

VOLUMEN 13. 1960

JULIO - SEPTIEMBRE. NUMERO 3

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

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

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L' ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
E X C H A N G E D E S I R E D

Suscripción (4 números): España, 110 pta.; extranjero, 150 pta.
Número: España, 30 pta.; extranjero, 40 pta.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

- ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 pta.; extranjero, 240 pta. Número: España, 20 pta.; extranjero, 30 pta.
- ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI" (Estación Experimental de "Aula Dei". Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 pta.; extranjero, 160 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 50 pta.
- ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES" [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto "A. J. de Cavanilles". Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 pta.; extranjero, 220 pta. Número: España, 200 pta.; extranjero, 230 pta.
- ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España: 150 pta.; extranjero, 175 pta. Número: España, 160 pta.; extranjero, 185 pta.
- ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Acimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 pta.; extranjero, 100 pta. Número: España, 45 pta.; extranjero, 60 pta.
- ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 165 pta. Número: España, 30 pta.; extranjero, 60 pta.
- CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 160 pta. Número: España, 30 pta.; extranjero, 45 pta.
- COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 125 pta. Número: España, 110 pta.; extranjero, 135 pta.
- CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO "LUCAS MALLADA" (Instituto "Lucas Mallada", de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 pta.; extranjero, 80 pta. Número: España, 60 pta.; extranjero, 70 pta.
- ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto "Lucas Mallada", de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 pta.; extranjero, 200 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 60 pta.
- FARMACOGNOSIA (Instituto "José Celestino Mutis", de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 80 pta.; extranjero, 120 pta. Número: España, 25 pta.; extranjero, 40 pta.
- GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis", de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 70 pta.; extranjero, 110 pta. Número: España, 20 pta.; extranjero, 30 pta.
- PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 150 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 60 pta.



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. Eduardo Gallardo Martínez, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

	Páginas
Estudios sobre el metabolismo enzimático del <i>Streptomyces griseus</i> . III. Actividad fosfatásica, por Ramón Otero Abalo y Benito Regueiro Varela	225
Estudios sobre el metabolismo enzimático del <i>Streptomyces griseus</i> . IV. Actividad lipásica, por Ramón Otero Abalo y Benito Regueiro Varela	241
Estudio de la acción de varios compuestos de amonio cuaternario frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Este y Oeste (conclusión), por Emilio Ronda Lain	257
Estudio comparativo de diversas cepas de virus vacunal cultivadas sobre células HeLa (conclusión), por Carmen Gil, Angel P. García-Gancedo, M. ^a Luisa Alonso y Eduardo Gallardo	311
Estudios sobre la debariocidina. I. Acción <i>in vitro</i> sobre levaduras aisladas de enfermos tratados con antibióticos, por Julio Pérez Silva y Rosario Gil Alvarez	323
El Premio "Francisco Franco", de Ciencias	327

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

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO ENZIMATICO DEL *STREPTOMYCES GRISEUS*

III. Actividad fosfatásica

POR
RAMON OTERO ABALO y BENITO REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

En trabajos anteriores, Otero y Regueiro (1 y 2) iniciaban el estudio del metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus* para demostrar la posible relación entre la producción de antibióticos, la nutrición y la biosíntesis de enzimas.

En los mencionados trabajos se estudiaba la actividad α -glucosidásica y α -manosidásica exocelular e intracelular del *Streptomyces griseus*, así como la influencia de diferentes factores en el contenido en dichas enzimas. En el presente trabajo se estudia la actividad fosfatásica y factores que sobre dicha actividad tienen mayor acción.

Fosfatasas de microorganismos

La utilización o la producción de energía necesaria para el normal metabolismo de la célula, se acompaña siempre de reacciones en las que juega un papel importante el grupo fosfato. Las enzimas que intervienen en este proceso son muy diversas, pero de entre ellas nos interesan las fosfatasas.

Las fosfatasas son enzimas hidrolíticas que liberan fosfato inorgánico. Por el tipo de acción pueden hidrolizar: pirofosfatos, ésteres monofosfáticos, etc. La principal función de las fosfatasas es regular la con-

centración de fosfato inorgánico y lograr que la energía de los grupos fosfato pueda ser aprovechada por la célula o el microorganismo.

Según afirmaban Wekiman y Schlenk (3), las fosfatasas de tipo microbiano han recibido muy poca atención, aunque puedan existir en los microorganismos y de muy diferentes tipos.

Citron (4), por una parte, y Ennever y Warner (5), por otra, estudiaron la producción de fosfatasa alcalina por razas de *Actinomyces*, aunque desde un punto de vista cualitativo. También las estudiaron Nickerson y Ran Moham (6), los cuales encuentran su actividad óptima a un pH cercano a la neutralidad, realizando además estudios para observar el efecto de la nutrición en la producción de la enzima exocelular.

Howell y Fitzgerald (7) estudian la producción de fosfatasa ácida por especies de *Actinomyces*, demostrando por primera vez dicho tipo de actividad. Por otra parte, no son capaces de demostrar la presencia de actividad fosfatásica alcalina. Utilizan como sustrato el p-nitrofenilfosfato, la temperatura de 37° a 45° C. y el pH óptimo lo observan entre 3,0 y 3,5.

Estudiando Cochrane (8) el metabolismo de especies de *Streptomyces*, y en particular del *Streptomyces coelicolor*, encuentra alguna actividad de tipo fosfático, pero no estudia las fosfatasas en particular.

Barnes y Morris (9) estudian la actividad fosfatásica del *Micrococcus pyogenes* de forma cuantitativa, observando que la actividad fosfomonoesterásica depende de la concentración de sustrato, del tiempo de incubación, de la cantidad de células, del pH, edad del cultivo, etc. Utilizan como sustrato p-nitrofenilfosfato, encontrando que el óptimo de actividad de pH es a 5,6, es decir, fosfatasa ácida.

Como vemos, se han realizado en estos tiempos bastantes trabajos en relación con la actividad fosfatásica de los microorganismos; sin embargo, el más interesante para nosotros, dado el objetivo que perseguía, es el de Sadasivan (10), que estudió la actividad fosfatásica del *Penicillium chrysogenum* en su relación con la producción de penicilina.

Utiliza dicho autor como fuente de enzima, micelio desecado del hongo, y como sustrato β -glicerofosfato, de donde la enzima libera fósforo inorgánico que se determina. Observa que a 25° C. la máxima actividad ocurre a pH 8,7, no observándose, en cambio, actividad por el lado ácido. Diferentes razas producen diferentes cantidades de enzima, así como diferente cantidad de antibiótico.

