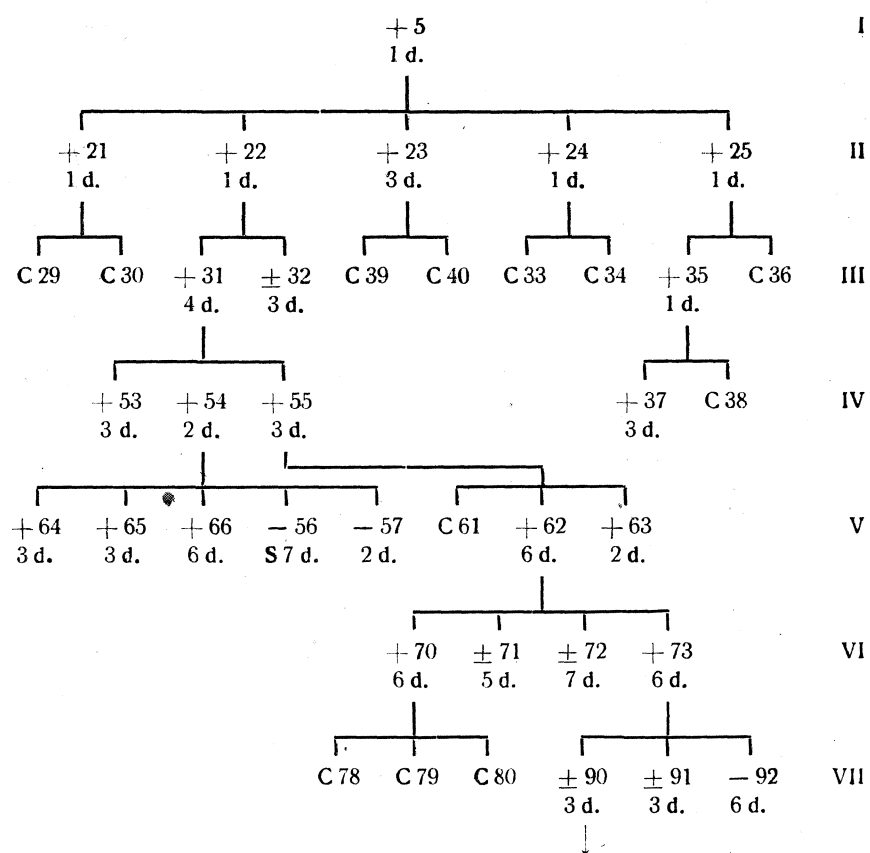
Véanse los esquemas 1 y 2. En ellos se indica la positividad de cada vitelina determinada mediante el estudio de las 3 preparaciones que se hacen para cada huevo.

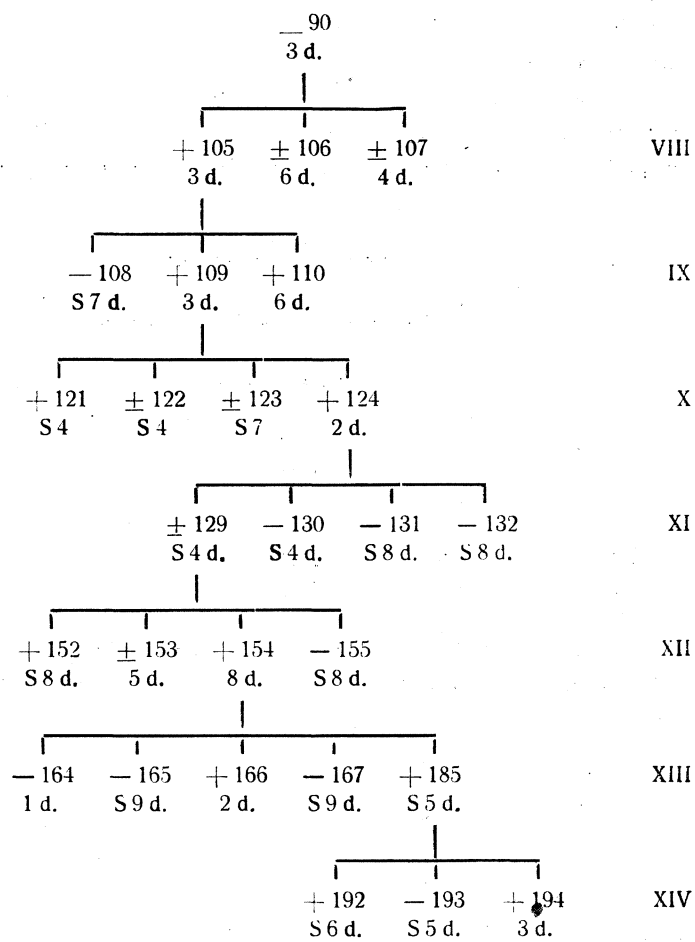
Con todo ello demostramos la existencia en las heces de dos palomas, de un virus el cual conseguimos aislar en saco vitelino de embrión de pollo, y lo mantenemos a lo largo de una serie de pases.

ESQUEMA NUM. 1

PASES EN EMBRIÓN DE POLLO.

CEPA núm. 5.

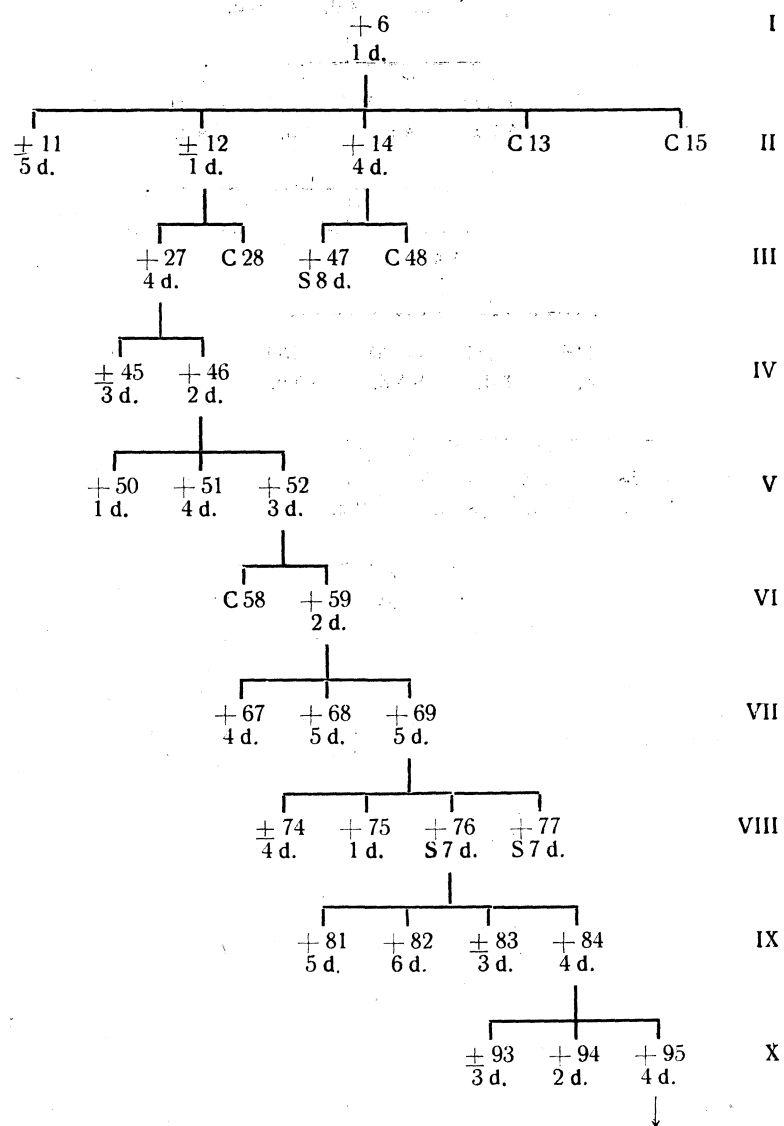


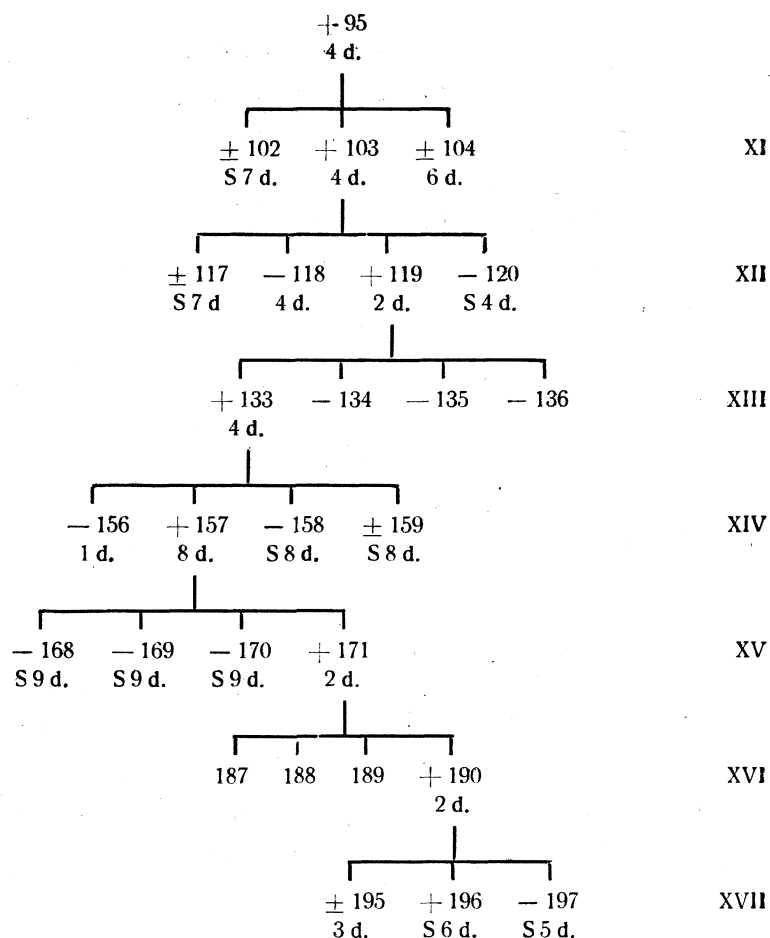


ESQUEMA NUM. 2

PASES EN EMBRIÓN DE POLLO.

CEPA núm. 6.





+ = positivo.

± = débilmente positivo.

- = negativo.

C = contaminado.

Las cifras colocadas a la derecha de los signos indicados representan el número de orden de cada huevo.

Los números colocados debajo de las anteriores cifras indican los días que tardan en morir los embriones tras la inoculación. Si les antecede la letra S, es que los embriones han sido sacrificados.

Los números romanos corresponden a los pases realizados.

Las membranas vitelinas 187, 188 y 189 se perdieron accidentalmente.

Inoculaciones a ratón.—Se inoculan grupos de 3 ratones con las vitelinas positivas siguientes:

Vitelina	25	cepa	5	pase	II	} Vía intracerebral 0,03 cm ³ 1/10
"	23	"	5	"	II	
"	37	"	5	"	IV	
"	14	"	6	"	II	
"	11	"	6	"	II	

Un ratón inoculado con vitelina 23, cepa 5, pase II, presenta parálisis posterior no muy acentuada a los cuatro días de inoculación, estado en que permanece dos días, pero se recupera. Se matan a los treinta y seis días de observación. A los siete días de la inoculación casi todos los ratones inoculados presentaban torpeza de movimiento, aunque se recuperan todos.

Se inoculan un grupo de cuatro ratones con 0,03 cm.³ de suspensión 1/20 de la vitelina positiva 46, por vía intracerebral. La vitelina es de la cepa 6, pase IV. Los ratones sobreviven y no presentan ningún síntoma.

Partiendo de la vitelina 69 de la cepa 6, pase VII, muy positiva. inoculamos a un grupo de cuatro ratones, por vía intracerebral, 0,03 cm.³, y a tres ratones, con la misma suspensión de triturado, de la misma vitelina, por vía intraperitoneal y en cantidad de 0,25 cm.³

A los seis días de la inoculación mueren 2 ratones del grupo de los inoculados intraperitonealmente. Se les hace autopsia, observándose en uno (R 1) bazo e hígado hipertrofiados y un pulmón hepatizado; el otro ratón (R 2) presenta los dos pulmones hepatizados.

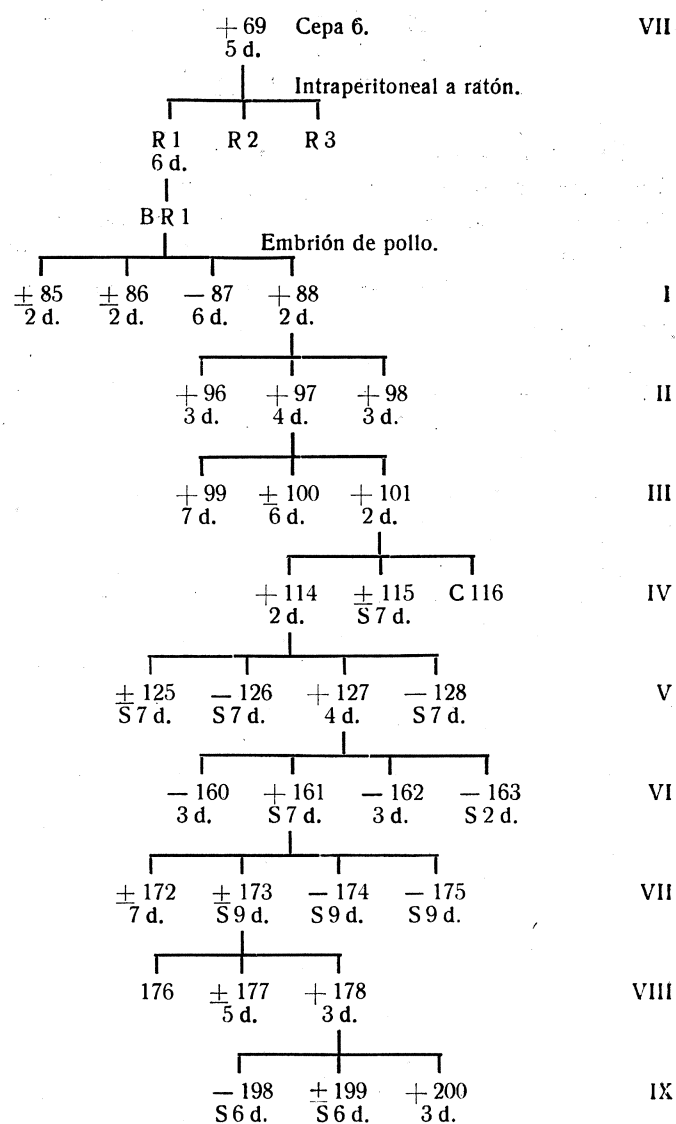
Se extraen de ambos ratones los cerebros, corazón, hígado, bazo y pulmones; se lavan repetidamente con solución salina estéril y se recogen en frascos estériles conservándose a —20°. El resto de los ratones sobreviven.

Se hacen las preparaciones de costumbre, por calco, con trozos de los órganos extraídos, resultando muy positivas las preparaciones de bazo y algo positivas las de pulmón e hígado del ratón (R 1); y medianamente positivas las del pulmón y bazo del otro ratón (R 2).

Con el bazo del ratón (R 1), que llamaremos (B R 1), hacemos un triturado e inoculamos huevos, obteniéndose vitelinas positivas con las que se hacen 9 pases en huevo. Véase esquema núm. 3.

ESQUEMA NUM. 3

PASES EN EMBRIÓN DE POLLO-RATÓN-EMBRIÓN DE POLLO.



Con la misma suspensión de bazo inoculamos a 4 ratones, por vía intracerebral, 0,03 cm.³, y a 4 ratones, por vía intraperitoneal, 0,25 cm.³. Los ratones sobreviven sin presentar ningún síntoma.

Con vitelina 97, pase II en huevo, procedente de bazo de ratón (B R 1), en suspensión al 1/10 se inoculan: 2 ratones por vía intracerebral, 0,03 cm.³; 3 ratones por vía intraperitoneal, 0,25 cm.³, y 3 por vía intravenosa. Al día siguiente muere uno de los ratones inoculados por vía intraperitoneal. Los demás ratones sobreviven sin presentar ningún síntoma.

Con vitelina 103, cepa 6, pase XI, se inoculan 5 ratones con 0,03 cm.³ intracerebralmente. Los ratones sobreviven sin presentar ningún síntoma.

Con esto conseguimos cultivar sobre ratón el virus en cuestión, pero obteniendo escasas muertes, lo que nos indica que las dos cepas aisladas son escasamente virulentas para dicho animal.

Algunas de sus características son muy semejantes a las que presentan unas cepas estudiadas por Babudieri (18) y Moscovici, procedentes de Módena y Veneto (Italia) y una de Castellón de la Plana (España) aislada de heces. Todas estas cepas presentan una característica común, que es la de ser escasamente virulentas para el ratón.

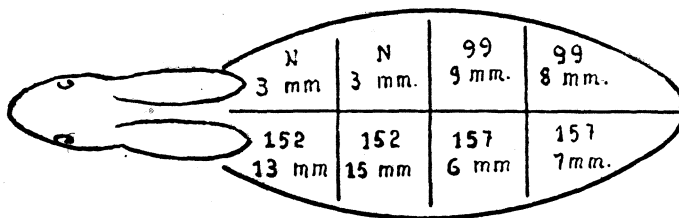
También se ha conseguido hacer un pase en ratón con material virulento procedente de huevo y recuperar el virus del ratón, haciendo nuevamente pases en huevo.

Inoculaciones en conejo.—Con el objeto de determinar si este virus ejerce alguna acción sobre la dermis de lomo de conejo que se manifieste por una reacción visible como respuesta a la inoculación intradérmica, se hacen los experimentos siguientes:

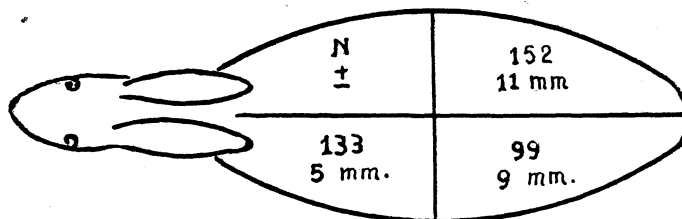
Se hacen punturas intradérmicas de 0,20 cm.³ cada una, en lomo afeitado de conejo, con las siguientes vitelinas trituradas y en suspensión al 1/10: vitelina sana normal (N) como control, vitelina 99 cepa E-R-E (*) pase III, vitelina 152, cepa 5, pase XII; vitelina 157, cepa 6,

(*) Embrión-ratón-embrión.

pase XIV. Dos punturas por vitelina. Se hace la lectura a los cinco días de la inoculación.



Se hacen punturas en otro conejo más joven que el anterior con las vitelinas N, 152, cepa 5, pase XII, y 133, cepa 6, pase XIII. Se hace la lectura a los cinco días de la inoculación.



Este experimento se ha realizado basándonos en lo que indica Topley (19) para este virus, de que en la piel afeitada de conejo o cobayo ocasiona una erupción papulosa local, semejante a la causada por el virus del herpes. Parece ser que esto también ocurre en este caso.

Pruebas serológicas.—Recibimos, amablemente enviados por el Doctor P. Lépine, Jefe del Servicio de Virus del Instituto Pasteur de París, antígeno de ornitosis, antígeno normal control de vitelina sana, y tres sueros positivos humanos.

Por nuestra parte, mediante la inoculación en cobayos jóvenes machos, de suspensiones de triturados de vitelina, obtenemos sueros para su ensayo con el objeto de determinar si contienen anticuerpos fijadores del complemento frente al antígeno ornitósico.

Con suspensiones al 1/10 de las vitelinas 152, cepa 5, pase XII; vitelina 99, cepa E-R-E, pase III, y vitelina 157, cepa 6, pase XIV, inoculamos dos cobayos por cada una, en la forma siguiente: 1.^a inyección

intraperitoneal de 0,25 cm.³ de la suspensión a cada cobayo; con las mismas suspensiones y a los siete días de la anterior, 2.^a inyección intraperitoneal de 0,50 cm.³ a cada cobayo; a los siete días de ésta, 3.^a inyección intraperitoneal de 1 cm.³ a cada cobayo. A los ocho días de esta 3.^a inyección se sangran por punción en corazón. Se deja una hora la sangre recogida, a la temperatura de laboratorio, en tubos independientes para cada cobayo, y después de despegar el coágulo se deja veinticuatro horas a 4°. Se centrifugan los sueros en centrífuga refrigerada a 4°, durante quince minutos, a 3.500 r. p. m. Después se conservan congelados a -20°.

Siguiendo la misma técnica se obtiene también suero antivitelina normal sana para usarlo como control de especificidad del antígeno.

Como suero negativo humano lo obtenemos procedente de nuestra propia sangre.

Todos ellos se conservan hasta el momento de su uso a -20°. Entonces se inactivan en baño maría a 56°, durante treinta minutos.