El zinc es un metal necesario para el *Penicillium* en su asimilación de azúcares, y se observa que su adición hace aumentar el contenido en fosfatasa. Por esto, cuando se pierde actividad fosfatásica se puede recuperar ésta añadiendo zinc al medio de crecimiento, pero teniendo en cuenta que también el exceso de zinc puede producir un efecto contrario.

Durante el crecimiento del *Penicillium*, la actividad fosfatásica micelial sube hasta el cuarto día y luego se mantiene fija hasta el final, en que hay una brusca subida. La fosfatasa exocelular sube hasta el sexto día en 3 veces más cantidad que la anterior y después se mantiene hasta el final.

Estos son los más importantes estudios de fosfatasas de microorganismos realizados hasta la fecha y que nos dieron las principales orientaciones para el estudio de la fosfatasa del *Streptomyces griseus*.

MÉTODOS

Los métodos generales seguidos en este trabajo pueden revisarse en el primero de los autores en cuanto a la conservación, esporulación y fermentación del *Streptomyces griseus*, en medios natural y sintético, cuyas fórmulas son allí reseñadas.

Para la determinación de la actividad fosfatásica se utilizan como fuentes de enzima, micelio y filtrados de los caldos de fermentación. El micelio se emplea desecado en acetona.

Para determinar la actividad fosfatásica empleamos 10 mg. de micelio desecado ó 0,5 cm³ de filtrado, al que se añade 1 cm³ de β -glicerofosfato sódico al 10 por 100 y 5 cm³ de "buffer" de veronal. Se deja esta mezcla en baño a 25° C., durante tres horas. Al cabo de este tiempo se añade 1 cm³ de ácido sulfúrico N, se filtra por papel y en 1 cm³ del filtrado se determina el fósforo inorgánico liberado, por el método clásico de Fiske y Subbarow (11) y según puede verse en el libro de Gilck (12). Se completa el líquido a 5 cm³ con agua destilada, se añaden 10 cm³ de solución de molibdato amónico y 1 cm³ de reactivo reductor (ácido 1-amino-2-nafto-4-sulfónico (BDH) en solución de sulfito y bisulfito sódico). Se utilizan 3 tubos como testigos para fósforo micelial, fósforo de glicerofosfato y solución patrón de fósforo. El valor

del fósforo liberado por la enzima resulta de restar el valor de los dos primeros del valor del fósforo liberado en la prueba. Todos los valores se leen en colorímetro Kipp (filtro 66) y en cubeta, refiriéndolos a una curva patrón de fósforo.

RESULTADOS

A continuación se dan los resultados de las experiencias realizadas sobre la actividad fosfatásica del *Streptomyces griseus* y los factores que en ella influyen

a) Actividad fosfatásica *exo e intracelular* del *St. griseus*

En la figura 1 se expresa la actividad fosfatásica intracelular (micelio) del *St. griseus* crecido en medio natural y sintético, a diferentes

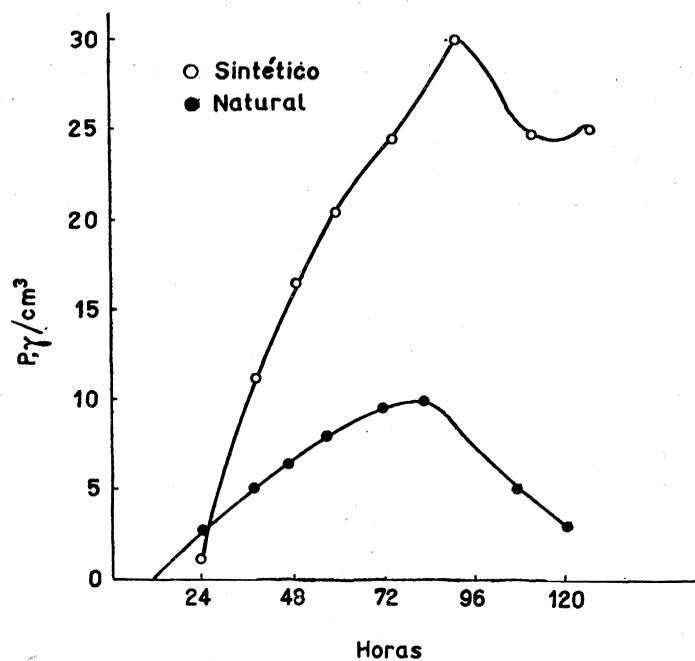


Figura 1

edades. Se observa en los dos casos un aumento de actividad fosfatásica durante las primeras noventa horas, para disminuir después hasta el fin de la fermentación. A su vez, se encuentra que en medio natural se produce mucha mayor cantidad que en el medio sintético.

A continuación se estudia la actividad fosfatásica del micelio y del filtrado del *St. griseus* en medio sintético, con cuyos resultados se construye la gráfica de la figura 2. Como se observa, hay una rápida produc-

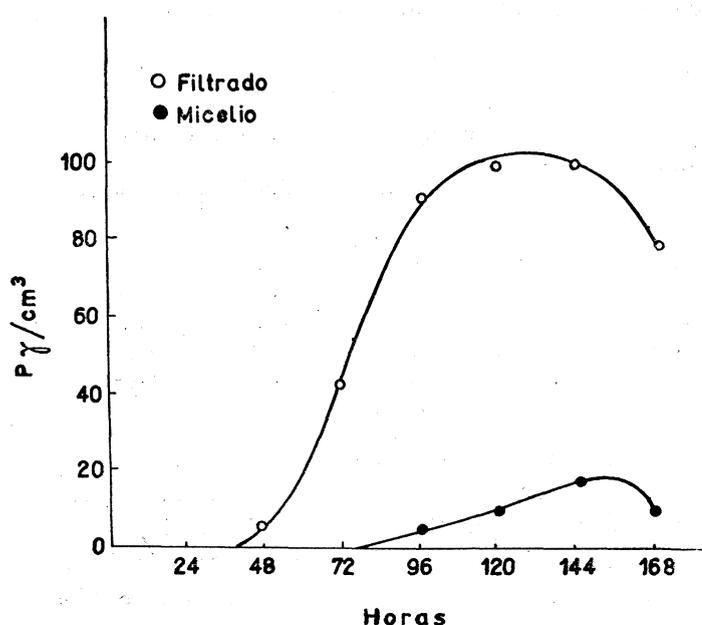


Figura 2

ción de enzima exocelular a partir de las cuarenta y ocho horas hasta las ciento veinte horas, disminuyendo después; en cambio, la enzima endocelular aparece más tarde y en mucha menor concentración.

Se hace un estudio comparativo de actividad enzimática del micelio del *St. griseus* de ciento cuarenta y cuatro horas de edad con diferentes substratos, y se encuentra que con glicerofosfato sódico al 10 por 100 se liberan 17,75 γ de fósforo inorgánico; con fenilfosfato sódico 0,025 M se liberan 3,00 γ, y con ribonucleato magnésico al 0,5 por 100 se liberan 2,25 γ.

b) *Influencia de la relación/enzima substrato en la actividad fosfatásica*

Determinamos la llamada constante de Michaelis, es decir, la cantidad de substrato necesaria para que la enzima dé más del 50 por 100 de su actividad. Experimentalmente se realiza con micelio de treinta y seis horas de edad (medio natural) y de ochenta y cuatro horas (medio sintético). Los resultados obtenidos, en el cuadro 1.

Cuadro 1

Substrato	Medio natural		Medio sintético	
	P/cm ³	Porcentaje	P/cm ³	Porcentaje
0,01	0,50	2,40	1,75	8,50
0,10	1,50	0,73	4,00	1,95
0,50	3,75	0,36	6,75	0,65
1,00	3,75	0,18	7,00	0,34
2,00	3,50	0,09	6,75	0,16

Al contrario que en las enzimas anteriormente estudiadas, aquí no se puede expresar correctamente la constante de Michaelis, pues siendo la actividad teórica el 100 por 100 aquí no se llega ni al 10 por 100. De todas maneras, llevados los resultados obtenidos a la figura 3, se observa concordancia de resultados en los dos casos estudiados.

c) *Influencia del pH en la actividad fosfatásica*

Estudiando el óptimo de pH a que actúa cada enzima, se estudia aquí el caso particular de la fosfatasa del *St. griseus*. Para los niveles de pH de 6,8 a 9,2 se utiliza un "buffer" de veronal sódico-ClH 0,2 M y para el nivel de 8,6 a 10,6 se utiliza un "buffer" de glicocola-NaOH, 0,2 M. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 4. Se utilizan micelios de treinta y seis horas (medio natural) y de ochenta y cuatro horas (medio sintético).

Observamos que el pH óptimo en ambos casos de fosfatasa intracelular es de 9,0; esto quiere decir que la fosfatasa estudiada es de tipo alcalino.

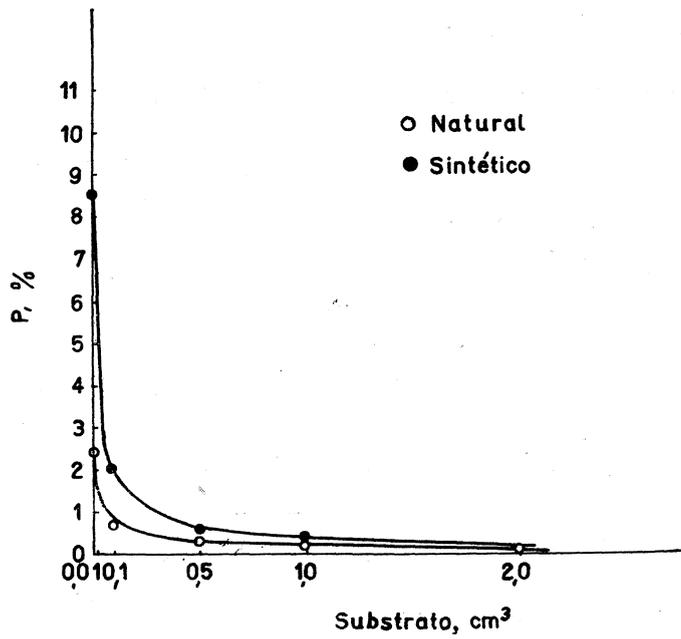


Figura 3

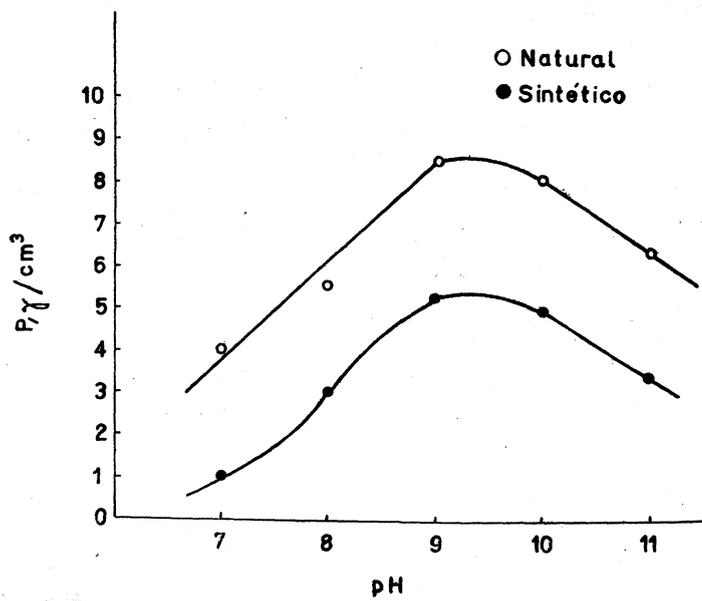


Figura 4

d) *Influencia de los iones metálicos en la actividad fosfatásica*

Los iones metálicos pueden influir en la actividad enzimática, activándola o inhibiéndola. Estudiamos aquí la influencia de magnesio, hierro, zinc y manganeso sobre la actividad fosfatásica intracelular del *St. griseus*.

Se sigue el método general de determinación de fosfatasa, con la sola diferencia de que a la mezcla de reacción se adicionan cantidades variables de los anteriores iones metálicos en forma de sulfatos. Los resultados obtenidos se dan en las figuras 5-8.

En todos los casos hemos empleado micelio de treinta y seis horas (medio natural) y de ochenta y cuatro horas (medio sintético).

El *magnesio* influye en la actividad fosfatásica del micelio del *St. griseus* crecido en medio natural o sintético. En el primer caso aumenta la actividad hasta 1×10^{-2} M, disminuyendo después rápidamente hasta caer un 50 por 100 con concentración 1 M. En el caso del micelio crecido en medio sintético hay un gran aumento de actividad hasta la concentración de 1×10^{-2} M, cayendo después rápidamente hasta un 50 por 100 con concentración 1 M.