Se titula la hemolisina anticarnero, obtenida en nuestro laboratorio, diluyéndola de forma que en 0,20 cm.³ haya 2 unidades hemolíticas.

Asimismo, el complemento se titula, diluyendo después, de forma que haya dos unidades en 0,20 cm.³

Se emplean hematíes de carnero, lavados, y colocados en solución salina al 2 %.

Determinamos si existe poder anticomplementario en los antígenos según la técnica que se indica en el cuadro siguiente:

ANTIGENO		Solución salina	Complemento 2 unidades		Sistema hemolit. 2 unid. hemolit. 0,20 c. c hemat. 2 %		Resultados
Dilución	Cantidad						
1/1	0,20 c. c.	0,20 c. c.	0,20 c. c.	Baño María, 1 1/4 h., 37°	0,40 c. c.	Baño María, 1/2 h., 37°	0
1/2	"	"	"		"		0
1/4	"	"	"		"		0
1/8	"	"	"		"		0
1/16	"	"	"		"		0
1/32	"	"	"		"		0
1/1	"	0,40 c. c.	0		"		4

De los resultados se deduce que no tiene poder anticomplementario ni poder hemolítico, siendo semejantes los resultados tanto para el antígeno ornitósico como para el normal.

Con los sueros obtenidos e inactivados realizamos las pruebas de fijación de complemento, de las que describimos una, limitándonos en las demás a dar los resultados conseguidos. Todas las pruebas se hacen simultáneamente.

SUERO PROBLEMA 6. Antígeno ornitósico.

Suero problema		Complemento 2 unidades	Antígeno O. $\frac{1}{10}$		Sistema hemolit. 2 unid. hemolit. 0,20 c. c. hemat. 2 %		Resulta- dos
Dilución	Cantidad						
$\frac{1}{1}$	0,20 c. c.	0,20 c. c.	0,20 c. c.	B. María, $1\frac{1}{4}$ h. 37°	0,40 c. c.	B. María, $\frac{1}{2}$ h. 37°	4
$\frac{1}{2}$	»	»	»		»		3
$\frac{1}{4}$	»	»	»		»		2
$\frac{1}{8}$	»	»	»		»		0
$\frac{1}{16}$	»	»	»		»		0

SUERO PROBLEMA 6. Antígeno normal.

Suero problema		Complemento 2 unidades	Antígeno N $\frac{1}{10}$		Sistema hemolit. 2 unid. hemolit. 0,20 c. c. hemat. 2 %		Resulta- dos
Dilución	Cantidad						
$\frac{1}{1}$	0,20 c. c.	0,20 c. c.	0,20 c. c.	B. María, $1\frac{1}{4}$ h. 37°	0,40 c. c.	B. María, $\frac{1}{2}$ h. 37°	2
$\frac{1}{2}$	»	»	»		»		0
$\frac{1}{4}$	»	»	»		»		0
$\frac{1}{8}$	»	»	»		»		0
$\frac{1}{16}$	»	»	»		»		0

Para determinar si cada suero posee poder anticomplementario se hace por cada una la siguiente prueba:

SUERO PROBLEMA 6.

Suero problema		Complemento 2 unidades	Solución salina	Sistema hemolit. 2 unid. hemolit. 0,20 c. c. hemat 2 %	Sistema hemolit. 2 unid. hemolit. 0,20 c. c. hemat 2 %	Resulta- tados
Dilución	Cantidad					
$1/1$	0,20 c. c.	0,20 c. c.	0,20 c. c.	B. María, $1 \frac{1}{4}$ h., 37°	0,40 c. c.	2
$1/2$	"	"	"	"	"	0
$1/4$	"	"	"	"	"	0

Simplificando, en los siguientes cuadros nos limitaremos a dar en uno los resultados obtenidos para cada suero.

Los sueros los numeraremos así:

Suero 1. Suero antivitelina normal:

Suero 2. Suero vitelina 99 cepa E-R-E pase III cobayo 1

Suero 3. Suero vitelina 99 cepa E-R-E pase III cobayo 2

Suero 4. Suero vitelina 152 cepa 5 pase XII cobayo 1

Suero 5. Suero vitelina 152 cepa 5 pase XII cobayo 2

Suero 6. Suero vitelina 157 cepa 6 pase XIV cobayo 1

Suero 7. Suero vitelina 157 cepa 6 pase XIV cobayo 2

Suero 8. Suero humano negativo propio.

Suero 9. Suero humano positivo (Lépine).

SUERO 1.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis $1/10$	0	0	0	0	0
Antígeno normal $1/10$	4	4	4	4	4
Control suero	0	0	0	0	0

SUERO 2.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	2	$\pm$	0	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	2	0	0	0	0
Control suero	0	0	0	0	0

SUERO 3.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	3	1	0	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	4	1	0	0	0
Control suero	0	0	0	0	0

SUERO 4.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	4	3	1	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	2	1	0	0	0
Control suero	2	0	0	0	0

SUERO 5.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	3	2	2	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	2	$\pm$	0	0	0
Control suero	1	0	0	0	0

SUERO 6.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	4	3	2	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	2	0	0	0	0
Control suero	2	0	0	0	0

SUERO 7.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	4	2	$\pm$	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	2	0	0	0	0
Control suero	2	0	0	0	0

SUERO 8.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	1	0	0	0	0
Antígeno normal 1/10... ..	0	0	0	0	0
Control suero	0	0	0	0	0

SUERO 9.

Diluciones del suero	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Antígeno ornitosis 1/10	4	4	4	4	4
Antígeno normal 1/10... ..	$\pm$	0	0	0	0
Control suero	$\pm$	0	0	0	0

Como otro control de especificidad con los sueros 4 y 5 se hace un ensayo o reacción Wassermann, resultando negativos ambos sueros.

Suero 1. Suero antivitelina normal, es fuertemente positivo frente al antígeno normal.

Suero 2. Suero problema vit. 99, es negativo.

Suero 3. Suero problema vit. 99, es negativo.

Suero 4. Suero problema vit. 152, es débilmente positivo.

Suero 5. Suero problema vit. 152, es débilmente positivo.

Suero 6. Suero problema vit. 157, es débilmente positivo.

Suero 7. Suero problema vit. 157, es débilmente positivo.

Suero 8. Suero humano negativo, es negativo.

Suero 9. Suero humano positivo (Lépine), es positivo fuertemente.

Por otra parte, preparamos un antígeno con el virus que hemos aislado para ensayarlo frente a los sueros positivos recibidos del Dr. P. Lépine.

Lo preparamos de la forma siguiente:

Se inoculan 14 huevos de seis días de incubación en saco vitelino con 0,25 cm.³ de una suspensión 1/10, procedente de la mezcla de las vitelinas positivas 94 y 95, cepa 6, pase X. A los tres días mueren cuatro embriones y se sacrifica el resto. Se extraen las vitelinas, se lavan una a una en solución salina estéril. Se trituran asépticamente en Turmix y se hace una suspensión al 1/10 en solución salina fenicada 0,5 %. Se colocan en un frasco estéril con bolas de vidrio estériles. Se pone en estufa a 37°, durante veinte días, agitando el frasco varias veces al día. Después se somete durante treinta minutos a la acción de un baño María hirviendo, centrifugándose luego durante treinta minutos a 1.000 r. p. m. Se recoge el sobrenadante que se conserva en nevera a 4°.

Con este antígeno y un suero humano positivo realizamos el siguiente ensayo de fijación del complemento:

Suero positivo 1/10	Complemento 2 unidades	Antígeno problema			Sistema hemolit. 2 unid. hemolit. 0,20 c. c. hemat. 2 %		Resultados
		Dilución	Cantidad				
0,20 c. c.	0,20 c. c.	1/1	0,20 c. c.	B. María, 1 1/4 h. 37°	0,40 c. c.	B. María, 1 1/2 h. 37°	3
»	»	1/2	»		»		2
»	»	1/4	»		»		1
»	»	1/8	»		»		0
»	»	1/16	»		»		0

El resultado obtenido, como se ve, es también apenas positivo ±

CONCLUSIONES

Se aísla un virus de heces de palomas. Se realiza una serie de pases en embrión de pollo, matando el virus al embrión y obteniéndose preparaciones a partir de saco vitelino, en las que se observan abundantes formas de virus.

Se intenta obtener pases en ratón, inoculándose suspensiones procedentes de vitelinas infectadas, resistiendo corrientemente la infección dichos animales. En algún caso se observan síntomas y muerte, sin embargo, y se consigue recuperar el virus de ratón y proseguir los pases en embrión de pollo.

Se realizan pruebas de fijación del complemento con sueros obtenidos inyectando suspensiones de virus procedentes de membranas vitelinas infectadas a conejos machos. Estos sueros son débilmente positivos en parte.

Otras pruebas realizadas, unido a lo anterior, nos sirven de base para que creamos haber aislado un virus del tipo ornitosis, escasamente virulento para el ratón.

RESUMEN

Se aísla un virus de tipo ornitósico, débilmente patógeno para el ratón, de heces de palomas criadas en un palomar situado en el casco urbano de Madrid.

SUMMARY

A virus of the ornithotic type, slightly pathogenic for mice, has been isolated from leers of pigeons bred in a dove-cote situated within the urban perimeter of Madrid.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MEYER, K. F. 1941 Schweiz. Med. Wochenschr. 71 y 21, 1377.
- (2) MEYER, K. F. 1942 Edd. B. and Yanamura H. Y. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 49, 609.
- (3) LEPINE, P. 1950 Le sem. Hôp. París, 65.
- (4) MEYER, K. F. 1942 Medicine, 21, 175.
- (5) DAVIS, D. J. and VOGEL, J. E. 1949. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 70, 585.
- (6) LABZOFFSKY, M. A. 1947. Canad. Jour. Publ. Health, 38, 187.
- (7) DAVIS, D. J. and EWING, C. L. 1947. Pub. Health, Rep., 62.
- (8) LEPINE, P. et SAUTTER, V. 1951. Bull. Acad. Nat. Med. 19 et 20.
- (9) PATRIGNANI, F. y BABUDIERI, B. 1951. Il Polic. (Sez. P.) 58, 1281.
- (10) LAZARUS, A. S., EDDIE, B. and MEYER, K. F. 1937. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 36, 437.
- (11) KUROTCHKIN, T. J.; LIBBY, R. L.; GAGNON, E. and COX, H. R. 1947. J. Immunol. 55, 283.
- (12) RIVERS, T. M. and BERRY, G. P. 1931. J. exp. Med. 54, 105.
- (13) BEDSON, J. P. 1935. Lancet, 2, 1277.
- (14) BLAND, J. O. W. and CANTY, R. G. 1935. J. Path. and Bact. 40, 231.
- (15) BURNET, F. M. and ROUNTREE. 1935. J. Path. and Bact. 40, 471.
- (16) YANAMURA, H. Y. and MEYER, K. F. 1941. J. Infect. Dis. 68,1.
- (17) CHRISTENSEN, P. M. 1957. Acta Path. Microb. Scand. Supplementum 118.
- (18) BABUDIERI, B. y MOSCOVICI, C. 1955. R. C. Ist. sup. Sanità, 8, 446.
- (19) TOPLEY. Bacteriología e inmunidad. 1854.
- (20) WOLFF. 1950. Docum. Neerl. Indones. Morb. 50, 612.
- (21) GIL C. Cultivo de los simbioses de *Argas persicus*. En prensa.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL PATRONATO
«JUAN DE LA CIERVA»

RESISTENCIA A LOS ANTISEPTICOS DE LEVADURAS AISLADAS DE MOSTOS DE MANZANA DE GUIPUZCOA

POR
BALDOMERO IÑIGO y DAVID VAZQUEZ

En un trabajo realizado recientemente y pendiente de publicación (1), hemos aislado durante el curso de la fermentación de mostos de manzana de Guipúzcoa, 165 cepas de levaduras, pertenecientes a 10 especies blastomicéticas, y continuando nuestro trabajo, nos hemos propuesto estudiar la resistencia de cada una de las especies aisladas frente a distintas dosis de diversos antisépticos, determinando sus dosis letales y las que sin serlo en un largo período de tiempo inhiben la fermentación durante el mismo.

No creemos oportuno repetir la finalidad del trabajo ni enumerar las investigaciones realizadas sobre el tema, ya que tales noticias se refieren en nuestro estudio de la resistencia a los antisépticos de las levaduras aisladas de mostos de manzana de Asturias (2). Tampoco mencionaremos la técnica seguida, pues corresponde perfectamente a la puesta en práctica y descrita por nosotros en trabajos anteriores (2), (3), (4).

Los antisépticos que hemos empleado para este estudio son: ácido sórbico, nipagin, metabisulfito potásico, benzoato sódico y ácido salicílico.

Las especies blastomicéticas, cuya resistencia a los antisépticos se estudia en este trabajo, son:

1. *Saccharomyces ellipsoideus* (Hansen).
2. *Kloeckera apiculata* (Reess) Janke.
3. *Candida pulcherrima* (Lindner) Windish.
4. *Saccharomyces oviformis* (Osterwalder).

5. *Candida mycoderma* (Reess) Lodder y Kreger Van Rij.
6. *Sacharomycodes ludwigii* (Hansen).
7. *Saccharomyces mangini* (Guilliermond).
8. *Torulaspora rosei* (Guilliermond).
9. *Saccharomyces exiguus* (Hansen).
10. *Kloeckera magna* (De Rossi) Janke.

Las dos primeras especies se encontraron en los mostos de manzana de Guipúzcoa, con una frecuencia del 100 por 100, y por ello, dada la gran importancia que tienen en la fermentación, hemos estudiado tres cepas de cada una de ellas, al igual que de *Candida pulcherrima* y *Candida mycoderma*. Hemos procurado que las cepas empleadas en este trabajo sean las más diferentes por sus caracteres morfológicos o fisiológicos dentro de la especie a que pertenecen, y así hemos trabajado con dos cepas de *Candida pulcherrima* (1222 y 1224), que no producen pigmentos rojos en agar Malta, ni en gelatina mosto, y otra que enrojece los citados medios de cultivo (1225), y de las demás especies hemos considerado cepas que difieren ampliamente por sus poderes fermentativos y acideces volátiles.

RESULTADOS

En las cinco primeras tablas, se expresan los resultados obtenidos, anotándose la fermentación y viabilidad, con lo que podemos precisar la dosis letal de cada antiséptico para cada una de las especies estudiadas. Las dosis se expresan en miligramos por litro de mosto.

En la tabla seis, se resumen las dosis letales máximas y mínimas de cada antiséptico ensayado, anotándose también la especie blastomycética a la cual corresponden las citadas dosis.

Del examen detenido de los resultados expuestos en las tablas, podemos deducir los siguientes hechos:

1. Las especies más resistentes a los distintos antisépticos ensayados fueron las esporígenas, principalmente *Sacharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces mangini*, *Sacharomyces oviformis* y *Saccharomyces ellipsoideus*. Entre las no esporígenas, las más resistentes fueron: *Kloeckera magna* y *Candida mycoderma*.

2. Las especies más sensibles resultaron ser *Candida pulcherrima* y *Kloeckera apiculata*, siendo ambas no esporígenas.

TABLA I
RESISTENCIA AL ÁCIDO SÓRBICO

Cepa número (*)	ESPECIE	FERMENTACIÓN								VIABILIDAD							
		200	250	300	350	400	500	600	700	200	250	300	350	400	500	600	700
1.016	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
1.021	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
97	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
109	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
117	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
1.263	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.264	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
1.265	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.222	<i>Candida pulcherrima</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.224	<i>Candida pulcherrima</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.225	<i>Candida pulcherrima</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
473	<i>Saccharomyces oviformis</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
756	<i>Torulaspora roscii</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
1.184	<i>Kloeckera magna</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
975	<i>Sacch. odes Ludwigii</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
428	<i>Saccharomyces mangini</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—
654	<i>Saccharomyces exiguus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—

(*) Estos números corresponden a los que se dan en la colección de levaduras del D. F. I.

TABLA 2
RESISTENCIA AL NIPAGIN

Cepa número	E S P E C I E	F E R M E N T A C I Ó N										V I A B I L I D A D									
		800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200	2600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200	2600		
1.016	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—		
1.021	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—		
97	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
109	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
117	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
1.263	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—		
1.264	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—		
1.265	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—		
1.222	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—		
1.224	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—		
1.225	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—		
473	<i>Saccharomyces oviformis</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
756	<i>Torulaspora rosei</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—		
1.184	<i>Kloeckera magna</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—		
975	<i>Sacch. odes Ludwigii</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
428	<i>Saccharomyces mangini</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—		
654	<i>Saccharomyces exiguus</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—		

TABLA 3
RESISTENCIA AL METABISULFITO

Cepa número	ESPECIE	FERMENTACIÓN								VIABILIDAD							
		400	500	600	800	1000	1200	1400	1600	400	500	600	800	1000	1200	1400	1600
1.016	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
1.021	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
97	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
109	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
117	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.263	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.264	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.265	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.222	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.224	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1.225	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
473	<i>Saccharomyces oviformis</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
756	<i>Torulaspora rosei</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.184	<i>Kloeckera magna</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
975	<i>Sacch. odes Ludwigii</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—
428	<i>Saccharomyces mangini</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
654	<i>Saccharomyces exiguns</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—

TABLA 4
RESISTENCIA AL BENZOATO

Cepa número	ESPECIE	FERMENTACIÓN								VIABILIDAD							
		300	400	500	600	800	1000	1200	1400	300	400	500	600	800	1000	1200	1400
1.016	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1.021	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
97	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
109	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
117	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
1.263	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.264	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.265	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.222	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
1.224	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
1.225	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
473	<i>Saccharomyces oviformis</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
756	<i>Torulaspora rosei</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1.184	<i>Kloeckera magna</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
975	<i>Sacch. odes Ludwigii</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—
428	<i>Saccharomyces mangini</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
654	<i>Saccharomyces exiguus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—

TABLA 5
RESISTENCIA AL ÁCIDO SALICÍLICO

Cepa número	ESPECIE	FERMENTACIÓN								VIABILIDAD							
		300	400	500	600	800	1000	1200	1400	300	400	500	600	800	1000	1200	1400
1.016	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
1.021	<i>Kloeckera apiculata</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
97	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
109	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
117	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
1.263	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.264	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.265	<i>Candida mycoderma</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
1.222	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
1.224	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
1.225	<i>Candida pulcherrima</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
473	<i>Saccharomyces oviformis</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
756	<i>Torulaspora rosei</i> ...	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
1.184	<i>Kloeckera magna</i> ...	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
975	<i>Sacch. odes Ludwigii</i> ...	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
428	<i>Saccharomyces mangini</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
654	<i>Saccharomyces exiguus</i> ...	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—

TABLA 6
DOSIS LETALES MÁXIMAS Y MÍNIMAS

ANTISÉPTICO	DOSIS MÁXIMAS Y ESPECIES CORRESPONDIENTES		DOSIS MÍNIMAS Y ESPECIES CORRESPONDIENTES	
Acido sórbico	700 mg.	<i>Saccharomyces mangini</i> ...	200 mg.	<i>Candida pulcherrima</i>
Nipagin	2.600 mg.	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> <i>Saccharomyces oviformis</i>... <i>Saccharomycodes ludwigii</i>... <i>Saccharomyces mangini</i>	1.600 mg.	<i>Candida pulcherrima</i>
Metabisulfito potásico...	1.600 mg.	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ...	800 mg.	<i>Kloeckera apiculata</i>
Benzoato sódico	1.400 mg.	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ...	500 mg.	<i>Candida pulcherrima</i>
Acido salicílico..	1.400 mg.	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ...	800 mg.	<i>Kloeckera apiculata</i> <i>Candida pulcherrima</i>

3. De los cinco agentes químicos ensayados, el de mayor poder antiséptico resultó ser el ácido sórbico, ya que en dosis de 700 mg. por litro de mosto impidió la viabilidad de todas las levaduras estudiadas, por lo cual consideramos de gran interés su empleo en la conservación de mostos de manzana sin fermentar, teniendo en cuenta su inocuidad para el organismo humano.

4. No es recomendable el empleo de metabisulfito potásico como único agente de conservación de mostos, pues sus dosis letales resultaron ser altas para las especies esporígenas, pero en dosis de 300 miligramos inhibe la fermentación de los mostos sembrados con las distintas levaduras durante varios días, y, por tanto, puede resultar de gran interés aplicativo para mantener un mosto sin fermentar durante algún tiempo a fin de proceder a su defecación y trasvasado para la fermentación en pureza con levaduras seleccionadas (5).

5. No es recomendable el empleo de benzoato sódico y nipagin como únicos agentes de conservación de mostos de manzana sin fermentar, pues sus dosis letales para las levaduras presentes en dichos mostos son muy elevadas. Tampoco es conveniente el uso de ácido salicílico por el mismo motivo que el benzoato y el nipagin, y, además, por ser perjudicial para el organismo humano.