El *hierro* influye en la actividad fosfatásica del micelio del *St. griseus* crecido en medio sintético, aumentando dicha actividad hasta 5 veces cuando se añade 1×10^{-1} M de hierro, cayendo después rápidamente hasta un 80 por 100 cuando se pone una concentración 1 M. En el caso de micelio crecido en medio natural, la influencia del hierro es muy débil, aunque al final cae algo la actividad enzimática cuando se añade una concentración 1 M.

El *zinc* influye en la actividad fosfatásica del micelio del *St. griseus* crecido en medio natural, aumentando su actividad hasta una concentración de 1×10^{-4} M y disminuyendo después la misma hasta un 90 por 100 a una concentración 1 M. En medio sintético no actúa el zinc hasta una concentración 1×10^{-3} M, a la que disminuye la potencia hasta un 50 por 100 a una concentración 1 M.

El *manganeso* no influye en la actividad fosfatásica del micelio del *St. griseus* crecido en medio natural, hasta una concentración de

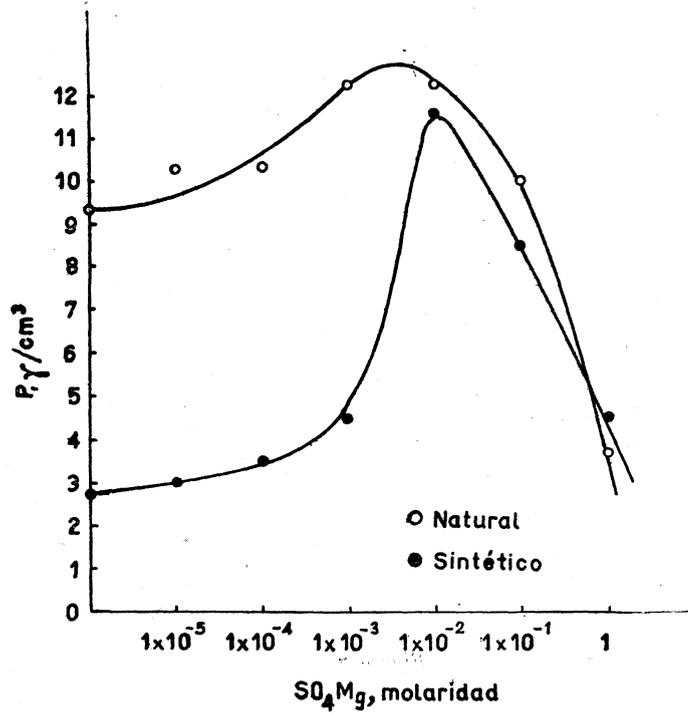


Figura 5

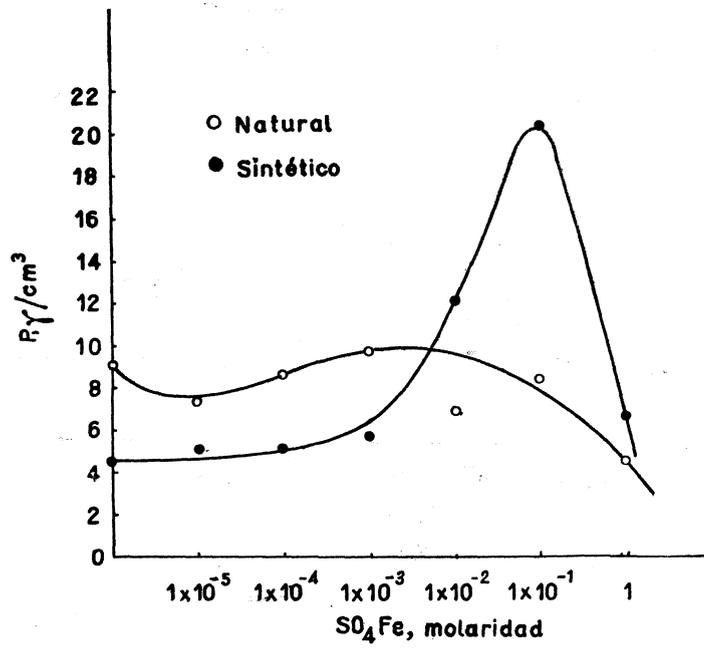


Figura 6

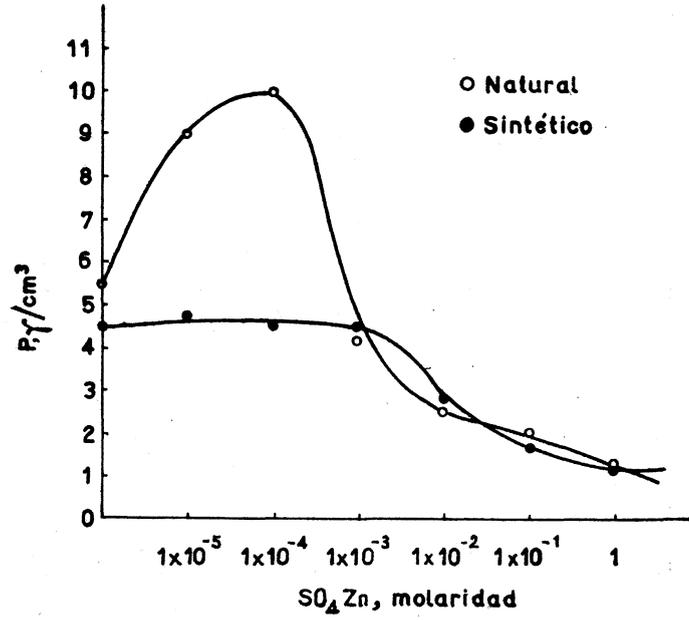


Figura 7

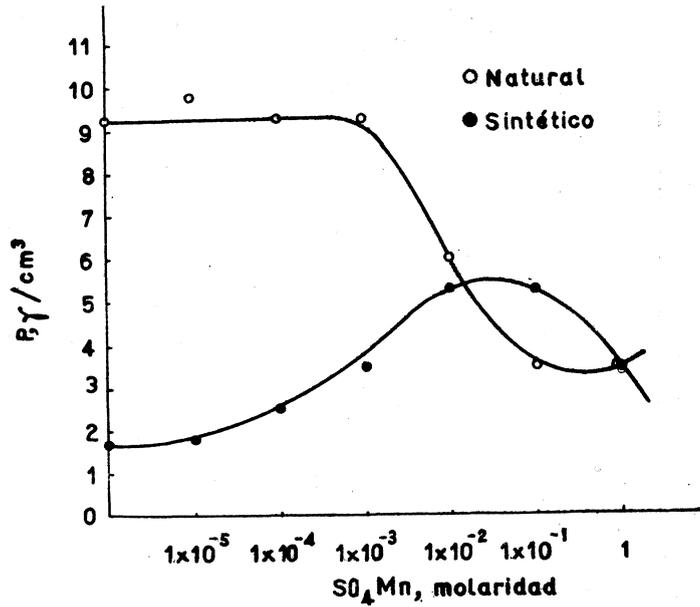


Figura 8

1×10^{-3} M, en que disminuye dicha actividad en un 65 por 100 a la concentración 1 M. Sobre la enzima del micelio crecido en medio sintético aumenta la actividad a medida que aumenta la concentración, hasta 1×10^{-2} M, disminuyendo después.