RESUMEN

En el presente trabajo, se estudia la resistencia a diversos agentes químicos de algunas cepas de levadura de las distintas especies aisladas en mostos de manzana de Guipúzcoa.

Los antisépticos ensayados fueron: ácido sórbico, nipagin, metabisulfito potásico, benzoato sódico y ácido salicílico. El más efectivo de ellos resultó ser el ácido sórbico, que en dosis de 700 mg. por litro de mosto fue letal para todas las levaduras estudiadas.

SUMMARY

In this paper we study the resistance to different chemical agents of some yeast stocks of different species isolated in apple musts from Guipúzcoa.

The antiseptics tried have been sorbic acid, nipagin, potassic meta-bi-sulphite, sodic benzoate and salicylic acid. Sorbic acid proved to be the most effective of them, which in a dosis of 700 mgs. per litre of must was lethal for all the yeast studied.

BIBLIOGRAFIA

- (1) IÑIGO, B., y VÁZQUEZ, D. Agentes de fermentación en mostos de manzana de Guipúzcoa. Revista de Ciencia Aplicada, núm. 70. 1959.
- (2) IÑIGO, B., y VÁZQUEZ, D. Resistencia a los antisépticos de las levaduras aisladas de mostos de manzana de Asturias. Revista de Ciencia Aplicada, número 68. 1959.
- (3) VÁZQUEZ, D. Agentes biológicos de fermentación en mostos de manzana. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central. 1959.
- (4) IÑIGO, B.; VÁZQUEZ, D., y ARROYO, V. *Schizosaccharomyces pombe*, Lindner, agente específico de una alteración observada en pulpa conservada de membrillo; su inhibición mediante el ácido sórbico. Revista de Ciencia Aplicada, número 65. 1958.
- (5) VÁZQUEZ, D.; MARECA, I., y GARRIDO, J. Elaboración de sidra. Ensayos de fermentación usando enzimas pectolíticos y sulfuroso. Revista de Ciencia Aplicada, número 63. 1958.

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

SENSIBILIDAD DEL *BACILLUS CEREUS* A ALGUNOS ANTIBIOTICOS

POR
G. TEJERINA DOMINGUEZ *

Desde el descubrimiento de la penicilina por Fleming, los antibióticos se han considerado como un instrumento de extraordinaria eficacia en la terapéutica de las enfermedades infecciosas. No obstante, su frecuente uso ha demostrado que algunas de las infecciones que en un principio fueron muy sensibles a su acción han llegado a ser incontrolables o controlables sólo a dosis elevadísimas, debido a la alta resistencia que el parásito ha ido adquiriendo con el tiempo. El carácter resistente se puede mantener durante un período indefinido, lo que hace que el agente antibacteriano pueda llegar a ser totalmente ineficaz. Observaciones de este tipo se deben a Bondi y Dietz (1945), Gots (1945), Harley, Baty y Boure (1947), Barber (1953), Spink (1954), etc., etc. El interés que entraña tal problema, por sus consecuencias dentro de la terapéutica práctica, justifica las infinitas pruebas que sobre él se vienen realizando mediante las dos técnicas esenciales de la experimentación biológica, *in vivo* e *in vitro*, aunque de ordinario dominan los métodos *in vitro* por las facilidades de su realización.

El problema en sí es tan complejo que son diversas las teorías desarrolladas para su interpretación. Señalaremos la que se basa en cambios de naturaleza genética, que supone la aparición de mutantes espontáneamente resistentes o bien inducidos por la presencia del antibiótico; así lo admiten Demerec (1948), Oakberg y Luria (1947), y otros, que señalan una razón de mutación baja, aproximadamente 1×10^8 .

Contrariamente a lo expuesto, Sevag y Rosanoff (1952) hacen notar

(*) Agradecemos a la Fundación "Juan March" la beca concedida para la realización de este trabajo.

que la resistencia ha de demostrarse por exposición del organismo al tóxico, lo que siempre envuelve la posibilidad de un mecanismo de adaptación. Esta idea ha sido mantenida por Eriksen (1953), Dean y Hinselwood (1955), etc.

Las experiencias de Lederberg y Tatum (1946) con *Escherichia coli*, apuntan como mecanismo de resistencia un proceso de fusión sexual.

Hay que admitir, en consecuencia, que el problema de resistencia exige el concurso de gran número de factores, lo que ha de contribuir notablemente a sostener la disparidad de ideas reinante. Por ello Schnitzer y Grumberg (1957) simplifican la cuestión destacando los dos factores fundamentales, que son: sensibilidad específica del organismo al agente nocivo y mecanismo de actividad de tal agente.

Punto en que parecen coinciden la mayoría de los investigadores es el que señala que algunas de las características de los organismos resistentes difieren de las que presentan los originarios sensibles, pudiendo afectar tales diferencias a procesos de tipo metabólico, enzimático, morfológico, nutritivo, etc. Existe, pues, alguna posibilidad de alcanzar datos interesantes acerca del problema de resistencia, por el estudio de algunos de estos cambios que aparecen en los organismos resistentes.

Geiger (1947) y Rosanoff y Sevag (1951) relacionan el mecanismo de resistencia a estreptomycin con el metabolismo proteico de *E. coli* y *M. pyogenes*, así como con la diferencia de tamaño de sus colonias. Gros y Macheboeuf (1948) y Bayliss, Glick y Selim (1948) fijan el efecto de la penicilina sobre el metabolismo glucídico en condiciones determinadas. Rosanoff y Sevag (1953) establecen diferencias enzimáticas y bioquímicas en organismos sensibles y resistentes a estreptomycin. Problemas de tipo análogo son expuestos por Eagle y Saz (1955), Simmonds y Fruton (1951), Truhaut, Lambin y Boyer (1951), etc.

En el presente trabajo efectuamos un estudio de las posibles modificaciones morfológicas y bioquímicas del *Bacillus cereus* sensible y resistente a distintas concentraciones de penicilina, aureomicina y estreptomycin, así como la mayor o menor tendencia de éste microorganismo hacia la resistencia, según las características de los métodos empleados.

MATERIAL Y METODOS

Se emplean los siguientes antibióticos:

Penicilina (sal potásica cristalizada) "Schenley Antibióticos", en envases de 200.000 unidades con una potencia de 1.560 unidades por mg. Estreptomina (sulfato) "Schenley Antibioticos", en envases de 1 g. Aureomicina (clorhidrato) "Lederle", en dosis de 25 mg.

De todos los antibióticos preparamos una solución madre que se conserva en nevera a 4 ° C. de la que se preparan todas las diluciones necesarias. Para penicilina y estreptomina se emplea agua como disolvente, mientras que la aureomicina se disuelve en una solución tampón de pH=4,4 cuya composición es: 27,8 c. c. de sol. 0,1 M de ácido cítrico, 22,2 c. c. de sol. 0,2 M de fosfato disódico y 50 c. c. de agua destilada. Esta solución la esterilizamos por filtración en filtros EKA.

La estirpe de *Bacillus cereus* pertenece a la colección del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, y el medio de cultivo usado es caldo común y agar-caldo a pH 7,2.

La exposición del *Bacillus cereus* a los antibióticos se realiza por dos métodos distintos: uno gradual con pases cada dieciséis horas y otros de exposición única con inóculo de 1×10^8 organismos/cm.³

En el primer caso seguimos la técnica de difusión horizontal señalada por Barber (1953). Se practica así: 25 c. c. de agar-caldo fundido se vierten en placa Petri, y una vez solidificado el medio se corta en él una zona, bien central o lateral, que se elimina de la placa, quedando esta parte libre para situar en ella el antibiótico a la concentración deseada. Este antibiótico se mezcla con agar-caldo fundido a 44-45° C., y así se vierte sobre los huecos de la placa, donde se solidifica. El hecho de que el antibiótico llegue a difundirse a través del medio normal hace que su acción, aunque atenuada, continúe en una parte de éste, lo que permite disponer de una escala de concentraciones capaz de revelar el grado de sensibilidad del microorganismo.

En una prueba de orientación observamos la sensibilidad del *Bacillus cereus* frente a los tres antibióticos indicados, y de acuerdo con ello fijamos la concentración conveniente para que inicie su resistencia a cada uno de ellos. Estas concentraciones fueron: 500 unidades de penicilina, 3 γ de estreptomina y 1 γ de aureomicina/cm.³ El

aumento de estos valores se hace de manera discreta en los primeros pases, para seguir con dosis más crecientes en las últimas etapas. Las concentraciones máximas a las que obtenemos formas resistentes son 50.000 unidades de penicilina, 200 mg. de estreptomina y 100 γ de aureomicina/cm.³ La incubación se hace a 37° C. durante dieciséis horas.

De acuerdo con los datos obtenidos por el método expuesto, fijamos las condiciones para practicar la técnica de exposición única del *B. cereus* a los mismos antibióticos. En lugar de recurrir a las placas Petri, que por sus dimensiones hacen reducido el número de ensayos simultáneos, empleamos otras placas de 15 $\times$ 30 cm., ya señaladas por Socías y Portolés (1956). Utilizamos en este caso agar-caldo como medio base para formar una capa de 2 mm. de espesor sobre la que, una vez solidificada, se tiende el medio sembrado, que está compuesto por caldo Liebig 1 g., bactotripton 2 g., agua destilada 100 cm.³ y agar 1,5 g., siendo su pH 7,2.

Las concentraciones de antibiótico se disponen en cilindros standard y corresponden a los valores extremos que hemos señalado en el método anterior, es decir, 500 y 50.000 unidades de penicilina, 0,003 y 200 mg. de estreptomina, y para aureomicina 1 y 100 γ /cm.³ El número de cilindros para las concentraciones altas es de 16, y 7 para las inferiores. El periodo de incubación en estas placas es de veinticuatro horas a 37° C. y en ellas se observa tanto la aparición de colonias dentro del halo de inhibición como la uniformidad en el diámetro y aspecto de todos los halos, ya correspondan a las mismas o distintas concentraciones.

Todas las formas que desarrollan resistencia a los antibióticos, se estudian en comparación con el bacilo sensible, sobre una serie de medios de cultivo que pueden experimentar determinadas transformaciones perfectamente revelables. Mediante estas pruebas se examinan propiedades tan características como utilización de urea, producción de ácido sulfhídrico, reducción de nitratos, acción sobre leche tornasolada, utilización de proteína, formación de indol, prueba del rojo de metilo, utilización de citrato, producción de acetil-metil-carbinol, fluidificación de gelatina y utilización de numerosos compuestos carbonados.

La observación de los cambios morfológicos se realiza directamente sobre las placas de cultivo, así como en tubos de agar inclinados según indica Rubio (1954). El examen microscópico se hace tanto en preparaciones teñidas como en fase.

RESULTADOS

La resistencia final que logramos presente el *Bacillus cereus* frente a penicilina, estreptomicina y aureomicina queda reflejada respectiva-

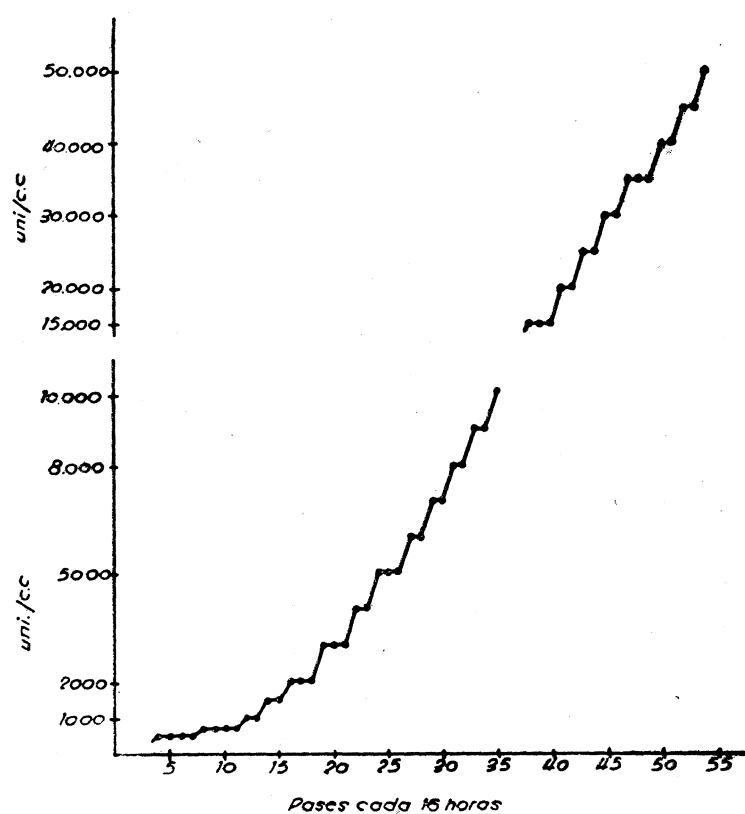


FIGURA 1
Resistencia a penicilina. *Bacillus cereus*.

mente en las figuras 1 - 3, que expresan a la vez las distintas fases, lentas o rápidas, según las cuales va evolucionando la aparición de las formas resistentes.

Estas formas de resistencia aparecen en las placas de cultivo con ligero retraso respecto a las normales sensibles que sirven de patrón

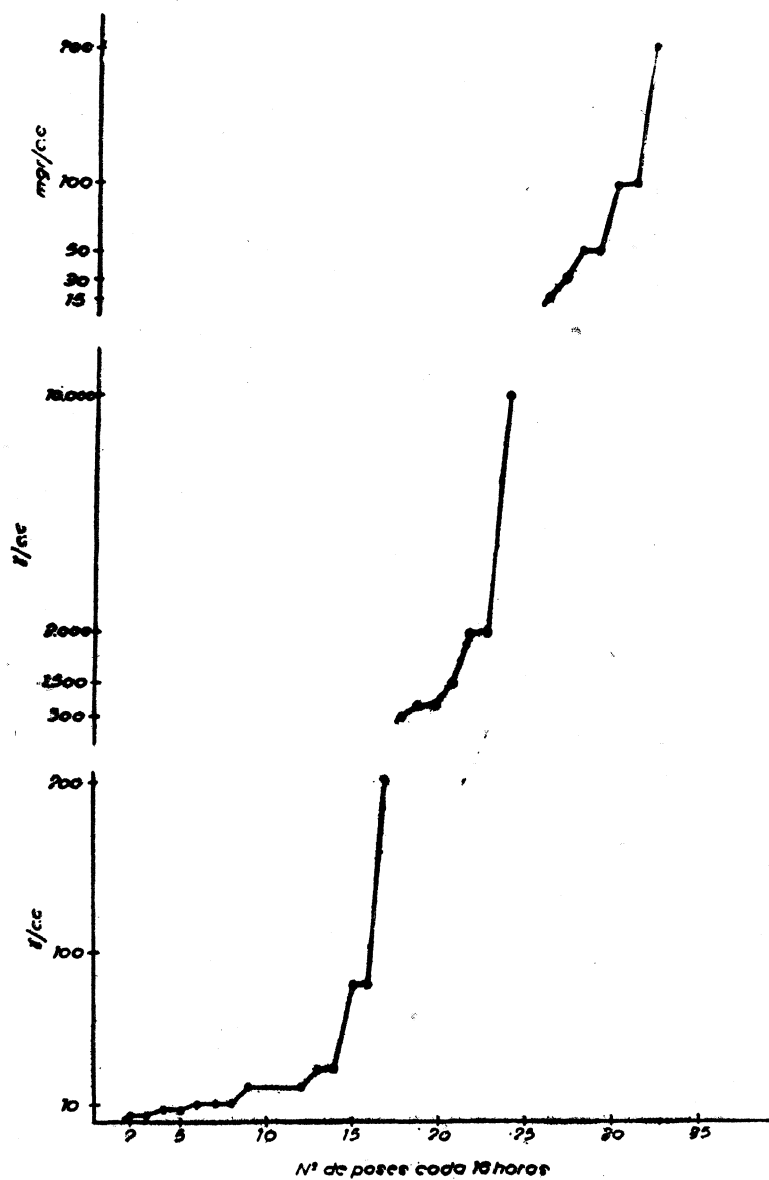


FIGURA 2

Resistencia a estreptomicina. *Bacillus cereus*.

(desarrolladas en medio normal, libre por lo tanto de antibióticos, en la misma placa), y el tamaño de sus colonias es así mismo menor, aunque prolongando el tiempo de cultivo van ensanchándose y tienden a semejarse a las normales.

Las figuras 4-6, corresponden a un cultivo de *B. cereus* que ma-

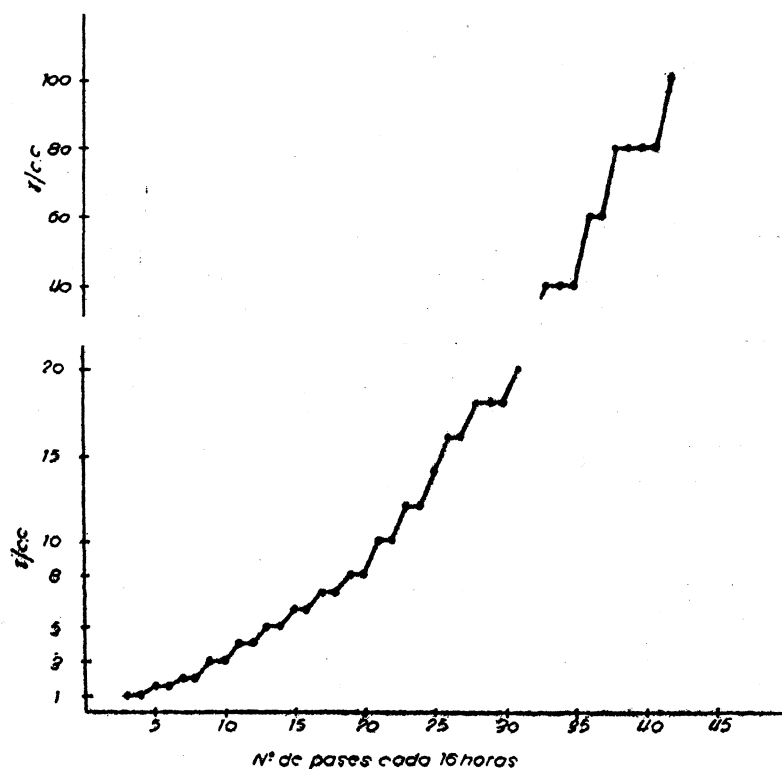


FIGURA 3
Resistencia a aureomicina. *Bacillus cereus*.

nifiesta sensibilidad a 1.000 unidades de penicilina, 0,5 mg. de estreptomomicina y 4 γ de aureomicina/cm.³ respectivmaente. En la figura 7 el *B. cereus* se desarrolla perfectamente en presencia de 0,2 mg. de estreptomomicina, si bien este desarrollo acusa las características que hemos indicado, en comparación a las zonas extremas donde no llega el antibiótico.

Mientras que la aparición de la resistencia a dosis paulatinamente crecientes de penicilina y aureomicina no ofrece ninguna irregularidad, cuando se trata, por el contrario, de estreptomina hemos podido observar que la dosis de 30 mg./cm.³, lejos de ejercer una acción inhibitoria, estimula el desarrollo del *B. cereus*, que acusa una ligera dependencia al antibiótico, como revela la figura 8, donde precisamente la zona menos vigorosa corresponde justamente a la del medio normal no alcanzada en su difusión por la estreptomina.

Cuando el método para observar la resistencia es de exposición única, son más favorables las concentraciones altas de antibiótico que las bajas, ya que en este último caso no hemos comprobado aparición de formas resistentes. También es cierto que cuando se trata de estreptomina, tampoco aparecen a valores tan elevados como 200 mg./cm.³. Por el contrario, las concentraciones de 50.000 unidades de penicilina y 100 γ aureomicina/cm.³ permiten la presencia, dentro del halo de inhibición, de numerosas colonias de *B. cereus* con carácter resistente, como puede apreciarse en las figuras 9 y 10 respectivamente.

Las modificaciones que en su morfología presenta por acción de los antibióticos penicilina, estreptomina y aureomicina podemos considerarlas idénticas, por repetirse en todos los casos y siempre que la concentración del antibiótico no llegue a su dosis bactericida. Aparecen formas extraordinariamente largas, así como otras muy cortas con tendencia a curvarse y mostrar un aspecto arriñonado (figs. 11 y 12). Simultáneamente se observa que el *B. cereus* presenta en su interior unos corpúsculos esféricos, que van aumentando en número y tamaño a medida que el bacilo donde aparecen se muestra cada vez más transparente, hasta transformarse en un espacio aparentemente vacío, limitado por su membrana (fig. 13). Esta membrana se rompe o más bien parece lisarse, quedando las pequeñas esferas libres en el medio, donde se mueven con extraordinaria rapidez, como si estuviesen dotadas de apéndices de movimiento.

Además de estas transformaciones puede observarse cómo otros bacilos aumentan notablemente de volumen y llegan a presentar formas absurdas y grotescas, muy hinchadas, que se desintegran y acaban por desaparecer (figura 14, como las anteriores tomadas en contraste de fase).