Las concentraciones mínimas de iones metálicos necesarias para disminuir la actividad fosfatásica, que se derivan de los resultados obtenidos, son las que se recogen en el cuadro 2.

Cuadro 2

Ion	Micelio (m. natural)	Micelio (m. sintético)
Magnesio	1×10^{-2} M	1×10^{-2} M
Hierro	1×10^{-1} M	1×10^{-1} M
Zinc	1×10^{-4} M	1×10^{-3} M
Manganeso	1×10^{-3} M	1×10^{-1} M

El zinc es el ión que más influye sobre la actividad fosfatásica intracelular del *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, siguiéndole el manganeso sobre la enzima del micelio crecido en medio natural.

e) *Influencia de los componentes del medio sintético en la actividad fosfatásica*

Esta parte de experiencias se realiza con los componentes del medio sintético necesarios para el crecimiento del *St. griseus*, usando el micelio como fuente de enzima. También se utiliza filtrado del medio para el estudio de la enzima exocelular. Tanto micelio como filtrado tienen doce días de fermentación. Los resultados obtenidos, en el cuadro 3.

Cuadro 3

Medio	Filtrado	Micelio
Normal	29,0	45,5
N - mitad de nitrato sódico	11,5	27,0
N - nitrato sódico... ..	28,0	32,7
N - mitad de "corn steep"... ..	12,0	72,2
N - "corn steep"	41,0	31,5
N - mitad de magnesio	61,5	31,7
N - mitad de hierro	88,5	40,7
N - mitad de manganeso	88,5	37,7

Se observa que la falta de la mitad de nitrato sódico o de "corn steep" reduce a más de la mitad la actividad fosfatásica exocelular del *St. griseus*, que en cambio es aumentada cuando se disminuye la cantidad de magnesio y, sobre todo, la de hierro y manganeso.

La acción de los componentes del medio sobre la enzima endocelular, también la disminución o falta de nitrato sódico, la falta de "corn steep" y la reducción de magnesio, hierro o manganeso reducen su actividad, que en cambio aumenta cuando se reduce la cantidad de "corn steep".

DISCUSION

Habiendo observado anteriormente que la biosíntesis de las enzimas α -glucosidasa y α -manosidasa varía según la composición del medio en que crece el *St. griseus*, se trata ahora de demostrar este mismo efecto sobre la enzima fosfatasa, tanto exo como endocelular. Esta enzima es muy importante en las células por tomar parte en el metabolismo de producción o utilización de energía.

Ha sido en la última década cuando el estudio de las fosfatasas de microorganismos ha recibido alguna atención. En este tiempo se estudiaron fosfatasas de bacterias (*Micrococcus pyogenes*), hongos (*Penicillium chrysogenum*) y *Actinomyces* (*Streptomyces coelicolor*). En es-

te último caso no hay acuerdo entre los autores sobre el tipo de fosfatasa (ácida o alcalina) producida.

La enzima fosfatasa intracelular empieza a producirse durante el crecimiento del micelio del hongo, hasta las noventa horas de edad, en que empieza a destruirse. Esta enzima no es de tipo adaptativo, pues se forma más en medio natural que en sintético, a pesar de que este medio contiene más fosfato. Estudiando la enzima producida en medio sintético se observa aquí que la fosfatasa producida es más bien de tipo endocelular, coincidiendo la edad de máxima producción hacia las ciento veinte horas, el aumento de fosfatasa exocelular viene a coincidir con el período de autólisis del micelio, que termina entre noventa y seis y ciento veinte horas, por lo que la afirmación de enzima exocelular debe de ponerse en duda.

La actividad enzimática de la fosfatasa es diferente según el sustrato utilizado. Así, comparando la actividad sobre glicerofosfato, fenilfosfato y ribonucleato se observa una mayor acción sobre el primero que sobre los demás.

En la actividad fosfatásica influyen, como en otras enzimas, varios factores. Aquí no se puede determinar la constante de Michaelis porque la actividad es muy baja en comparación con la teórica.

Es importante conocer el pH óptimo de actividad de la fosfatasa del *St. griseus*; nosotros encontramos que tanto la del micelio crecido en medio natural, como la del crecido en medio sintético, se encuentra en el tipo alcalino (9,0); esto parece estar en contradicción con algunos autores y de acuerdo con otros.

La presencia de iones metálicos influye en la actividad enzimática. Estudiamos la influencia de magnesio, hierro, zinc y manganeso en diferentes concentraciones sobre la actividad de la fosfatasa en el sustrato de glicerofosfato.

En general, las concentraciones mínimas de metales que influyen sobre la fosfatasa son las mismas para la producida por el micelio en medio natural y en medio sintético. Vienen a ser: 1×10^{-2} M para el magnesio, 1×10^{-1} M para el hierro y 1×10^{-3} M para el zinc; para el manganeso es de 1×10^{-3} M para la fosfatasa de micelio de medio natural y de 1×10^{-1} M para la de micelio de medio sintético. Se observa que únicamente el zinc y el manganeso (éste en medio natural) son los que más influyen en la actividad fosfatásica del *St. griseus*.

Por otra parte, si observamos la relación entre los componentes del medio de cultivo sintético y la actividad fosfatásica encontramos que hay diferencias, según se trate de la enzima exocelular o de la endocelular. Así, la disminución de nitrato sódico o de "corn steep" reduce la actividad, que aumenta sobre todo si disminuimos los metales: magnesio, hierro y manganeso. En la enzima endocelular sólo aumenta su actividad si reducimos la cantidad de "corn steep".

CONCLUSIONES

1.^a En el micelio del *St. griseus* se forma fosfatasa cuando crece en un medio natural o sintético y aumenta su contenido en el medio de cultivo cuando el micelio se autoliza.

2.^a El pH óptimo de actividad de la fosfatasa del *St. griseus* estudiada en micelios crecidos en medio natural o sintético, es de 9,0; lo que indica que estamos en presencia de una fosfatasa alcalina.