En cuanto al comportamiento sobre distintos sustratos, las formas de *B. cereus* resistentes en distintos grados a penicilina, estreptomina

y aureomicina, acusan en determinados casos algunas diferencias respecto al organismo sensible. Estas diferencias se presentan tanto sobre alguno de los medios de cultivo, que ya hemos indicado, como en la asimilación de algunos azúcares. El total de los carbohidratos probados ha sido: arabinosa, ramnosa, xilosa, glucosa, levulosa, galactosa, manosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, melibiosa, celobiosa, rafinosa, melicitosa, almidón, dextrina, glicerina, eritrita, adonita, manita, sorbita, dulcita, salicilina, esculina inosita, y α metilglucósido. Las diferencias observadas figuran en el cuadro 1.

CONSIDERACIONES

El problema de la relación existente entre bacteria y antibiótico se ha estudiado bajo distintas condiciones, ante la posibilidad de que lleguen a concurrir manifestaciones comunes en circunstancias distintas, lo que podría permitir vislumbrar algunas de las fases fundamentales y responsables a la vez de la resistencia.

El hecho de que una única población bacteriana, cuando se somete a la acción de un determinado antibiótico, se comporte de manera desigual, hace suponer que existe entre sus individuos una cierta heterogeneidad, constitucional o funcional, que explicaría el que parte de ellos se muestren resistentes, a la vez que otros son destruidos por el antibiótico. Por otra parte, la resistencia a concentraciones altas de antibiótico se desarrolla de manera gradual, sin que por ello pueda asignarse a este proceso un ritmo uniforme en ninguno de los casos estudiados.

Por lo que respecta a la naturaleza del antibiótico, podemos indicar que no es indiferente en el mecanismo de resistencia, ya que hemos podido observar en el caso concreto de la estreptomycinina una dependencia a determinada concentración (30 mg./cm.³), que no aparece para ninguna de las dosis probadas de los otros antibióticos, penicilina y aureomicina. En contraposición a este hecho, es también la estreptomycinina el único antibiótico, de los tres, que no proporciona formas de resistencia cuando se sigue el método de exposición única, a pesar de emplearlo en solución concentrada, que parece es más favorable para la manifestación de la resistencia por dicho método.

Tampoco coinciden las formas resistentes a los distintos antibióticos.

CUADRO núm. I.

Modificaciones en las propiedades bioquímicas del *B. cereus* resistente, en distintos grados, a penicilina, estreptomycinina y aureomicina.

	Resistencia	Indol.	V - P	Arabi- nosa	Xilosa	Galac- tosa	Manosa	Glice- rina	Escu- lina
Normal	—	—	+	—	—	—	—	+	+
unid. penicilina/cm. ³	500	+	+	—					+
	700	+	+	+					+
	1.000	—	—	—					+
	1.500	+	—	—					+
	3.000	—	+	—					+
	4.000	—	—	+					+
	5.000	—	—	—					+
	8.000	—	—	—					+
	10.000	+	—	—					—
	50.000	+	+	+					—
mg. estreptomycinina/cm. ⁵	0,003		+		—			+	
	0,02		+		—			—	
	0,5		—		—			—	
	1,5		+		—			—	
	3,0		—		+			—	
	10,0		+		—			+	
	30,0		+		—			—	
	50,0		—		+			—	
	100,0		+		—			—	
	200,0		+		—			—	
γ aureomicina/cm. ³	1,0			+		+	—		
	2,0			+		—	—		
	4,0			+		+	—		
	8,0			—		+	+		
	12,0			+		+	—		
	20,0			+		+	+		
	40,0			+		+	—		
	60,0			+		+	—		
	80,0			+		+	+		
	100,0			+		+	+		

en sus caracteres bioquímicos, que varían arbitrariamente para cada uno de ellos. La única característica común se refiere a los cambios morfológicos que experimenta el *B. cereus* en todos los casos y que si bien no podemos concederles, por el momento, una significación determinada, es posible que tomen parte en alguna fase interesante dentro del complejo mecanismo de resistencia.

RESUMEN

Hemos obtenido *in vitro* formas de *Bacillus cereus* resistentes a los antibióticos aureomicina, penicilina y estreptomicina por diversas técnicas, siendo de muy distinto valor el grado de resistencia conseguido por ellas.

Las colonias resistentes presentan características peculiares, tanto en su tamaño, inferior al normal, como en algunos de sus caracteres bioquímicos estudiados, si bien en este aspecto no mantienen con constancia su comportamiento.

Tan solo los ensayos efectuados frente a estreptomicina manifiestan una marcada dependencia del microorganismo a determinada dosis, dependencia que no hemos observado en ningún caso con los otros antibióticos.

La morfología normal del *Bacillus cereus* sufre notables cambios bajo la acción de los antibióticos probados, apareciendo en el interior de sus células una serie de formaciones anormales de dudosa interpretación.

La resistencia obtenida, tanto por exposición gradual como única, parece depender en gran parte de la naturaleza del antibiótico, que puede determinar características peculiares respecto a la mayor o menor facilidad para aparecer formas de resistencia, constancia de la misma, posibilidad de su aparición por un solo contacto, dependencia a determinadas concentraciones, etc., etc.; todo lo cual impide establecer con carácter general una justificación única a tan complicado proceso.

SUMMARY

Resistant strains of *Bacillus cereus* to various antibiotics (penicillin, aureomycin and estreptomycin) have been obtained using various techniques. For each case, the special characteristics of these resistant strains, including their frequency, their possibilities of appearance by a single contact, their dependence on the concentration used, etc., etc., were studied. The presence of abnormal shapes of *Bacillus cereus* cells were clearly shown under the effect of those antibiotics.

BIBLIOGRAFIA

- BARBER, M. 1953. J. Gen. Microbiol. 8, 111.
BARBER, M. 1953. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 234.
BAYLISS, M.; GLICK, D., et SELIM, A. 1948. J. Bact. 55, 307.
BONDI, A., and DIETZ, D. 1945. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 60, 55.
DEAN, A. C. R., and HINSHELWOOD, C. N. 1955. Proc. Roy. Soc. B. 144, 296.
DEMEREZ, M. 1948. J. Bact. 56, 63.
EACLE, H. and SAZ, A. K. 1955. Ann. Rev. Microbiol. 9, 173.
ERIKSEN, K. R. 1953. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 393.
GEIGER, W. B. 1947. Arch. Biochem. 15, 227.
GOTS, J. S. 1945. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 60, 165.
GROS, F. et MACHEBOEUF, M. 1948. Ann. Inst. Pasteur. 74, 368.
HARLEY, H. R. S.; BATY, J. A., and BOURE, J. H. 1946. Brit. Med. J. 639.
LEDERBERG, J., and TATUM, E. L. 1946. J. Biol. Chem. 165, 381.
OAKBERG, E. and LURIA, S. E. 1947. Genetics. 32, 249.
ROSANOFF, E. I., and SEVAG, M. G. 1951. Bact. Proc. 56, 5. 1st General Meeting Soc. Amer. Bact.
ROSANOFF, E. I., and SEVAG, M. G. 1953. Antibiotics and Chemotherapy. 3, 495.
RUBIO HUERTOS, M. 1954. Estudio del ciclo L y formas filtrables de las bacterias. C. S. I. C. Madrid.
SCHNITZER, R. J., and GRUNBERG, E. 1957. Drug resistance of microorganisms. Academic Press. Inc. New York.
SEVAG, M. G. and ROSANOFF, E. I. 1952. J. Bact. 63, 243.
SIMMONDS, S., and FRUTON, J. S. 1951. J. Biol. Med. 23, 407.
SOCIAS, A. y PORTOLÉS, A. 1956. Microbiol. Esp. 9, 353.
SPINK, W. W. 1954. Arch. Internal. Med. 94, 167.
TRUHAUT, R.; LAMBIN, S. and BOYER, M. 1951. Bull. Soc. Chem. Biol. 33, 387.

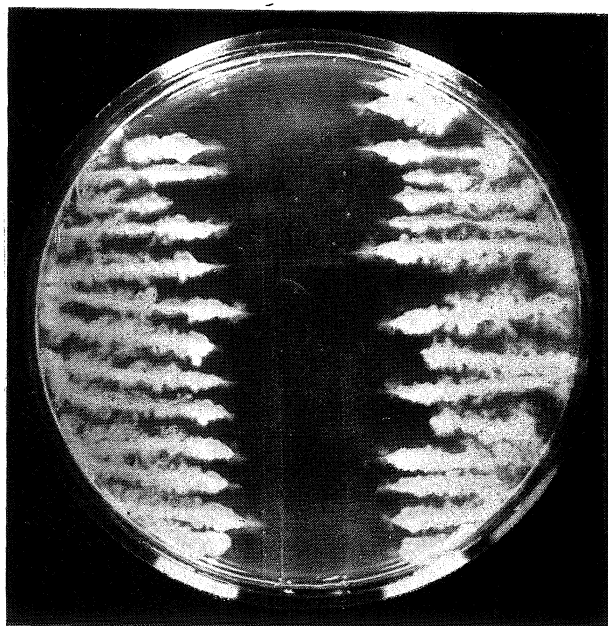


FIGURA 4.

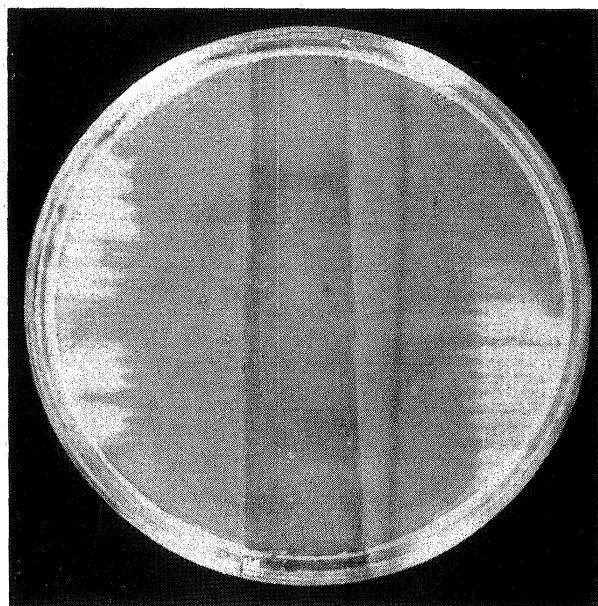


FIGURA 5.

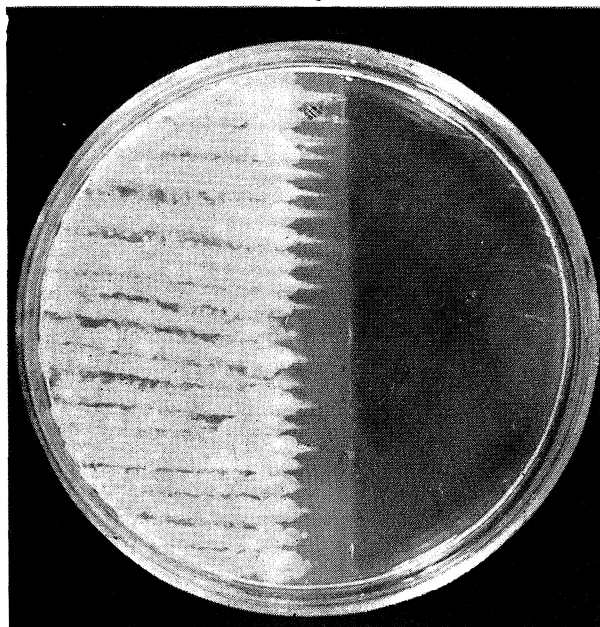


FIGURA 6.

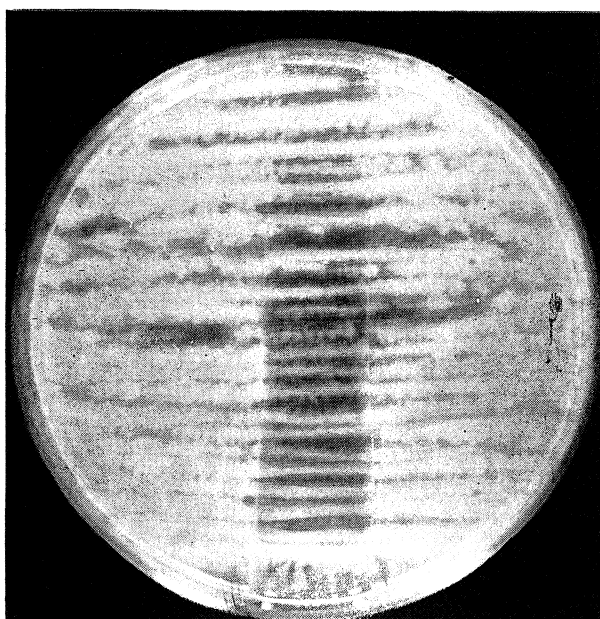


FIGURA 7.

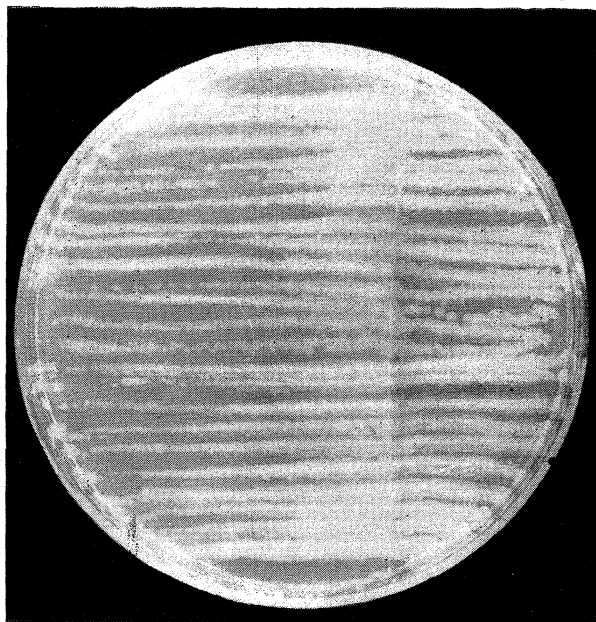


FIGURA 8.

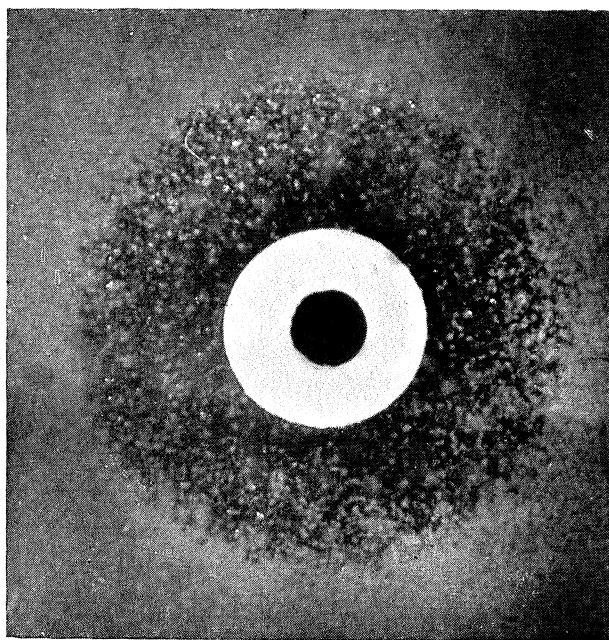


FIGURA 9.

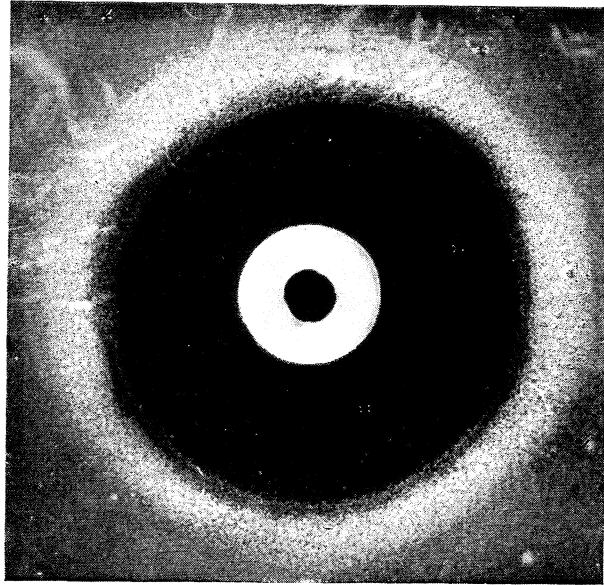


FIGURA 10.

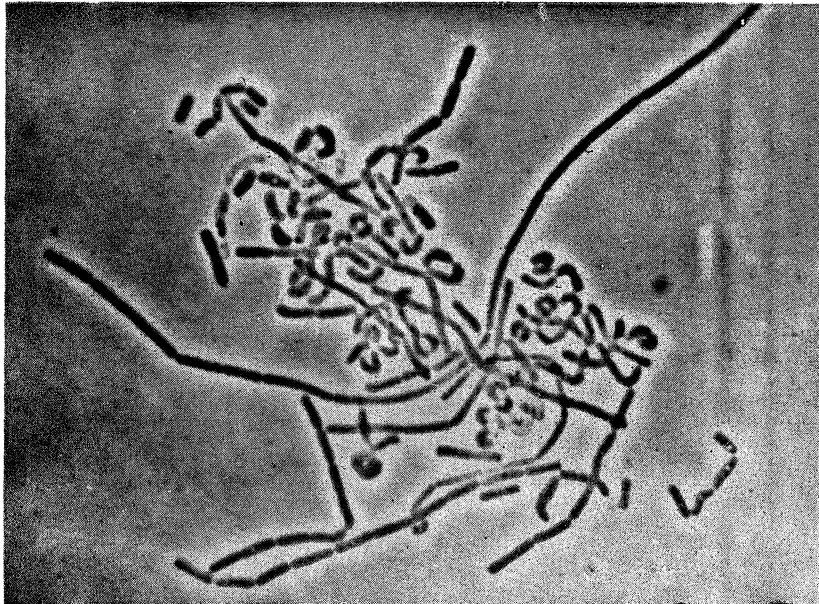


FIGURA 11.

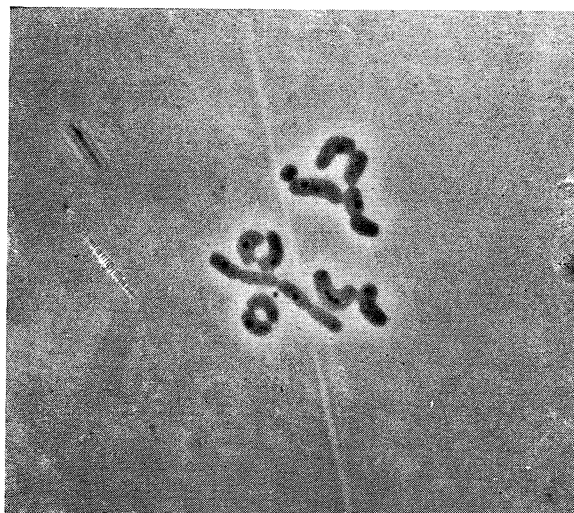


FIGURA 12.

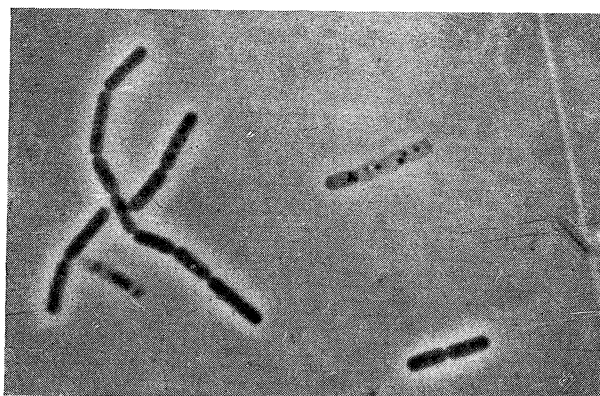


FIGURA 13.

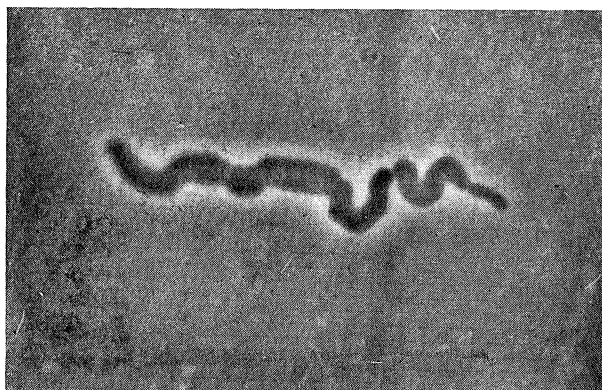


FIGURA 14.

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

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIVERSAS CEPAS DE VIRUS VACUNAL CULTIVADAS SOBRE CELULAS HELA

POR

CARMEN GIL, ANGEL P. GARCIA, M.^a LUISA ALONSO y EDUARDO GALLARDO

Desde hace muchos años se han realizado ensayos para cultivar el virus vacunal en tejidos y células mantenidas vivas fuera del animal del que proceden.