3.^a Las concentraciones mínimas a las que actúan algunos iones metálicos sobre la fosfatasa del *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, son las siguientes: 1×10^{-2} M para el magnesio, 1×10^{-1} M para el hierro y 1×10^{-3} M para el zinc; 1×10^{-3} M para el manganeso sobre la fosfatasa de medio natural, pues para la de medio sintético la concentración mínima de manganeso es de 1×10^{-1} M. A partir de estas concentraciones hay una rápida disminución de actividad enzimática.

4.^a Según la composición del medio de cultivo, se encuentran diferencias de actividad entre la fosfatasa producida en el micelio y la segregada en el medio de cultivo.

RESUMEN

En este trabajo se trata de establecer la relación entre la producción y los caracteres de una fosfatasa del *Streptomyces griseus* y la biosíntesis o degradación de la estreptomycinina.

Se observa que la fosfatasa endocelular se segrega en el medio después de la autólisis del micelio y que dicha fosfatasa es de tipo alcalino.

Se estudian los factores más importantes que tienen influencia en la actividad de la enzima: constante de Michaelis, pH óptimo y efecto de la concentración de algunos iones metálicos, tales como magnesio, zinc, hierro y manganeso.

SUMMARY

In the present paper we try to establish a relationship between the production and characters of phosphatase from *Streptomyces griseus* and the biosynthesis or degradation of streptomycin.

We observed that the micelium phosphatase is released in the medium after the autolysis and that phosphatase is of type alkaline.

The most important factors having influence on the activity of the enzyme are being studied, such as: their Michaelis's constant, the pH optimum and the effect of concentration of some metallic ions, such as: magnesium, zinc, iron and manganese.

BIBLIOGRAFIA

1. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1959. *Microbiol. Españ.*, 12, 1.
2. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1960. *Microbiol. Españ.*, 13, 15.
3. WERKMAN, C. H., y SCHLENK, F. 1951. *Bacterial Physiology*, 317.
4. CITRON, S. R. 1945. *J. Dental Res.*, 24, 87.
5. ENNEVER, J. J., y WARNER, B. W. 1952. *J. Dental Res.*, 31, 25.
6. NICKERSON, W. J., y RAN MOHAM, R. 1953. VI Congr. Intern. Microbiol. Roma. Symp. Actinomycetales.
7. HOWELL, A., y FITZGERALD, R. J. 1953. *J. Bacteriol.*, 66, 437.
8. COCHRANE, V. W. 1955. *J. Bacteriol.*, 69, 256.
9. BARNES, E. H., y MORRIS, J. F. 1957. *J. Bacteriol.*, 73, 100.
10. SADASIVAN, V. 1950. *Arch. Biochem.*, 28, 100.
11. FISKE, C. H., y SUBBAROW, Y. 1925. *J. Biol. Chem.*, 66, 375.
12. GLICK, D. 1956. *Methods of Biochemical Analysis*, III, I.

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

ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO ENZIMATICO DEL *STREPTOMYCES GRISEUS*

IV. Actividad lipásica

POR
RAMON OTERO ABALO y BENITO REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

En trabajos anteriores, Otero y Regueiro (1-3) estudiaban el metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus*, con objeto de afirmar las interrelaciones entre la producción de antibióticos, la composición del medio de cultivo y la biosíntesis de enzimas.

Estudiadas las actividades: α -glucosidásica, α -manosidásica y fosfatásica exocelulares e intracelulares (filtrado y micelio) del *Streptomyces griseus*, así como la influencia de varios factores sobre las anteriores actividades enzimáticas, corresponde estudiar en el presente trabajo la actividad lipásica y factores que sobre ella tienen una mayor acción.

Lipasas de microorganismos

La lipasa es una enzima hidrolítica que, actuando sobre las grasas deja en libertad los ácidos grasos, que son asimilados por los microorganismos. Por esta razón, tiene importancia en el metabolismo general de las bacterias, y algunos trabajos se han realizado sobre este tema.

Goodman (4) estudia la lipasa producida por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, encontrando que dicha enzima es de tipo adaptativo en estos hongos, es decir, que sólo aparece respondiendo a la presencia de grasas en el medio.

Nelson (5) estudia una lipasa producida por el hongo *Geotrichum candidum*, observando la influencia de los componentes del medio en la producción de la misma. En su estudio encuentra que la adición de grasas naturales o sintéticas al medio no aumenta la producción de lipasa, lo que demuestra, al contrario del autor anterior, que esta lipasa es de tipo constitutivo. Su pH óptimo está a 6,0 y la curva de producción de lipasa es similar a la curva de crecimiento de este hongo.

Peters y Nelson (6) estudian también la lipasa de la *Candida lipolytica*, encontrando que dicha enzima se puede producir en un medio sintético, pero en presencia de tiamina o de 2-metil-5-bromoetil-6-aminopirimidina, pero no en ausencia de estos factores. También encuentran que la adición de más de 200 γ /l. de tiamina no aumenta la actividad lipásica.

Otro trabajo interesante es el de Cutchins, Doetsch y Pelczar (7), quienes estudian la influencia de la composición de los medios de cultivo en la producción de lipasa. Creen estos autores que la lipasa es de tipo adaptativo y que, por lo tanto, su producción se estimula por la presencia de substratos específicos. Esto es contrario a lo que decían los autores anteriores. Claro que algunas diferencias pueden ser debidas a los métodos utilizados en la determinación de la actividad enzimática, o también a diferencias en la cantidad de componentes del medio. Utilizando el *Pseudomonas fluorescens*, se observa que la fuente de carbono o de nitrógeno puede afectar a los resultados de producción de lipasa, sobre la cual se observa también influencia de las vitaminas. En general, afirman que cuanto más sencilla es la fuente de nitrógeno, más aumenta la actividad enzimática.

Davies (8) estudia una lipasa producida por bacterias del género *Staphylococcus*, encontrando que dicho germen produce lipasa exocelular, endocelular o ambos tipos. El pH óptimo es de 8,0.

Importante es el trabajo de Stern, Ordal y Halvorson (9) que estudian la producción de lipasa por el hongo *Mucor mucedo*, observando la influencia de factores que pueden afectar a la producción de lipasa en las condiciones en que ellos trabajan. Ven que dicha producción puede suprimirse por una fuerte aireación y que el mejor estimulante de la misma es el aceite de soja. La temperatura óptima de producción es de 38° C. y el pH óptimo de 6,28, siendo el tiempo de máxima producción a los nueve días.