Siguiendo los métodos primitivos, ya en 1913 Steinhardt y colaboradores cultivan el virus vacunal en córnea de conejo sumergida en plasma. Después, Harde (1915) emplea tejidos testiculares de cobayo y conejo; Parker (1924) cultiva el virus en tejido testicular en gota pendiente; Carrel y Rivers (1927), en células de embrión de pollo en medio de Tyrode y plasma en frascos de Carrel; Haagen (1928) cultiva el virus durante ocho meses sobre tejido de bazo, testículo, pulmón y piel de conejo por el método de gota pendiente; Maitland y Maitland (1928), en riñón de pollo picado sumergido en un medio compuesto de suero y líquido de Tyrode; Maitland y Lamy (1930), en tejido de riñón de conejo y testículo del mismo animal, en frascos de Carrel; Li y Rivers (1930), en tejido de embrión de pollo; Rivers y Ward (1933), sobre tejido de embrión de pollo cultivado en líquido de Tyrode; Plotz y Martín (1936) preparan una vacuna siguiendo la técnica de Li y Rivers modificada, ensayándola en niños; Gallardo y Sanz (1937), dermovacuna en embrión de pollo, y Ramon y colaboradores (1936) cultivan virus procedente de testículo de conejo sobre fragmentos de piel de fetos procedentes de bóvidos.

Otros autores cultivan el virus vacunal sobre varios tipos de explantos tisulares.

Feller y colaboradores (1940) cultivan el virus de la dermovacuna adaptado a membrana corioalantoidea sobre explantos de embrión de pollo cultivados en tubos rotatorios; Wesslén (1953), el virus de la dermovacuna sobre explantos de pulmón de embrión bovino; Benedek y Kempe (1953), el virus vacunal sobre explantos de embrión de pollo y de embrión humano cultivados en tubos rotatorios, y según la técnica de Maximov, y Vieuchange y colaboradores (1957), la neurovacuna sobre explantos de riñón de conejo cultivados en tubos rotatorios.

Empleando las nuevas técnicas de cultivos celulares en capa monocelular, Noyes (1953) cultiva las cepas de virus siguientes: vacunal procedente de Lederle, linfa de ternera que se ha pasado 4 veces por testículo de conejo y 2 por membrana corioalantoidea, y neurovacuna de Levaditi pasada 23 veces por testículo y 2 veces por membrana corioalantoidea, todas ellas sobre células de embrión de pollo; Scherer y Syverton (1954) cultivan el virus vacunal adaptado a membrana corioalantoidea sobre células HeLa; Haff y Swim (1956), el virus vacunal cepa CVII de Rivers sobre cepas celulares derivadas de conejo y embrión de pollo; Lavillaureix (1957), el virus vacunal sobre las cepas celulares HeLa y K B; Ryden y Randall (1957), tres cepas del virus vacunal, WR neurotrópica para ratón, Rivers mantenida en membrana corioalantoidea, y Minnesota, todas ellas sobre células HeLa, las cepas WR, y Rivers sobre células LLCM₁ y la WR sobre células L; Warren y Cutchins (1957), el virus vacunal sobre células de riñón de ternera; Buthala y Mathews (1957), el virus vacunal sobre células de riñón de embrión de pollo; Cutchins y Warren (1958), la dermovacuna sobre células de pulmón, riñón y músculo embrionario bovino, HeLa y riñón de mono y conejo; Soloviev y Mastjukova (1958) cultivan el virus sobre células HeLa, J-96, SOT y Hep-2; Sureau y colaboradores (1958) cultivan el virus sobre células de riñón de conejo; Soloviev y Mastjukova (1959) lo cultivan sobre cultivos celulares de varios tejidos normales de animales de laboratorio y de hombre (embrionarios y adultos) y en células cancerosas tipo HeLa, Hep-2 y leucemia, y Sureau y Brygoo (1959) cultivan el virus vacunal sobre células procedentes de riñón de ternera.

MATERIAL Y TECNICAS

Cepas de virus.

Dermovacuna procedente de linfa de ternera filtrada por bujía Mandler de poro regular.

Neurovacuna adaptada a cerebro de conejo, pase 590.

Testivacuna, filtrado de linfa de ternera adaptada a testículo de conejo, pase 4.

Tipos de células.

Cepa HeLa (Gey) procedente de un carcinoma humano de cuello de útero.

Medio nutritivo.

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

Solución de Gey	70 %
Lactoalbúmina hidrolizada al 5 %	10 %
Suero humano	5 %
Suero de caballo	15 %

Al medio se le añade un 1 % de rojo fenol al 0,2 %, 100 unidades de penicilina y 100 microgramos de estreptomicina por cm.³ y bicarbonato sódico al 8,4 % en cantidad suficiente para ajustar el pH a 7,4.

Para la infección con virus se emplea el medio de mantenimiento:

Solución de Gey	85 %
Lactoalbúmina hidrolizada al 5 %	10 %
Suero de conejo	5 %

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 hacen en frascos Roux. En la cara que sirve de base se fijan y multiplican las células. Estos frascos sirven para disponer de un depósito 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 versene (versenato sódico) diluído al 1/20.000, manteniendo 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 hematómetro, y se distribuyen en nuevos frascos a razón de 3×10^6 células por frasco. Se añaden 40 cm.³ de medio nutritivo en cada uno de ellos y se mantienen en estufa en posición horizontal, a 37° C.

Titulación del virus.

Se hace en células HeLa, en membrana coriolantoidea y en conejo.

a) *Titulación en células HeLa.* Se sigue la técnica de formación de placas de Farnham (1958).

b) *Titulación en membrana coriolantoidea (MCA).* Se efectúa en la membrana coriolantoidea de embrión de pollo de doce días de incubación. La inoculación se hace siguiendo la técnica de Nadeje y colaboradores (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.

c) *Titulación en conejo.* Se hacen punturas intradérmicas de 0,2 cm.³ de diluciones decimales del virus, según la técnica de Groth (1929).

Sueros inmunes. Se obtienen inoculando conejos intradérmicamente con los virus de dermovacuna, neurovacuna y testivacuna, respectivamente, diluídos al 1 %, sangrados a los quince días de la inoculación y conservación en congelación.

PARTE EXPERIMENTAL

El virus vacunal se multiplica en las células HeLa (Seherer y Syverton, 1954; Lavillaureix, 1957; Ryden y Randall, 1957; Soloviev y Mastjukova, 1958, 1959), causando efectos citopatogénicos con destrucción del cultivo. En el presente trabajo se ha estudiado el desarrollo de diferentes cepas de vacuna: una, de origen dérmico (dermovacuna), después de filtrarla por bujía Mandler, de poro regular, para librarla de elementos bacterianos; otra, adaptada por pases sucesivos a cerebro de conejo (neurovacuna), y finalmente, una, testivacuna, adaptada a testículo de conejo.

El estudio de cada una de estas cepas se ha hecho por separado, comparando los resultados obtenidos con las tres para ver la que mejor se adapta al crecimiento en células con máximo rendimiento en la producción de virus utilizable en futuras investigaciones.

DERMOVACUNA

Se titula el filtrado vacunal en células HeLa, membrana corioalantoidea (MCA), de embrión de pollo y por punturas en piel de conejo.

Este último fue el que dio reacción con una dilución de virus más elevada. Las células HeLa se han comprobado como las más resistentes, pues la misma cantidad de virus da un título inferior en 2 unidades logarítmicas ($1,2 \times 10^3$), al que da en la MCA ($5,2 \times 10^5$).

Curva de crecimiento de dermovacuna en células HeLa.

Se siembran 45 tubos con $2,0 \times 10^5$ células por tubo. A los tres o cuatro días las células forman una capa continua, se lavan 3 veces con solución salina tamponada PBS (Dulbecco y Vogt, 1954) y se infectan con 0,1 cm.³ de dermovacuna, de título $5,2 \times 10^5$ para la membrana corioalantoidea. Se dejan dos horas de adsorción a 37° C., al cabo de las cuales se vuelven a lavar 3 veces con PBS, y se añade 0,5 cm.³ de suero inmune por tubo, que se deja actuar media hora en estufa a 37° C. Al cabo de este tiempo se lava nuevamente 3 veces con PBS, después

de descartar el suero inmune y se añade a 1 cm.³ de medio de mantenimiento por tubo.

Se hacen tomas a diferentes horas después de la inoculación: 2, 6, 10, 15, 18, 22 y 26 horas.

En cada toma se recoge el medio de 5 tubos, que se mezcla y se

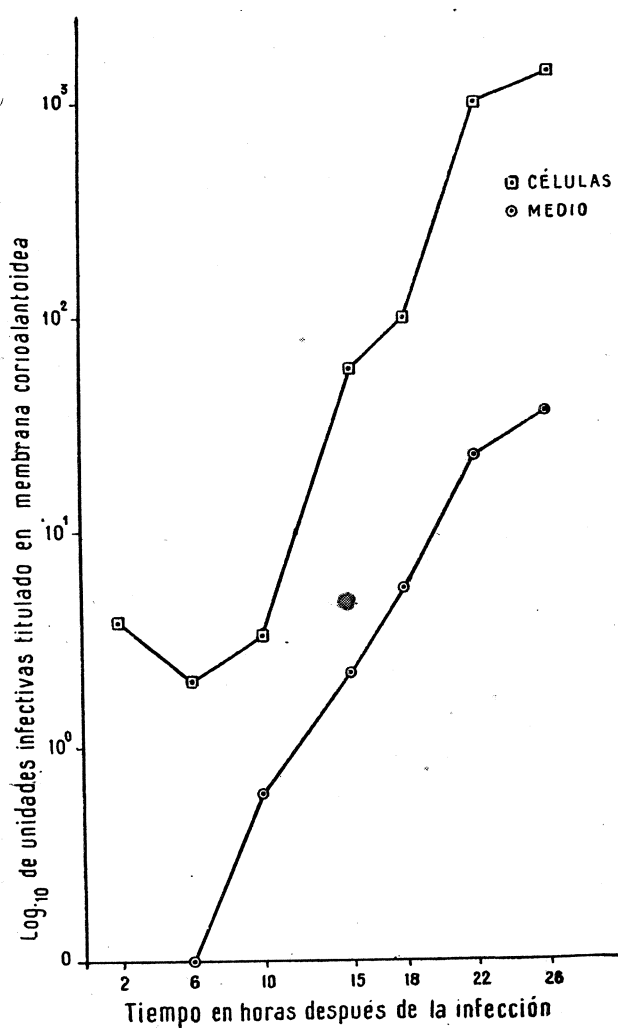


FIGURA I
Crecimiento del virus vacunal en células HeLa.

guarda a 4° C. para su titulación; a las células se les añade 0,25 cm.³, por tubo, de versene diluido al 1/4.000 y se reúnen igualmente para la titulación del virus en el interior de las células, lo que se hace después de congelar y descongelar por 10 pases sucesivos de nieve carbónica al baño maría, a 37° C., y se titula en membrana corialantoidea.

Los resultados se indican en la figura 1.

Como puede verse, la máxima cantidad de virus se encuentra en el interior de las células; hasta las diez horas no empieza a liberarse virus al medio, aumentando progresivamente hasta las veintiséis horas, en que es máxima la producción.

Pases realizados con dermovacuna en células HeLa.

A partir del virus liberado al medio a las veintiséis horas, de título $3,8 \times 10^1$, se inocula un frasco con células, se deja tres horas de adsorción a 37° C.; al cabo de las cuales se quita el virus, se lava con PBS y se añade medio nutritivo.

Se observan los efectos citopatogénicos en las células, a los tres días después de la infección celular, redondeadas, de bordes marcados y tamaño mayor que las normales. A los tres días se recoge el medio, que sirve para hacer un nuevo pase de igual modo que anteriormente. Los efectos producidos por el virus fueron más marcados que en el anterior. De esta forma se han realizado 25 pases consecutivos, titulando la cantidad de virus producido en los números 15, 20 y 25, según el cuadro que se muestra en la página siguiente.

	TITULACION EN CONEJO Diluciones del virus (diámetro de las lesiones, en mm.)								TITULACION MCA — N.º de partículas infectadas por cm. ³
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
Título del filtrado	28 N	21	16	14	12	8	5	—	$5,2 \times 10^5/\text{cm}^3$
Pase 1	—	—	—	—	—	—	—	—	$3,8 \times 10^4/\text{cm}^3$
Pase 15	21 N ⁺ ₊	18 N ⁺ ₊	15 N ⁺ ₊	12	10	8	6	4	$8,0 \times 10^5/\text{cm}^3$
Pase 20	23 N ⁺ ₊	22 N ⁺ ₊	20 N ⁺ ₊	16	16	14	9	7	$1,6 \times 10^6/\text{cm}^3$
Pase 25	29 N	24	22	19	17	9	6	2	$1,4 \times 10^7/\text{cm}^3$

N = necrosis.

N⁺ y N⁺₊ = diferentes grados de necrosis.

Como puede apreciarse, el título MCA ha aumentado 6 unidades logarítmicas a partir del pase I. Sin embargo, este crecimiento no es tan sensible en el conejo.

Los efectos citopatogénicos sobre las células son asimismo diferentes, pues en los 10 últimos pases realizados la destrucción del cultivo se verificaba de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, en que era total, mostrándose todas las células redondeadas en el corto tiempo de veinticuatro horas.

(Continuará.)

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

LA SEMANTICA EN EL ORIGEN DE LA MATERIA VIVA *

POR
ROMAN DE VICENTE JORDANA

Muchos siglos de incesante vivir dieron el concepto de vida. Es posible que su esencia no haya variado mucho en la sucesión del tiempo. Quizá nació de la vida misma. El hombre sabía de la vida, que sentía en sí. Sabía también de la muerte. Distinguía bien entre lo vivo y lo inerte. El filósofo purificó las ideas. El místico las idealizó.

Vivir, es tener vida. Vida, es actividad funcional de los seres orgánicos, indispensable para su conservación. Es también, entre otras cosas, de acuerdo con nuestros académicos, el estado de actividad de los seres orgánicos. Estado de cambio continuo & actividad funcional peculiar de la materia organizada & especialmente parte de ella que constituye un animal o planta antes de la muerte, existencia animada, estar vivo... sentencian los eruditos de Oxford. No busquemos más. Conceptos fáciles de entender, universalmente aceptados.

La naturaleza no da saltos. Hay un orden, una continuidad, una marcha lenta de perfección. En sucesión gradual, va adquiriendo complejidad hasta alcanzar el estado de la materia que vive, que piensa. Materia, que si bien no piensa en sí, aloja al menos el pensamiento: el espíritu. Casi sin sentirlo, la materia que impropriamente llamamos inerte toma contacto con la materia que llamamos viva. El paso, sin ser brusco, es en extremo importante. Hay un proceso fundamental: la materia se reproduce, cobra nueva actividad, vive. La materia es la misma, pero nuestro concepto de las cosas varía.

(*) Comunicación presentada a la III Reunión de Aproximación Filosófico-Científica: La Materia. Zaragoza, noviembre, 1959. Autorizada su reproducción por la Institución "Fernando el Católico".

Son cosas nuevas. Cosas que nos trae el progreso de las ciencias experimentales. Encontramos un límite diferencial, pero no lo precisamos. Aquí, en este límite, el concepto que tenemos de vida se hace más oscuro. Para algunos, el hecho pasa desapercibido. Para otros, el concepto se personaliza. Se hace peligrosamente personal para el buen gobierno del rigorismo científico y para el buen entendimiento entre los hombres de buena voluntad. Sin embargo, el problema no es difícil. De hecho, la Biología lo ha resuelto ya. Cierta elasticidad en la semántica de los vocablos utilizados puede dar la solución final.

En el límite de la materia viva, existe un grupo de elementos que tiene una actividad funcional y una autonomía genética. Son los virus. Muy cerca, siguiendo ese orden de sucesión gradual de la materia, se encuentran las proteínas activas que desempeñan papel tan fundamental en el desarrollo de los procesos vivos. Son los enzimas o fermentos. Ambos grupos de elementos son funcionales. En los dos encontramos materia organizada. De acuerdo con la semántica actual, podríamos decir que se trata de elementos vivos. Sin embargo, sería anacrónico decir que un fermento es un ser vivo. Es el mismo anacronismo que se adviene al decir que el virus es un enzima.

Es cierto que tanto el virus como el fermento tienen una composición macromolecular parecida: un grupo proteico y un grupo activo. Pero, también, una diferencia: el fermento es producido y sirve a la célula que lo produjo; el virus se autosintetiza y se beneficia de la célula que parasita. El fermento es producto de la vida; el virus, la vida misma. El grupo activo del virus (ácido nucleico) es capaz de dar la réplica de sí mismo. El del fermento, muy variable, no. El ácido nucleico es la molécula base de la vida. Unido a la proteína, forma una unidad biológica estable. No constituye una célula, pero tiene un lugar en ella. En ella se reproduce y transmite sus características a través de generaciones.

Aunque el virus carece de la categoría funcional que poseen aún las formas celulares más elementales, encuentra sus semejantes en las partículas también nucleoproteicas que parecen regir el funcionalismo y herencia de las células normales. Con ellas formaría la unidad funcional biológica o *Citoarjé*. La cual, más bien que como ser vivo, podría considerarse como *elemento* vivo, para diferenciarlo así de los seres celulares más organizados.

Al alcanzar el límite de la materia viva en el corpúsculo elemental, parte integrante o asociada del ser vivo organizado, aunque no sea ese mismo ser, el concepto de vida puede hacerse más preciso. La vida parece estar en la actividad funcional y genética de la materia orgánica, indispensable para su conservación y para la continuidad de la especie que representa o rige. Sería, también, un estado activo de la materia orgánica, que da la réplica de sí en una sucesión de generaciones. En todo caso, esperemos la solución del problema semántico más urgente, que, como decía Luria, en 1953, está en definir claramente qué se entiende por *virus* y qué por *vivo* o *viviente*. El cual, con un amplio sentido de su importancia, también fue planteado en cuanto a los términos *vida* y *viviente* por Pirie (1937) y por Lederberg y Lederberg (1956) al considerar el significado de *autorreproducción*.

BIBLIOGRAFIA

- LEDERBERG, J., y LEDERBERG, E. M., 1956. V. Infection and Heredity. En "Cellular Mechanisms in Differentiation and Growth". Editado por Dorothea Rudnick. Princeton University Press. Princeton. N. J.
- LURIA, S. E., 1953. General Virology. John Wiley and Sons. Inc, New York.
- PIRIE, N. W., 1937. The meaninglessness of the terms life and living. En "Perspectives in Biochemistry". Editado por J. Neecham y D. E. Green. Cambridge University Press. London.

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

EL PRINCIPIO DE LA MATERIA VIVA COMO UNIDAD FUNCIONAL BIOLÓGICA *

POR
ROMAN DE VICENTE JORDANA

La última década, feliz en descubrimientos biológicos, ha ido acercándonos más certeramente al concepto de lo vivo. En la idea absoluta, hay poco nuevo. No se hace nada nuevo bajo el sol, recuerda el *Eclesiastés* (1, 9). Son ideas inmutables que vuelven. Ideas de escuelas dispares del saber que se asocian por la cara visible de la observación insuficiente. Unidad de ideas que lograrían la perfección del concepto, si el pensamiento en sí lo fuese y no estuviese cargado de imprecisiones. El concepto se hace inestable y ha de precisarse día a día. Quizá la precisión esté, dando un sentido metafórico a la expresión, en ese fluir incesante que encontramos en Heráclito, siempre actual en todo concepto derivado de las Ciencias experimentales. Tal vez en la nueva combinación de cosas que ya existían, en el decir de Anaxágoras. El ideal, “la perfección o pureza absoluta” que preconiza Platón como carácter de la Idea, se logrará al fin del último experimento. El concepto, mientras tanto, debe precisarse en la nueva observación, para no caer en el dogmatismo intransigente. Ese dogmatismo que al mirar exclusivamente hacia dentro, hacia los datos del día o a la idea de su escuela, destruye el progreso en su propia raíz. Todo tiene su tiempo y todo cuanto se hace debajo del sol tiene su hora, vuelve a decirnos el *Eclesiastés* (3, 1).

En la Idea de la unidad viva se han ido sucediendo una serie de estados que abarcan desde las más puras hipótesis teleológicas hasta los modernos conceptos de la biología actual. Pero el concepto puro sigue

(*) Comunicación presentada a la III Reunión de Aproximación Filosófico-Científica: La Materia. Zaragoza. Noviembre 1959. Autorizada su reproducción por la Institución “Fernando el Católico”.

sin definirse. Las teorías más realistas están basadas en el estudio de entidades heterogéneas, y lo heterogéneo no define la unidad. La unidad biológica ha de ser universal y ofrecer una continuidad estructural, funcional y genética. Debe ser algo que recoja estas cualidades en una entidad homogénea. Por no haberse alcanzado ésta, sólo se definen unidades parciales. Un helecho, un hombre, una célula y un virus son a sus homólogos, porque en lo fundamental cumplen esas condiciones. Sin embargo, un organismo pluricelular no es al unicelular, como éste no es a un virus, porque estos elementos y los otros del conjunto múltiple de las especies y órganos difieren entre sí por lo accesorio.