Otros trabajos se han realizado sobre la producción de lipasas por diferentes microorganismos y sobre factores que en su actividad influyen, pero para el objeto de nuestro trabajo, los reseñados son los que dan una mayor información.

MÉTODOS

Los métodos generales de este trabajo son los consignados en el primer trabajo de los autores sobre metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus*, en cuanto a lo conservación, esporulación y fermentación de este microorganismo.

Para la determinación de la actividad lipásica se utilizan como fuentes de enzima, micelio y filtrados de los caldos de fermentación. El micelio se emplea desecado en acetona-éter. Las cantidades a utilizar son 100 mg. de micelio desecado ó 1 cm³ de filtrado.

La técnica es la siguiente: en un matraz de 100 cm³ se pone la enzima (micelio o filtrado) y se añade 0,5 cm³ de substrato (0,5175 g. de tributirina), 1 cm³ de formaldehído al 1/1500 y 8,5 cm³ de fosfato "buffer". Se deja veinticuatro horas a 28° C. en agitación.

Al cabo de este tiempo se añaden al matraz 50 cm³ de etanol-éter (1:1) y en esta mezcla se valoran los ácidos grasos libres con potasa 0,05 N en metanol, usando fenolftaleína como indicador.

El resultado se expresa en *número de ácido*, es decir, miligramos de potasa necesarios para neutralizar los ácidos grasos liberados de 1 g. de substrato.

En las determinaciones utilizamos testigos con los componentes anteriores, pero en los cuales el micelio o el filtrado (enzima) se ha calentado a 100° C. durante quince minutos para inactivarlo. El valor obtenido en el primer caso se resta del testigo.

RESULTADOS

A continuación se dan los resultados de las experiencias realizadas sobre la actividad lipásica del *Streptomyces griseus* y los factores que en ella influyen.

a) *Actividad lipásica exo e intracelular del St. griseus*

En la figura 1 se expresa la actividad lipásica intracelular (micelio) del *St. griseus* crecido en medios natural y sintético a diferentes edades.

En los dos casos se observa un aumento rápido de enzima a partir de las veinticuatro horas; en el medio natural este aumento se mantiene durante toda la fermentación, pero en el sintético cesa a las noventa horas.

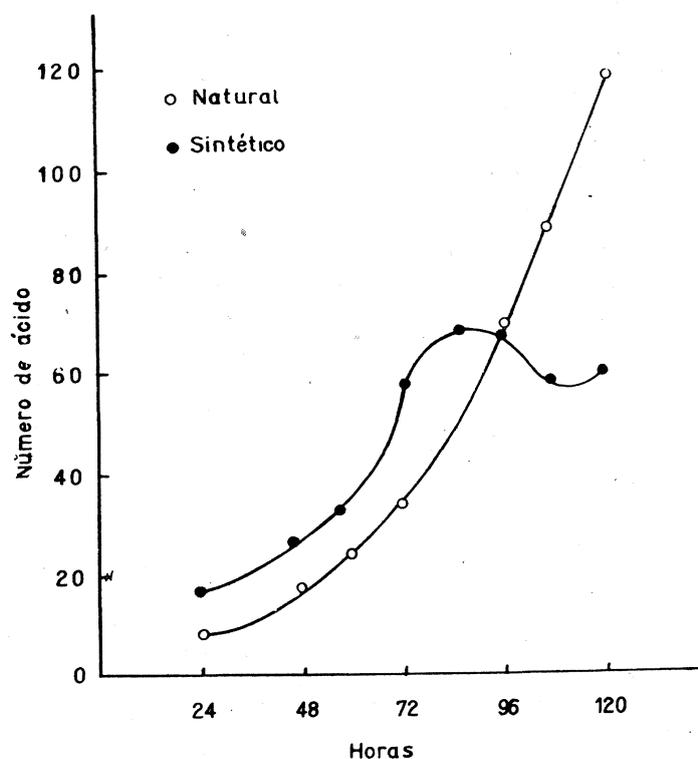


Figura 1

En la figura 2 se expresa la actividad lipásica exocelular (filtrado) del *St. griseus* crecido en medio sintético a diferentes edades, observando que la enzima aumenta a partir de las veinticuatro horas hasta

las ciento veinte horas, manteniéndose después al mismo nivel. La cantidad producida en el medio sintético es menor que la producida en el micelio.

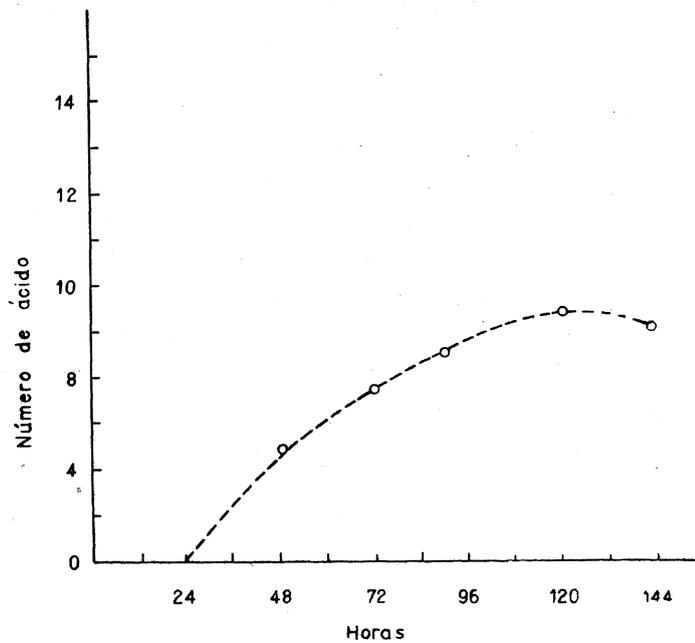


Figura 2

b) *Influencia de la relación enzima/substrato en la actividad lipásica*

Determinamos la llamada constante de Michaelis, es decir, la cantidad de substrato necesaria para que la enzima dé más del 50 por 100 de su actividad. Experimentalmente, lo realizamos con micelio de ochenta y cuatro horas de edad (medios natural y sintético). Los resultados obtenidos, en el cuadro 1.