En la razón actual no encontramos la Idea suprema de la unidad viva. La misma célula es heterogénea en su estructura y en la función varía de sus metabolitos. Así, la teoría celular y la más moderna de la recombinación metabólica, que aparenta buscar la unidad bioquímica de lo funcional con independencia de lo genérico, parecen insuficientes para definir en sí y por sí la idea de la unidad viva. No obstante, en el límite de la materia viva hay ciertos compuestos (próximos a los fermentos, ya lo hemos dicho) que podrían presentar las características señaladas. Son las nucleoproteínas. Están repartidas en el material genético de todos los seres vivos, incluidos los virus. Presentan una unidad estructural: proteína y ácido nucleico; y una actividad funcional. El DNA (*) es la única molécula conocida que da la réplica de sí. Además sintetiza el RNA (**) de gran dinamismo celular. Dinamismo que se encuentra en ambos ácidos durante los procesos de reproducción celular; en la autogeneración o autosíntesis de células y virus. Según Beadle, el DNA es la *molécula base* de la vida. En ella se encuentra la unidad fundamental de la reproducción, de la herencia, de la mutación y del funcionamiento. Algunos virus están formados por RNA.

El concepto de la *unidad funcional biológica, principio fundamental de vida o citoarjé*, que formulamos hace unos años, difiere muy poco. Se diferencia del anterior en condicionar el funcionalismo biológico del ácido nucleico a la presencia de la proteína. Así lo encontramos en la naturaleza. Una cosa sería la *molécula base* y otra la *unidad funcional*. Hay ciertas razones. Aparentemente, el ácido nucleico de un virus, al que se

(*) DNA, ácido desoxiribonucleico.

(**) RNA, ácido ribonucleico.

ha separado de su proteína, tiene la habilidad de sintentizarla de nuevo. Si se le asoció la de otro virus, produjo la suya propia. Estos datos son concluyentes para suponer que la proteína no tiene papel en la síntesis del virus. Por proceder de experiencias muy precisas, no lo son para creer que esa proteína carezca de función biológica. De hecho, en la naturaleza, la proteína y el ácido nucleico forman un virus estable. Igual ocurre con las nucleoproteínas de las células superiores. Algunas de éstas forman estructuras parecidas a los virus. Hay otra razón: aunque la proteína sólo ejerciese una acción protectora del ácido nucleico, no debe olvidarse la función activa de muchas proteínas. Hoy se considera que todos los enzimas son proteínas, aunque no todas las proteínas sean tomadas como enzimas.

Por el parecido entre virus y otras nucleoproteínas normales, la hipótesis de la *unidad funcional* asoció el parasitismo estricto del virus a la posibilidad de que ciertas nucleoproteínas celulares tuviesen un lugar en una célula extraña, distinta en especificidad a ellas mismas. La transducción, transmisión de un fragmento de material genético de una célula a otra, ha sido lograda (Tatum y Lederberg, 1946; Zinder y Lederberg, 1952). Al agente de la transducción se le da el nombre reciente de *episoma* (Jacob y Wollman, 1958). Los *episomas* son componentes genéticos (virus y otros) que pueden actuar como unidades independientes o incorporarse al cromosoma celular replicándose con él. El *episoma* encaja por tanto como *arjevirus* comensal o simbiote en el concepto de *citoarjé* (de Vicente Jordana, 1955b, pág. 43).

El perfecto funcionamiento de los organismos nos hizo suponer también la existencia de un principio que dirija, controle e impulse los fenómenos vitales. Sería una nucleoproteína. Estas forman todas las estructuras celulares que se dividen en la mitosis y hasta parecen dirigirla. Entran también en la constitución de los organículos, donde se producen los enzimas y otros metabolitos. El descubrimiento de la composición química del "organizer", diferenciador de la inducción embrionaria, empieza a confirmar este supuesto. El "organizer" ha sido identificado como una nucleoproteína (Niu, 1955).

Al asociar el parasitismo heterosomático de la unidad funcional con la dinámica del crecimiento celular, nuestra hipótesis consideraba a su vez que "el simple cambio de posición o de la naturaleza de un grupo funcional de su especial y compleja estructura química podría modificar o anu-

lar sus propiedades específicas para determinadas síntesis y estimular o crear otras nuevas". A pesar de que todavía queden puntos muy oscuros sobre la naturaleza de los tumores, no creemos impropio recordar que el estudio de éstos ha derivado hacia la función e importancia que los ácidos nucleicos tienen en su formación. Desde los trabajos de Sanarelli (1898) y de Roux (1910), el factor etiológico de las formaciones tumorales se ha asociado con cierta frecuencia a los virus. Gross (1953) logró producir carcinomas con virus leucémico. Trabajos posteriores confirman este hecho y relacionan al agente casual con el DNA. También Blank y colaboradores (1951) encuentran que las verrugas son producidas por DNA. Maningault y Stoll (1958), partiendo de las observaciones de Klein y Knupp (1953), llegan a la conclusión de que en la inducción de ciertos tumores vegetales toma parte importante el DNA del *Agrobacterium tumefaciens*. Valladares (1958) supone que la eficacia del agente aislado de un tumor canceroso en el desarrollo de un proceso leucémico experimental requiere el concurso del factor nucleoproteico completo. Esta nucleoproteína es portadora de DNA. También aquí encontramos el concepto de *citoarjé*.

La hipótesis suponía igualmente la existencia de un factor de defensa, asociado a los procesos normales de síntesis celular. Los resultados experimentales macroscópicos con tubérculos de patata han confirmado el supuesto. Los estudios con extractos de embrión de pollo, brotes de patata y plántulas de trigo han señalado que hay una fracción del extracto que tiene acción antibacteriana. En esta fracción hemos encontrado DNA y RNA. Es difícil, en este momento, precisar si la actividad bacteriostática es debida a la influencia de estos ácidos o a otro agente derivado o inducido por ellos. Las condiciones de aislamiento y sobre todo de actividad *in vitro* presentan ciertas dificultades que no permiten asegurar la identidad. No obstante, otros ejemplos se acercan también a estos hechos. Con las debidas reservas, consideremos el caso de la Properdina (Pillemer y col., 1954) y del Interferon (Isaacs y Lindenmann, 1957), agentes de naturaleza proteica. El primero es una proteína que posee la propiedad de tener acción contra las bacterias y virus cuando va asociada al complemento y al Mg^{++} . El segundo interfiere en el crecimiento de los virus. Isaacs (1959) anota la posibilidad de que el interferon, bien sólo o asociado a una sustancia producida por el

ácido nucleico, compite en el terreno sintético con el RNA del virus.

Al situar la unidad funcional en la naturaleza y especificidad de las nucleoproteínas, la unidad viva vendría a identificarse con el mismo principio de la materia viva. Estaría formada por unidades ultramicroscópicas elementales con un carácter genético en función de sí mismas, que poseerían la misión de regular y de regir los fenómenos vitales. Su naturaleza nucleoproteica les daría a su vez un carácter biocatalizador superior al de los enzimas. Como éstos, estarían formados por dos partes: *apoarjé* (proteína) y *coarjé* (ácido nucleico). En su conjunto formarían una unidad estable. Quizá haya que precisar más en el futuro. Para ello, será necesario demostrar, entre otras cosas, que los ácidos nucleicos naturales actúan intracelularmente con independencia de la proteína. Ello no implica un desmerecimiento de la importancia de los ácidos nucleicos como molécula base de la vida. Ni este último concepto hace desmerecer la importancia del complejo nucleoproteico en el establecimiento de la unidad funcional biológica.

La unidad viva, así concebida, parece hacerse universal de lo vivo y dar a los virus una situación real en el concierto biológico. En su continuidad genética se hallaría el evo biológico de cada especie, de cada variedad, de la raza o de la estirpe. Acordaría con la teoría del estado simplástico, ya pasada de moda, la unidad estructural de cada organismo, uni o multicelular, a través de las nucleoproteínas específicas del ser. Aceptaría la teoría celular. Pero la célula solamente sería la unidad viva más elemental que puede vivir independientemente. La dinámica vital de Platón, en su moderno concepto de la regeneración metabólica, tendría también una realidad al considerar en el mismo plano de igualdad o quizá superior la actividad genética. El sentido aristotélico de un principio rector, *pneuma* de Galeno, no pierde el valor de lo necesario. Finalmente, esta unidad viva reconocería la existencia de unidades elementales, ya preconizadas desde la segunda mitad del siglo pasado por varios autores (*). Estas unidades pueden ser capaces de un funcionalismo au-

(*) Cameron (1952), sin pretender que la lista sea completa, señala que estas unidades han sido designadas de acuerdo con las teorías correspondientes, como sigue:

"Unidad fisiológica" (Spencer, 1864). "Plastídulos" (Elsberg, 1876; Haeckel, 1876). "Micelas" (Nageli, 1884). "Gemulos" (Darwin, 1885). "Pangenes" (De

tónomo dentro de la compleja organización celular. Con ellas, un valor más vendría a añadirse a la jerarquía abstracta de las cosas vivas: organismo o ser, órgano y célula, en expresión de un concepto nuevo: *Citoarjé*. *Concepto del elemento vivo, a su vez catalizador de vida, que armoniza la función del gene y la cualidad del enzima en la unidad estructural de la nucleoproteína.*

Las inquietudes de hombres tan ilustres como Carracido, Ramón y Cajal y de Gregorio Rocasolano podrían tener una realidad. Decía Ramón y Cajal: "...A semejanza del viejo aforismo de Virchow, *omnis cellula ex cellula*, los citocolonistas proclaman el *omnis granulo ex granulo*.

Dichas teorías citocolonistas son perfectamente conciliables. La admisión dentro del protoplasma y núcleo de partículas vivas microscópicas no excluye, antes bien, postula la existencia de otras unidades ultramicroscópicas, de que las primeras vendrían a ser agregados visibles, algo así como ciudades dentro del gran estado celular. Heidenhain (1911), partidario de la citada conciliación, discurre muy atinadamente al distinguir en la célula dos categorías de elementos: la "histomera", unidad fisiológica de segundo orden (centrosoma, retículo protoplásmico, los cromosomas, las granulaciones primitivas, etc.), perfectamente visible al microscopio, y las "protomeras" o "bioforos", últimas unidades fisiológicas de dimensión ultramicroscópica, habitantes en el espesor de las

Vries, 1889). "Plasomas" (Wiesner, 1892). "Idioblastos" (Hertwig, 1893). "Gemmae" (Haache, 1893), etc. Más recientemente, Brachet (1945) y Monné (1948) consideran que la célula es un sistema organizado por cuerpos fibrilares (cromidios) comparables a los virus. Estos cuerpos contendrían ácidos nucleicos.

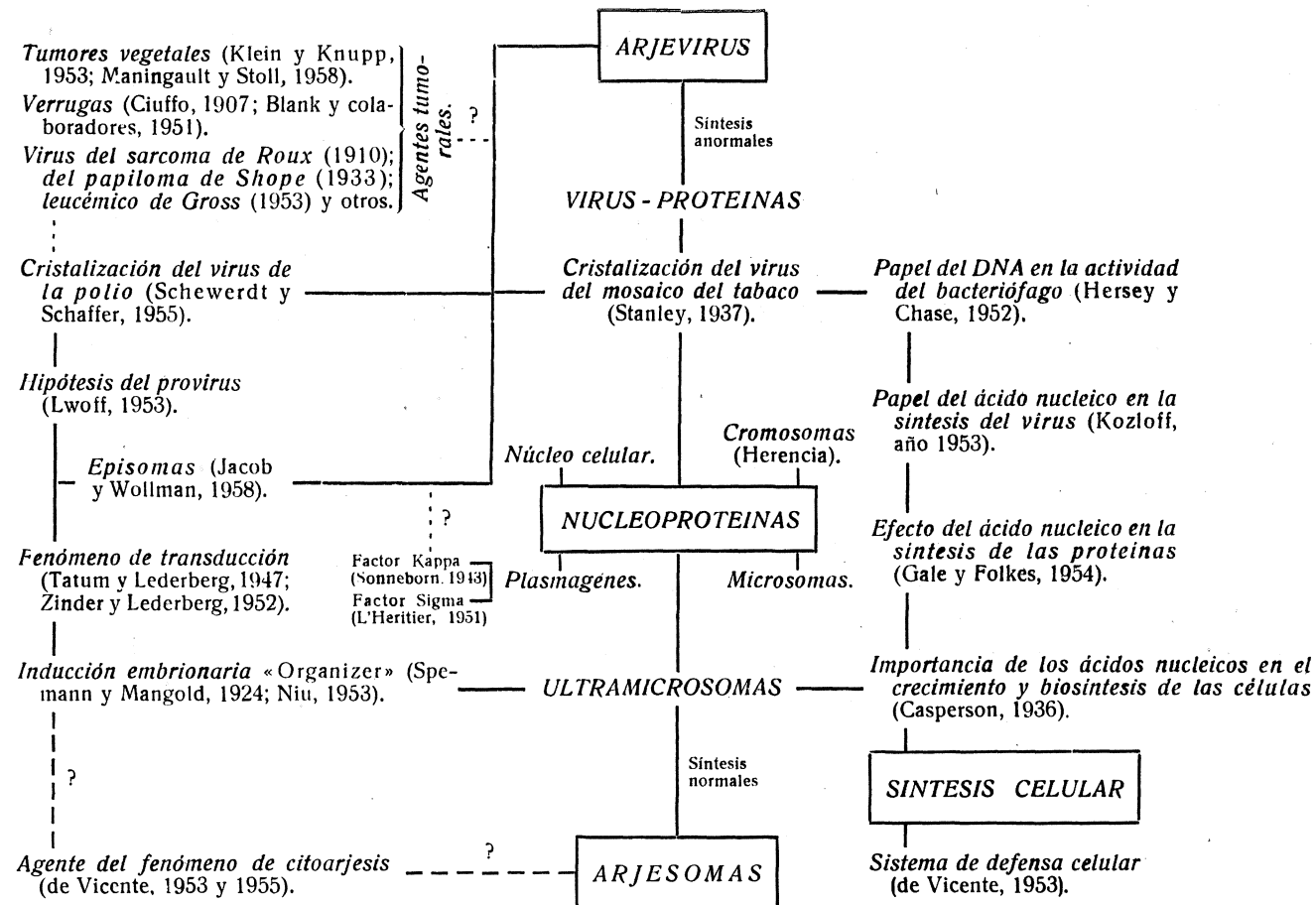
Según Ramón y Cajal (1913), gran parte de los términos anteriores, así como el de "Bioforos" de Weissmann y el de "Biogenes" de Werworn, vendrían a designar la misma unidad elemental como una molécula vital complejísima, invisible o poco visible al microscopio, donde tomarían asiento todas las propiedades esenciales de los seres vivos. Por otro lado, recoge en un segundo grupo los autores que consideraron que las últimas unidades vivientes son partículas microscópicas bien perceptibles, de tamaño y forma variable (Bedchamp, Altmann, Zoja, Held, etc.) y a los histólogos que concedían a determinados elementos formas del protoplasma y núcleo cierta individualidad y jerarquía fisiológica ("retículo" de Carnoy y van Gehuchten; "mitom" de Flemming; "histomeras" y "granulaciones glandulares primitivas" de Heidenhain; "neurofibrillas" de Apathy y Bethe; "condriomitos" de Benda y Meves; "microsomas" y "filamentos ramificados" de Retzius; etc., etc.).

histomeras. La máquina vital, es decir, la estructura fisiológica de la célula tiene su límite infranqueable en la protomera o bioforo. Más allá comienza el mundo físico-químico, es decir, los complicados edificios coloidales y los sistemas relativamente sencillos para el biólogo, pero formidablemente complejos para el físico, de las moléculas, átomos, iones y electrones.

Pláceme confesar que, después de un período de repugnancia, en parte motivada por las exageraciones y extravíos de algunos citocolonistas, la hipótesis que me ocupa preséntase actualmente a mi espíritu con caracteres de creciente verosimilitud y simpatía. Es más; por caprichos del azar, nosotros mismos, antaño anticitocolonistas convencidos, hemos descubierto algunos hechos de metamorfosis intracelular, difícilmente explicables si no se acepta que el armazón protoplásmico es algo vivo y relativamente autónomo, a su vez integrado por unidades invisibles independientes". Y de Gregorio Rocasolano, que nos orienta en la cita anterior, añade: "La estructura y composición química de *la materia viva*, no de las células, es el problema capital de la Biología".

"La moderna Bioquímica, con sus exploraciones ultramicroscópicas, debe llevar la dirección del organismo celular hasta resolver esta irresoluble nebulosa en micelas que presentan los fenómenos más elementales de la vida, y como el tránsito del estado coloide al cristalino es problema experimentalmente resuelto, se vislumbra la continuidad en los diversos aspectos de la materia, partiendo de la unidad en la creación". Hoy en día la cristalización de algunos virus, partículas vivas, es también problema resuelto.

Sin perjuicio de que haya que sacrificar ciertos datos no menos interesantes, el cuadro adjunto refleja los hechos experimentales y teorías más salientes que pueden llevar a establecer la *unidad funcional biológica* a través de las nucleoproteínas. El eje central pretende destacar la función básica de las nucleoproteínas en el principio de la materia viva. Las unidades elementales que en un organismo dado pueden catalizar las síntesis normales (arjesomas) o provocar una difunción (arjevirus) van representadas genéricamente en los extremos. Próximos al núcleo central se citan varios de los orgánulos celulares, a los que la biología clásica ha concedido una constitución nucleoproteica fundamental. Junto a ellos, atendiendo a varias descripciones, se incluye como plasmagene, pero al mismo



Posibles relaciones experimentales que permitirían establecer el concepto de la *Unidad funcional biológica o Citoarjé*.

tiempo como arjevirus, al factor Kappa del *Paramecium aurelia*, al que algunos autores han relacionado con el factor Sigma de la *Drosophila*.

En el ciclo exterior se establecen ciertas relaciones entre aquellos descubrimientos que han tenido una confirmación o aceptación general en el momento actual. Para ello se ha tenido en cuenta la actividad de los ácidos nucleicos en sus diversas manifestaciones genética y funcional, así como las propiedades de cristalización de los virus y otras inherentes a su funcionalismo endocelular.

En las cadenas laterales se señalan aquellos hechos todavía en vías experimentales y de confirmación de datos.

BIBLIOGRAFIA

- ALTENBERG, E., 1946. The "viroid" theory in relation to Plasmagenes, Viruses, Cancer and Plastids. Ann. Naturalist., 80, 559.
- BEADLE, G. W., 1959. Bases moléculaires de l'hérédité. Résumé d'une Conference. Strasbourg.
- BLANK, V. R.; BUERK, M., y WEIDMAN, F., 1951. The nature of the inclusion body of verruca vulgaris: A histochemical study of nucleotids. J. Invest. Dermat., 16, 19.
- CAMERON, G. R., 1952. Pathology of the cell. Oliver and Boyd. Edinburgh. London, pág. 43.
- GALE, E. F., FOLKES, J. P., 1954. Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acids incorporation in disrupted staphylococcal cells. Nature, 173, 1.223.
- DE GREGORIO ROCASOLANO, A., 1917. Estudios químico-físicos sobre la materia viva. Artes Gráficas A. Casafial. Zaragoza.
- GROSS, L., 1954. Is leukemia caused by a transmissible virus? A working hypothesis. Blood, 9, 557.
- HERSEY, A. D., y CHASE, M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol., 36, 39.
- ISAACS, A., 1959, sept. Action of interferon on the Growth of Sublethally Irradiated virus., Virology, 9, 56.
- ISAACS, A., y LINDENMANN, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. Proc. Roy. Soc., B147, 258-267.
- JACOB, F., y WOLLMAN, E. L., 1958. Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. C. R. Acad. Sci., 247, 154-156.
- KOZLOFF, L. M., 1953. Origin and fate of bacteriophage material. Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 18, 209.
- LWOFF, A., 1953. Lysogeny. Bact. Rev., 17, 269.
- MANINGAULT, P., y STOLL, CH., 1958. The role of nucleic acids in crow-gall tumor induction. Experientia (Basel), 14, 409.

- NIU, M. C., 1953. In vitro study of induction. *Anat. Rec.*, 117, 560.
- NIU, M. C., 1955. Identification of the inductor substances. *Anat. Rec.*, 122, 420.
- PILLEMER, L.; BLUM, L.; LE POW, I. H.; ROSS, O. A.; TODD, E. W., y WARDLAW, A. C., 1954. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*, 120, 279-285.
- RAMÓN Y CAJAL, S., 1913. Asociación Española para el progreso de las Ciencias. Congreso de Madrid. Discurso inaugural, 1, 23.
- SCHWEERDT, F. L., y SCHAFER, F. L., 1955. Crystallization of purified MEF-1 Polio virus. *Science*, 122, 879.
- SONNEBORN, T. U., 1949. Beyond the gene. *Ann. Scient.*, 37, 33.
- TATUM, E. L., y LEDERBERG, J., 1947. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 53, 673-684.
- VALLADARES, I., 1958. Biological properties of nucleoproteins obtained from cancerous tissues. IV International Congress of Biochemistry. Viena.
- DE VICENTE JORDANA, R., 1953. Un efecto bacteriostático del tubérculo de patata. Real Academia de Farmacia. Madrid (no publicado).
- DE VICENTE JORDANA, R., 1955a. Nota preliminar sobre *Citoarjesis* e hipótesis de los *citoarjes*. *Anal. Edaf. Fisiol. veg.*, 14, 9-10, 519.
- DE VICENTE JORDANA, R., 1955b. Acerca de la existencia de un sistema de defensa celular durante la fase de crecimiento: *Citoarjesis* e hipótesis de los *citoarjes*. *Anal. Edaf. Fisiol. veg.*, 16, 3, 387 (1957).
- DE VICENTE JORDANA, R., 1958. A bacteriostatic effect in potato tubers, *J. gen. Microbiol.*, 18, 1, xvi.
- ZINDER, N. D., y LEDERBERG, J., 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bact.*, 64, 679-699.

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

COMPETENCIA DE SINTESIS EN EL PRINCIPIO DE LA MATERIA VIVA: RAZON Y EFECTO DEL LLAMADO «FENOMENO DE CITOARJESIS»

POR
ROMAN DE VICENTE JORDANA

1. *Dinámica vital en el desarrollo de los microorganismos sobre la materia viva.*

Un hecho simple de observación común nos alcanza a todos. Vemos cómo la vida pasa en una sucesión de acontecimientos. Vemos también cómo la vida cesa. Los cadáveres de plantas y animales quedan formando una materia sin vida, muerta. El hecho no queda aquí. Muy pronto, la materia muerta inicia una descomposición. Se pudre. Otros organismos comienzan una vida exuberante sobre la materia que antes también era viva. Pertenecen al grupo de aquellos «animales tan pequeños que el ojo no puede ver», en expresión del polígrafo romano Marco Terencio Varrón. Hoy, sabemos que gran parte de estos «animales» tienen características vegetales. Son las bacterias, hongos y levaduras, cuyo descubrimiento contribuyó a destruir los errores que en su época la doctrina de la generación espontánea llevaba consigo. Generación espontánea de los organismos vivos, que se producía precisamente sobre la materia muerta. La vida parecía renacer de lo muerto.

Muchos de los organismos que liberan al mundo de sus despojos vivieron sobre esa materia ahora descompuesta, cuando todavía era viva. Sin embargo, no se habían atrevido contra ella. La habían respetado e incluso la habían favorecido con su actividad. En realidad, habían encon-

(*) Extracto de la conferencia del mismo título pronunciada en la III Reunión de Aproximación Filosófico-Científica: La Materia. Zaragoza. Noviembre, 1959. Autorizada su reproducción por la Institución «Fernando el Católico».

trado un organismo superior. Un organismo fisiológica y genéticamente más completo y le rendían vasallaje. Mientras aquella materia era viva, existió la ley del más fuerte. Después, sin cortapisa alguna, el microorganismo se reproduce a su antojo. Los que así actúan, antes y después de cesar la vida, son muchas veces microbios inocuos, saprófitos o simbioses, que viven sobre otros seres vivos o en su ambiente. La eficacia o inacción de otros microbios más peligrosos en el proceso de infección tampoco queda muy clara. En ocasiones, la potencialidad de las unidades infecciosas hace esperar una frecuencia mayor de infecciones. En otras, por el contrario, aparece inesperadamente el brote epidémico.

Los organismos superiores poseen o se procuran un sistema de defensas. Tienen un estado de inmunidad natural o adquirida, para librarse de esos minúsculos seres que tanto ansían destruirlos. Sin embargo, esta misma razón se hace insuficiente al considerar que muchos de los elementos que confieren la inmunidad, los anticuerpos, pueden alcanzar tal grado de resistencia que les permite actuar *in vitro*. Así, cuando conocemos que bastantes de ellos no se destruyen hasta pasados los 50° C., ¿porqué no actúan en el organismo que acaba de morir? Es curioso, que la putrefacción pueda avanzar tan rápidamente por efecto de un calor relativamente moderado. Si un examen macroscópico nos muestra cierto grado de putrefacción a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas, con temperatura de 37° C., por ejemplo, cabe deducir que el desarrollo de los microorganismos empezó bastante antes. Quizá en un momento relativamente próximo al de la muerte del ser. Algunos de los organismos que provocaron la putrefacción estaban ya ambientados a esta temperatura dos días antes en su habitat normal: el organismo en que moraban. Pero este organismo estaba vivo y no les permitía manifestarse.

Los microbios que producen toxinas son muy pocos. En su simplicidad carecen de sistemas de defensa, de anticuerpos. Sus endotoxinas son generalmente insuficientes para provocar el síndrome total de la enfermedad. Por de pronto, hay un hecho concreto. La mayoría de los que atacan la materia muerta no tienen más fuerza que las que les confiere su extraordinaria capacidad de reproducción, con toda su secuela de enzimas. Es una observación, no una razón suficiente.

Veamos un grupo de árboles. Las ramas que brotaron este año

están verdes y de aspecto sano. Están todavía creciendo. Sus troncos, más viejos, están dañados por la enfermedad. Aquel que la tormenta tronchó, carcomido por dentro. Las plantas carecen de anticuerpos. También carece de ellos, no los adquirirá hasta pasados algunos meses, ese niño que ha nacido libre de gérmenes de su madre enferma. Libre de gérmenes y de anticuerpos está igualmente el embrión de pollo que se utiliza para el cultivo de virus. Hay una coincidencia muy particular en estos pocos ejemplos. No hay anticuerpos, pero aparentemente hay defensa. Son organismos u órganos que como los microbios están en período de crecimiento. También aquí nos limitamos a observar.

2. *Semejanza de la función biológica entre los componentes del sistema huésped-parásito.*

Hemos presentado dos casos opuestos. Sin embargo, ambos presentan una cierta semejanza. De una parte, la vida de un microorganismo parece manifestarse sobre la materia que fue viva por el solo impulso de su actividad de crecimiento. De otra, la misma actividad de un organismo superior aparenta un estado particular de defensa. En ambos casos, esta actividad es el exponente máximo de los estados de síntesis celular. La célula, primero, se divide; después, se cuadruplica; más tarde, a una velocidad a veces extraordinaria, alcanza en progresión geométrica un número elevadísimo de sus individualidades específicas. La célula necesita todo para sí.

Ambos son casos de excepción, opuestos. Debemos buscar el punto medio. Podemos suponer que la infección y el desarrollo de los microorganismos sobre la materia orgánica no son sino consecuencia de la actividad vital de un organismo ocupando su lugar o nicho ecológico. En el caso de un desarrollo del organismo inferior, en el organismo superior ya muerto, no hay problema. La lógica nos acompaña. El microorganismo se desarrolla en un medio sumamente rico y favorable. En él encuentra toda clase de alimentos en la gama más variada: desde los puramente energéticos, hasta los metabolitos más delicados. Encuentra también los elementos base de los que se hubiesen descompuesto y sustancias preparadas para su asimilación inmediata.

En el caso de ataque a un organismo todavía vivo, el problema se complica. Debido a su propia simplicidad, el desarrollo del parásito

está necesariamente limitado por los estados fisiológicos e inmunológicos del huésped, que a no dudar es un organismo más complejo y completo. Por consiguiente, ha de encontrarse una interacción de actividades biológicas entre los componentes del sistema huésped-parásito. A una mayor fortaleza del huésped, el parásito lógicamente no debe manifestarse. Pero la debilidad del huésped ha de ser necesariamente un factor importante de la infección. En definitiva, parece que encontramos dos fuerzas opuestas que han de llevar a un estado ideal de equilibrio dinámico.

Pasemos al campo experimental.

No ha sido fácil, ciertamente, encontrar el organismo idóneo para esta clase de experiencias. Tras estudiar ciertas actividades del embrión de pollo, tomate, trigo y judía, llegamos a la conclusión de que estos elementos, muy útiles en algunos aspectos, no nos permitían llegar a conclusiones efectivas. Un embrión de pollo no podemos partirlo por la mitad, para ver como actúan sus dos partes y eliminar así el factor individual. Tampoco podemos hacerlo con una planta. La planta también deja de sernos útil al someterla a ciertos tratamientos de temperatura y humedad. Una vez que sus puntos de crecimiento se han inactivado, difícilmente se recupera. A nuestro modo de ver, la recuperación es una condición importante.

No obstante, tenemos un material útil: el tubérculo de patata. (*). La patata ofrece unas condiciones especiales. En primer lugar, su gran autonomía. En segundo, su extraordinaria sensibilidad a las bacterias de la podredumbre. Después, su incapacidad para producir anticuerpos. Así, también, la posibilidad de paralizar o activar su proceso de germinación a voluntad del operador. Y, finalmente, la autonomía de sus brotes, que permite partirla en dos o más partes y experimentar con cada una de ellas como una sola unidad sin perder el factor individual.

Bien. Haciendo funcionar el tubérculo de patata como si fuese un tubo de ensayo vivo, aparecen una serie de hechos muy interesantes. Pero lo curioso es que, en estas experiencias, no ha sido el investigador el que ha marcado la pauta del ensayo, sino que ha sido el propio tubérculo el que ha ido señalando el camino a seguir. El que ha corregido los errores del investigador. Cuando el investigador quiso una

(*) DE VICENTE JORDANA, R. Real Academia de Farmacia. Madrid (1953). No publicados; Anal. Edaf. Fisiol. veg. 13, 9-10, 705 (1954).

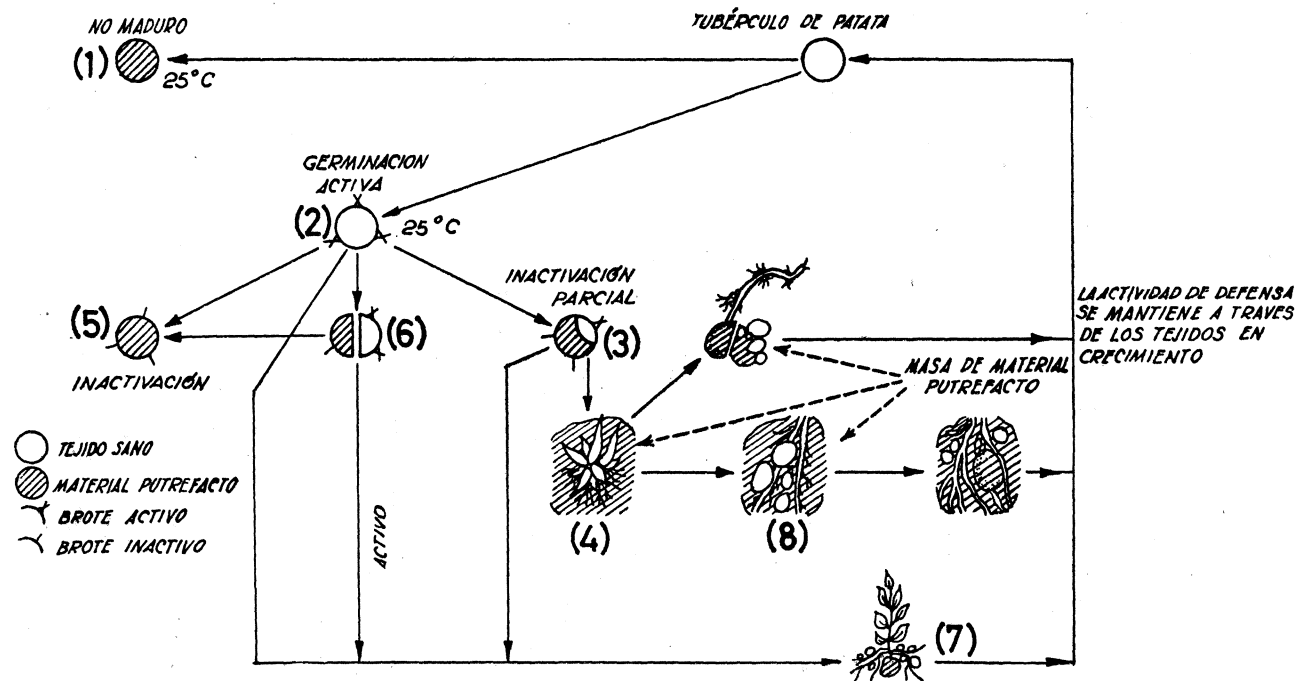


FIGURA 1.

CITOARJESIS EN LOS TEJIDOS DE LA PATATA.

La actividad de defensa se localiza preferentemente en los tejidos que presentan una síntesis celular muy activa.
(Explicación en el texto.)

respuesta más o menos prefabricada, el tubérculo pudo contestar negativamente. Volver sobre los pasos era lo indicado. De hecho, el tubérculo tenía razón. En ese ir y venir se han alcanzado algunas conclusiones. Veámoslas rápidamente tomando como punto de referencia los gráficos que publicamos.

En la figura 1 se representan esquemáticamente los siguientes hechos: Los tubérculos de patata que no han alcanzado un grado especial de madurez se pudren en contacto con agua tan pronto como se les inocula con las bacterias de la podredumbre (*Erwinia carotovora*, por ejemplo) (1). Igual ocurre si los tubérculos están infectados naturalmente. Por el contrario, la actividad germinativa del tubérculo paraliza la infección (2). El efecto de defensa es inmediato al comienzo de la actividad del tubérculo o, mejor dicho, de los brotes del mismo.

La actividad de defensa se localiza preferentemente en los puntos germinativos de donde se irradia a todo el tubérculo. Por ello, siempre que existe un brote activo aparece alguna parte de los tejidos en estado sano (3). En último caso, un brote activo puede desarrollarse y echar raíces en el material putrefacto del tubérculo inactivo de que procede (4).

La paralización del desarrollo de los brotes provoca un estado de inactivación del tubérculo, que lleva en un plazo más o menos largo a su putrefacción. Esta inactivación puede ser causada por diversos medios experimentales, tales como cambios en la temperatura de incubación; modificación de las condiciones de aireación (*) (a veces, tan simplemente como pincelando los brotes con aceite de oliva), extracción de los brotes, pelando los tubérculos, etc. Por procedimientos fuertes de inactivación, la putrefacción puede comenzar por los brotes. Los brotes, en este caso, han demostrado ser los tejidos más sensibles, y el tubérculo se pudre totalmente (5).

El sistema de defensa no depende de una condición o factor individual del tubérculo, sino de su actividad. Esto queda confirmado por el hecho de que las dos o más partes en que puede dividirse un tubérculo presentan un comportamiento distinto según que conserven brotes activos o no. La parte activa se mantiene sana, en tanto que la inactiva se pudre (6).

Los tubérculos activos y los parcialmente inactivados por medios experimentales dan lugar al crecimiento de plantas y nuevos tubérculos

(*) DE VICENTE JORDANA, R. Dissertation. University of Cambridge (1957).

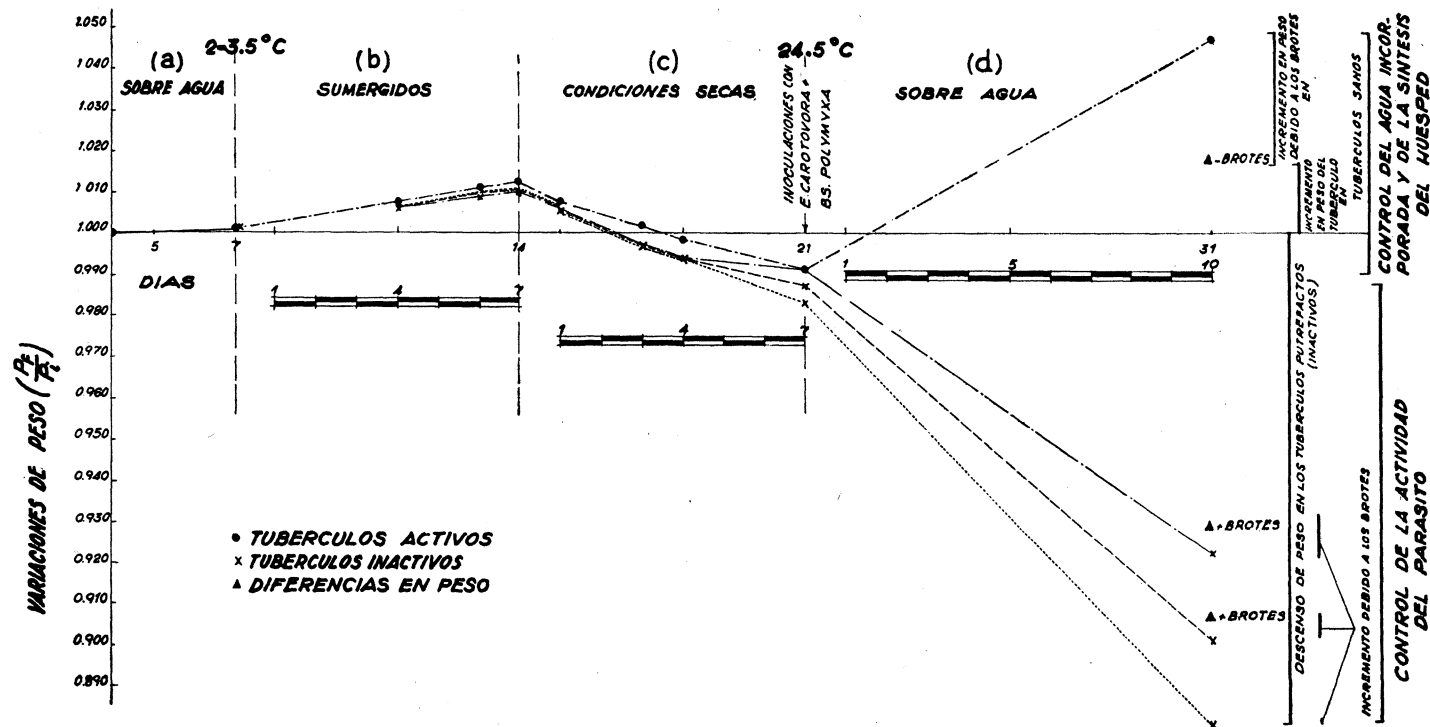


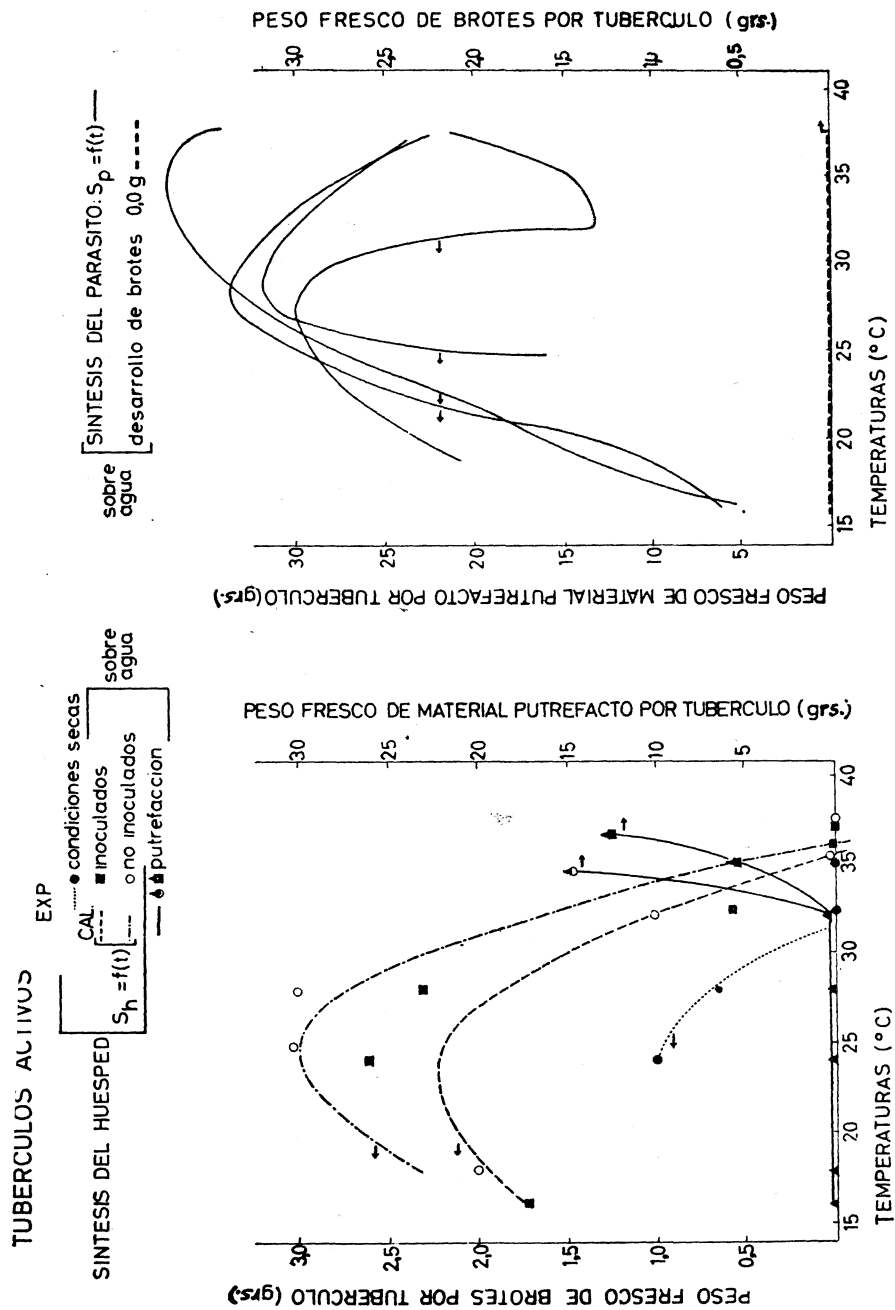
FIGURA 2.

Los mismos factores ambientales pueden favorecer la defensa del huésped o el ataque del parásito. Tanto en un caso como en otro, el efecto directo del agua a 24,5° C. estimula la actividad fisiológica de ambos organismos. Como puede verse en el gráfico, un incremento de la actividad genética de los brotes da como respuesta un incremento de la actividad de defensa; la disminución de esa misma actividad genética redundará en un aumento de la actividad del parásito. Todos los tubérculos corresponden al mismo lote. Los designados como inactivos se inactivaron en el curso de la experiencia, por el tratamiento previo de inmersión en agua a 2-3,5° C.

sanos (7). Algunas veces los tejidos en crecimiento se encuentran mezclados con el material putrefacto, sin que se afecte el tejido en desarrollo activo (8).

Ahora bien, la capacidad de síntesis del huésped puede medirse de otra forma (fig. 2). Se puede expresar en incremento de peso. Este procedimiento, sólo que a la inversa, puede servirnos también para conocer la actividad sintética del parásito. Los tubérculos en vías de putrefacción pierden peso. Si además de utilizar la *Erwinia carotovora*, asociamos en la inoculación al *Bacillus polymyxa* que tiene una gran acción proteolítica y sacarolítica, los tejidos putrefactos se digieren antes y la pérdida de peso es mayor. Dividiendo el peso de los tubérculos (P_f) durante el curso de la experiencia por el peso que tenían inicialmente (P_i) se obtiene un índice que nos expresa las variaciones de peso (V), indicadoras de las respectivas actividades del huésped o del parásito. Estas variaciones de peso van asociadas en el gráfico al peso de los brotes desarrollados; lo cual permite alcanzar una idea más clara de la actividad real de los procesos de síntesis del huésped. Como el aumento de peso podría ser debido a un incremento del contenido de agua del tubérculo o a agua absorbida por éste, los tubérculos de la experiencia representada en el gráfico fueron sometidos a varias condiciones sucesivas de humedad directa. Por ellas quedó demostrado que en ausencia de la actividad biológica del huésped (2—3,5° C.) la cantidad de agua absorbida por los tubérculos puestos sobre agua fue mínima. En cambio, a 25° C., cuando la actividad germinativa estuvo en su apogeo, el incremento en peso llevó un ritmo creciente, siempre mayor al obtenido durante el proceso de máxima absorción de agua; es decir, cuando los mismos tubérculos habían sido sumergidos en ese elemento.

Esta experiencia es significativa también en demostrar un hecho muy interesante, frecuentemente observado: el efecto extraño, si se quiere anacrónico, que produce la acción del agua sobre los tejidos de la patata. De una parte, favorece el desarrollo del parásito; de otra, fortalece la defensa. Mas, realmente, el efecto es lógico. El mantenimiento de las condiciones biológicas de todo ser vivo requiere que sus células conserven un cierto contenido de agua. Las bacterias y los tubérculos de patata no son una excepción. En la práctica, la actividad patógena de las bacterias de la podredumbre (en especial, de la *Erwinia carotovora*, que es la que mejor hemos estudiado) requiere el contacto de los tejidos de



FIGURAS 3 Y 4.

Cada organismo tiene una temperatura óptima de crecimiento que se refleja en la curva correspondiente. El tubérculo de patata (huésped) presenta su óptima a los 25° C., aproximadamente. La *Erwinia carotovora*, var. *aroidae* (parásito) a los 27° C. Cuando las condiciones ambientales favorecen la síntesis del huésped en función de la temperatura ($S_h = f(t)$) la actividad del parásito no se manifiesta. Por el contrario, al decaer la actividad de aquél, la síntesis del parásito ($S_p = f(t)$) se acusa por un incremento en la putrefacción de los tejidos del tubérculo.

la patata con el agua (*). Es una condición muy necesaria. Ahora bien, estos tejidos han de estar inactivos, es decir, fuera de la influencia de brotes activos.

Junto a este factor de actividad común para el huésped y para el parásito, encontramos otro. Es la acción de la temperatura (**). La temperatura óptima para el desarrollo de ambos está muy próxima, 25° C. poco más o menos para el tubérculo (fig. 3), y 27° C. para el crecimiento de la *Erwinia*. También aquí es necesario que el tubérculo se encuentre inactivo para que el parásito pueda actuar (fig. 4).

Estos factores comunes para los dos componentes del sistema huésped-parásito dan a ambos la misma oportunidad de desarrollo. Sin embargo, sólo la debilidad del huésped aumenta las posibilidades del parásito. La dinámica de las funciones vitales parece entrar en juego; dinámica vital del huésped que puede considerarse igual y opuesta en especificidad íntima a la dinámica vital del parásito. Porque en este caso no hay razón para considerar en un aparte las mayores exigencias de oxígeno del huésped. Este factor entra lógicamente en el conjunto fisiológico que ha de beneficiar su economía. De la misma forma que una disminución de oxígeno ha de favorecer al parásito que se encuentra en el grupo de los facultativos anacrobios.

El conjunto de estas fuerzas opuestas en la dinámica de la infección, puede llevar por tanto a un estado de equilibrio entre ambos componentes del sistema (***).

3. Importancia de la función genética en los procesos de infección y defensa.

Hemos agotado todas las posibilidades que permitan enmarcar el fenómeno que hemos descrito en una razón conocida. En el momento actual hemos pasado de los 5.000 tubérculos, estudiados uno a uno, en distintas condiciones de actividad o de inactivación provocada. El resulta-

(*) DE VICENTE JORDANA, R. Microbiol. esp. 11, 1, 37 (1958).

(**) DE VICENTE JORDANA, R. Anal. Edaf. Fisiol. veg. 14, 9-10, 519 (1955); Microbiol. esp. 11, 1, 37 (1958); Anal. Edaf. Fisiol. veg. (en prensa).

(***) DE VICENTE JORDANA, R. VII Congreso Internacional de Patología Comparada, II: 187. Lausana (1955); Anal. Edaf. Fisiol. veg. 14, 9-10, 530 (1955); 16, 3, 387 (1957); Microbiol. esp. 11, 1, 1 (1958).

do es siempre el mismo. La actividad biológica aparece una y otra vez.

Es muy difícil discernir, dentro de la actividad biológica, dónde termina la función metabólica y donde empieza la genética. La misma doctrina de la regeneración metabólica las presenta en un todo unidas en su misma designación. Reúne en un sólo concepto todas las actividades sintéticas de la célula. No tendríamos inconveniente en aceptar que la causa del fenómeno que hemos descrito se encuentra en el complejo fisiológico de las células. Pero, no podemos. La actividad metabólica de los tejidos de la patata es estudiada con frecuencia en trozos cortados del tubérculo. Estos trozos, lo hemos visto experimentalmente, se inactivan en ausencia de los brotes. No tienen capacidad de generación propia. El brote, por el contrario, la tiene. Es en el brote precisamente donde radica la actividad de defensa. Ya hemos dicho que un brote puede desarrollarse y echar raíces en el material putrefacto de un tubérculo inactivo. Esto, ciertamente, es algo singular, muy significativo. Apunta en cierto grado a una diferenciación entre lo que podía ser una función puramente genética, mantenedora de los principios vitales básicos, y la función propiamente metabólica.

Tenemos también otro caso singular y muy interesante. Es el caso de los tubérculos que se inactivan y empiezan su putrefacción a temperaturas que no favorecen los procesos de germinación. Estos tubérculos, al ser trasladados de nuevo a temperaturas adecuadas y reactivar su germinación, vuelven a manifestar el fenómeno de defensa (*). En principio, este comportamiento dispar podría deberse a la influencia de la temperatura sobre los procesos respiratorios. Pero, según sabemos por los estudios de Tomiyana (1957) (**) el cociente respiratorio de ciertos tejidos de la patata no se modifica cuando estos tejidos son sometidos a temperaturas de 45° C. La respiración, eso sí, baja en intensidad. Por otra parte, la inactivación y putrefacción de los tubérculos tiene lugar exactamente a aquella temperatura (35° C) en que pierden el poder germinativo (figura 3). Encontramos otra vez la actividad genética del huésped.

Algunos de estos razonamientos podrían aplicarse también a la acción del parásito. Ambos organismos de ensayo, el tubérculo de patata

(*) DE VICENTE JORDANA, R. Anal. Edaf. Fisiol. veg. 14, 9-10, 519 (1955).

(**) TOMIYANA, K. 1957 Ann. Phytopath. Soc. Japan. 22, 4-5, 237-242.

y la bacteria utilizada, pertenecen al grupo de organismos más generalizado de la naturaleza, que en amplios términos podríamos llamar poiquilotermos. Nos referimos a los organismos que carecen de sistemas que regulen su temperatura interna. Estos organismos parecen demostrar que el efecto de la temperatura en su desarrollo es debido a que este factor físico se asocia intimamente a otro factor biológico. Un factor biológico de gran importancia genética. En efecto, las reacciones metabólicas de estos organismos suelen bajar en intensidad, pero no en calidad, al alejarse de su temperatura óptima. Hay un máximo de actividad, y este máximo viene determinado por una temperatura específica para cada organismo. Una temperatura que necesariamente debe estar asociada a un carácter genético, puesto que, en su punto óptimo, el crecimiento de los organismos es más rápido y mejor (*).

Consideremos como ejemplo el caso de tres bacterias de la misma familia (*Enterobacteriaceae*). De ellas, dos corresponden al mismo género. Las tres tienen muchos caracteres comunes. Tan comunes, que en ciertas de sus reacciones difícilmente se diferencian. Tamaño próximo. Forma idéntica (bacilar, flagelos peritricos). Las mismas reacciones tintoriales (Gram negativa). Igualdad en algunas pruebas bioquímicas, etc. Sus diferencias, basadas en la presencia o carencia de tal o cual enzima, de tal o cual antígeno, no son más significativas que las que puedan presentar frente a otras bacterias. Lo verdaderamente interesante y diferencial entre ellas está en su temperatura de desarrollo: la *Erwinia carotovora*, que crece entre los 6 y 35° C., tiene su temperatura óptima a los 27° C. La *Escherichia coli*, que se desarrolla entre los 10° y los 45° C. presenta la temperatura óptima entre 30° y 37° C. La *Erwinia chrysanthemi* alcanza su mejor crecimiento a los 40°-41° C (**). Tomemos ahora como punto de referencia el que las tres estirpes fermentan la glucosa. Pero dadas las características de su crecimiento, el máximo de la reacción se encuentra para cada una de ellas a una temperatura distinta. Por tanto, la velocidad de reacción para un mismo substrato está catalizada por tres enzimas en apariencia idénticos, pero distintos en especificidad. Especificidad que viene dada principalmente

(*) DE VICENTE JORDANA, R. Anal. Edaf. Fisiol. veg. (en prensa).

(**) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. U. S. A.

por su sensibilidad a la temperatura. Si al igual que estos tres enzimas, todos los demás del complejo fisiológico de estas tres especies, y de los otros organismos, están subordinados a un mismo efecto específico para cada individualidad orgánico-funcional, habrá que deducir la existencia de un catalizador superior que rige la formación de enzimas en función de la temperatura.

Como este catalizador ha de formar parte de las características hereditarias de cada organismo, parece natural que encontremos su relación con el proceso vivo en la misma razón de lo genético. Es evidente, por tanto, que los procesos de infección y defensa por efecto de la síntesis celular tendrán también su razón en la función genética de cada individualidad celular u orgánica. Hoy se dice con inusitada frecuencia que la formación de los enzimas está regida por genes.

4. *El principio de la materia viva en la razón de una función necesaria para el fenómeno de Citoarjesis.*

Resumimos. El tubérculo de patata paraliza su putrefacción cuando los brotes están en período activo de crecimiento. En este momento el tubérculo aumenta de peso. Hay síntesis celular del huésped, pero no putrefacción. Paralicemos la germinación. El tubérculo se pudre, pierde peso. Esta pérdida de peso es debida al metabolismo del microorganismo. Metabolismo que, en este caso, no ejerce función de mantenimiento sino de proliferación. Indica la síntesis celular del parásito. Alternativamente, podemos lograr la activación o inactivación de un mismo tubérculo. Su putrefacción o su defensa. Provocar la síntesis del parásito o la síntesis del huésped. Los conocimientos actuales no dan una razón suficiente para este efecto.

A falta de una razón suficiente, parece oportuno buscar la razón de una función necesaria. El periodo de crecimiento es el exponente máximo de la síntesis celular. Síntesis de carácter más bien genético. Se crea nueva vida. Esto ocurre tanto en el organismo superior como en el inferior. Cabe en lo muy posible que la *defensa primaria* de los organismos se encuentre en la regeneración de sus elementos, en su propia vida. Que exista una competencia o interferencia de "vidas"

Esta interferencia de vidas parece que no puede realizarse a través de aquellos elementos que como las enzimas y otros metabolitos se en-

cuentran repetidos con uniforme monotonía entre todos los seres vivos. En esos elementos que no tienen capacidad de generación y son a modo de auxiliares dinámicos de los procesos de síntesis. Elementos que no se producen por sí, sino que requieren el concurso de la vida para crearse. La razón de la competencia ha de encontrarse en aquellos otros elementos que por generarse en sí demuestran tener vida propia. Ha de encontrarse también en los elementos que toman parte en los procesos de reproducción celular y en aquellos que por constituir los orgánulos celulares que inducen la formación de enzimas y demás metabolitos demuestran ser catalizadores de vida. Ha de encontrarse en los genes. Los genes parecen ser pequeñas cadenas de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos que se consideran actualmente como las moléculas elementales de vida.

Ciertamente, los ácidos nucleicos son también los que dan el carácter distintivo a cada ser vivo. Están formados por unos compuestos llamados polinucleótidos. Cada polinucleótido, a su vez, por un número variable de nucleótidos enlazados en cadena. El nucleótido, por ácido fosfórico, un azúcar y una base nitrogenada. El ácido fosfórico es igual en todos los seres y elementos vivos. El azúcar (ribosa) también; pero hay dos tipos de azúcar que diferencian los dos tipos principales de ácidos nucleicos: el DNA y el RNA. Como se pueden hacer muchas combinaciones en el número, posición y variación de las bases nitrogenadas, cada ser o elemento vivo tiene su composición propia.

Así encontraríamos que la competencia de vidas se hallaría en que cada ser o elemento vivo trataría de hacer su propia combinación con los compuestos comunes que encuentre en su medio ambiente. Incluso a costa de los compuestos integrantes de su competidor. Veríamos en el principio de la materia viva el mismo egoísmo y el mismo sentido de conservación de la especie que encontramos en los organismos superiores. El pez grande no se comería al chico. Sería el elemento más dinámico, con más capacidad de generación, el que lograría su propia síntesis antes que el que entra con él en competencia.

En la *causa dinámica* de esa competencia de síntesis celular, quizá encontraríamos también la razón que obliga a los organismos a aceptar una temperatura específica para el mejor desarrollo de sus funciones vitales. Secreto tan celosamente guardado por la naturaleza. Sea más bien, escondido por la poca atención que se le ha prestado hasta ahora,

que por la enorme difusión de ejemplos que se nos brindan por doquier. Es así que vemos como ciertos seres quedan emplazados a mantener una temperatura adecuada en lo más íntimo de su ser, mientras que otros han de buscarla en las condiciones ambientales. Es también cuando observamos cómo la temperatura que hace germinar las esporas de los hongos o brotar las plantas, distribuye las especies del ser vivo, vegetal o animal, por la superficie del globo. Temperatura que en unión de otros factores ecológicos puede no autorizar el crecimiento de las plantas tropicales en las elevadas cumbres del norte, ni la presencia de la aterciopelada flor de las nieves en las llanuras bajas. Esto, que en términos vulgares llamamos aclimatación, debe tener una causa. Posiblemente, la misma causa que se adivina en los fenómenos experimentales que describíamos antes. Esa causa que pide identificarse con un sistema superior que impulse los fenómenos de la vida bajo el efecto de una temperatura dada para cada especie. Sistema tan sensible, que se acusa incluso en la actividad de los virus, simples partículas de vida.

La propia sensibilidad del sistema parece indicar su función catalítica, pues sólo un catalizador puede proyectar con tanta fidelidad los cambios de temperatura en una curva de crecimiento, por ejemplo. En ese catalizador, todavía no especificado, que intuimos con el nombre de *Citoarjé*, se podría identificar un a modo de gene funcional de características muy próximas a las enzimas (*). No sabemos si aislado por alguien habrá sido clasificado como tal, aunque haya pasado desapercibida su verdadera función en el concierto biológico. En lo que no nos cabe duda es que ese catalizador existe y que por el momento ha de considerarse como integrante del complejo genético de las células. En un concepto más amplio, el "termogene" (por llamarlo de alguna manera más llana y sin que ello implique ninguna adición a la terminología) puede corresponder a un gene, a una constelación de genes o, en todo caso, estar representado por el genoma. Por tanto, aquí habría otra razón para creer que los ácidos nucleicos, elementos fundamentales de los genes, toman una gran parte de la competencia dinámica que por la síntesis celular específica pueden entablar dos seres vivos antagónicos —huésped y parásito— en el mismo principio de la materia viva.

(*) DE VICENTE JORDANA, R., Anal. Edaf. Fisiol. veg. 14, 9-10, 539 (1955); 16, 3, 387 (1957); J. gen. Microbiol. 18, 1, xvi (1958).

De ser así, la función exigida podría estar en la razón de vida de cada individualidad: en esa razón de vida que representa la síntesis específica de los ácidos nucleicos. La actividad de síntesis específica del huésped podría impedir la correspondiente al parásito. Un debilitamiento de aquél favorecería a éste. En definitiva, aparece como una competencia de síntesis en el principio de la materia viva. Una rivalidad en la autosíntesis de los ácidos nucleicos, de las nucleoproteínas, que podría llevar a un estado de equilibrio inestable entre ambos componentes del sistema huésped-parásito. Equilibrio de síntesis celular, que traducido en la defensa primaria o en la proliferación de los organismos sobre la materia viva debilitada, llevaría a conocer la razón y efecto del llamado fenómeno de *Citoarjesis*. Kytos: célula; arjé: dirigir, mandar.

ACTIVIDADES DE LA SOCIEDAD

Acta de la Sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 17 de marzo de 1959.

Se abre la Sesión a las 20 horas y 30 minutos, en el Salón de actos del Instituto "Ramón y Cajal" del C. S. I. C., Velazquez, 138. Preside D. Gerardo Clavero del Campo y actúa como Secretario D. Lorenzo Vilas.

Se aprueba el Acta de la Sesión anterior. Se admite como socio de número a D. Sebastián Hernández Fernández, Médico, de Madrid, presentado por D. Justo Martínez Mata y D. Francisco Maldonado.

El Sr. Fernández Sánchez presenta "Un nuevo método de tinción de bacilos esporulados", al que hacen comentarios los Sres. Pérez Silva, Vicente y el Secretario. La Srta. Gil da cuenta de su trabajo *Rickettsia burnetti*, como simbiota del *Argas Persicus*. El Sr. Presidente habla de la importancia de las *Rickettsia* desde el punto de vista epidemiológico. Los Sres. Feduchy y Portolés exponen su trabajo "Micosis urinarias subordinadas a la presencia de sustancias antibióticas".

Se levanta la Sesión a las 21 horas y 45 minutos.

CONFERENCIA DEL PROFESOR CLAVERO

Nuestro Presidente, Prof. Clavero del Campo, pronunció una conferencia acerca del tema "Estudio sobre la cepa E de *Rickettsia prowazeki*", el día 28 del pasado mes de abril.

A la conferencia, primera de un ciclo organizado por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, asistieron, junto a los miembros de ésta, representantes de la Sanidad nacional.

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráficas REYES. - Jerónima Llorente, 15. - Madrid.