Cuadro 1

Substrato	Medio natural		Medio sintético	
	Núm. de ácido	Porcentaje	Núm. de ácido	Porcentaje
0,1 cm ³	281,22	50,5	209,11	37,5
0,3 cm ³	105,70	19,0	96,74	17,3
0,5 cm ³	63,45	11,4	61,65	11,0
1,0 cm ³	34,25	6,1	30,82	5,5
2,0 cm ³	16,13	2,9	6,22	2,9

En todos los casos, el número de ácido teórico es de 556,7. Estos resultados son expresados en la figura 3, por la cual se encuentra que la constante de Michaelis de la lipasa del *St. griseus*, crecido en medio natural, corresponde a 0,1 cm³ de substrato, cantidad a la que no se llega con la enzima del *St. griseus* crecido en medio sintético.

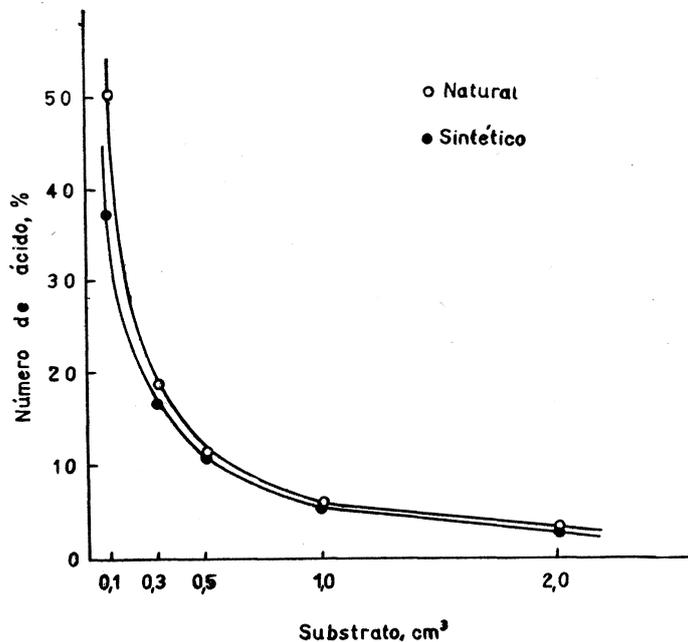


Figura 3

c) Influencia del pH en la actividad lipásica

Estudiamos el pH óptimo de actividad de la lipasa del *St. griseus* crecido en medio natural o sintético. Para los niveles de pH entre 6,0 y 8,0 utilizamos fosfato "buffer" y para pH 9,0 se emplea "buffer" de glicocola. Utilizamos micelios de ochenta y cuatro horas de edad en los dos casos. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 4.

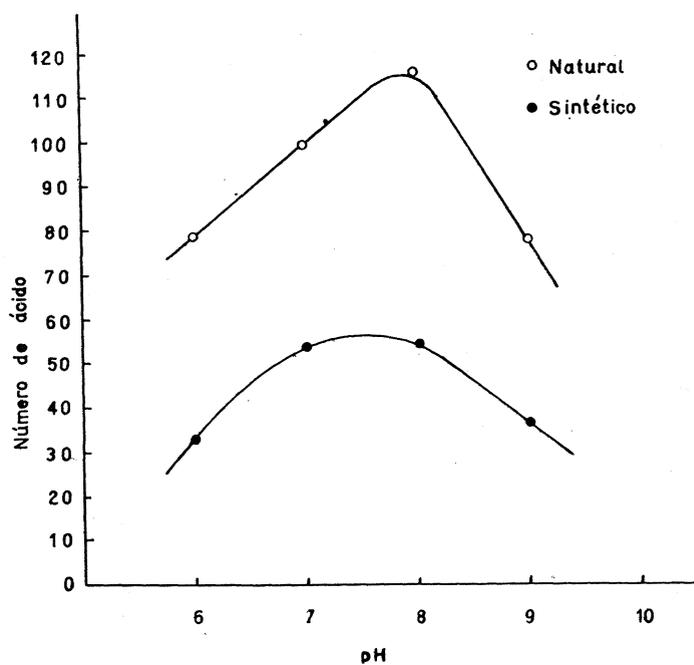


Figura 4

De esta última se deduce que el pH óptimo de la lipasa de *St. griseus* crecido en medio natural o sintético está aproximadamente entre 7,5 y 8,0, bajando la actividad por fuera de este nivel. Por otra parte, la actividad del micelio procedente del medio sintético es sensiblemente menor que el procedente del medio natural.

d) Influencia de los iones metálicos en la actividad lipásica

Sabemos que los elementos traza o iones metálicos influyen en la actividad enzimática, aumentándola o inhibiéndola. Estudiamos en este apartado la influencia del magnesio, hierro, zinc y manganeso sobre la actividad lipásica intracelular (micelio) del *St. griseus*. En todos los casos, los micelios son de ochenta y cuatro horas de edad.

Se sigue el método general de determinación de lipasa, con la sola diferencia de que a las mezclas de reacción se les adicionan cantidades variables de los iones metálicos en forma de sulfatos. Los resultados se dan en las figuras 5-8.

El *magnesio* no influye en la actividad lipásica intracelular del *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, hasta una concentración mayor de 1×10^{-1} M, en que disminuye la actividad lipásica del micelio crecido en medio natural y aumenta la del micelio crecido en medio sintético. En ambos casos, aumento y disminución son muy pequeños.

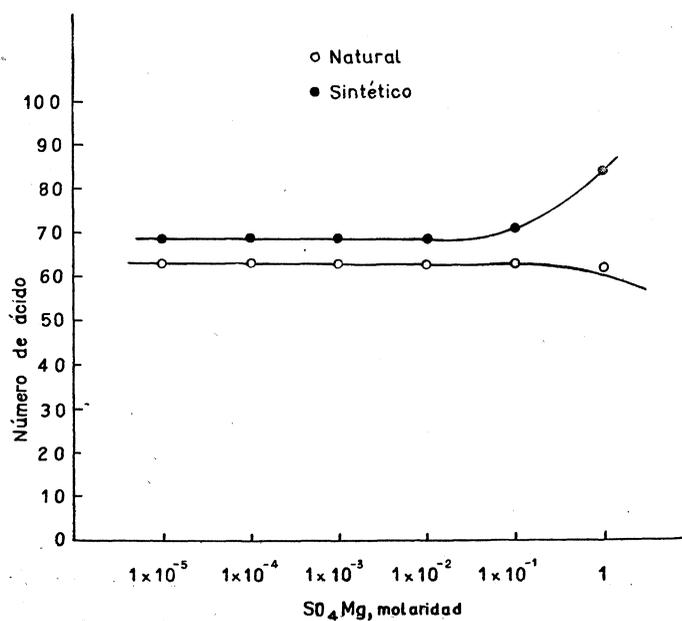


Figura 5

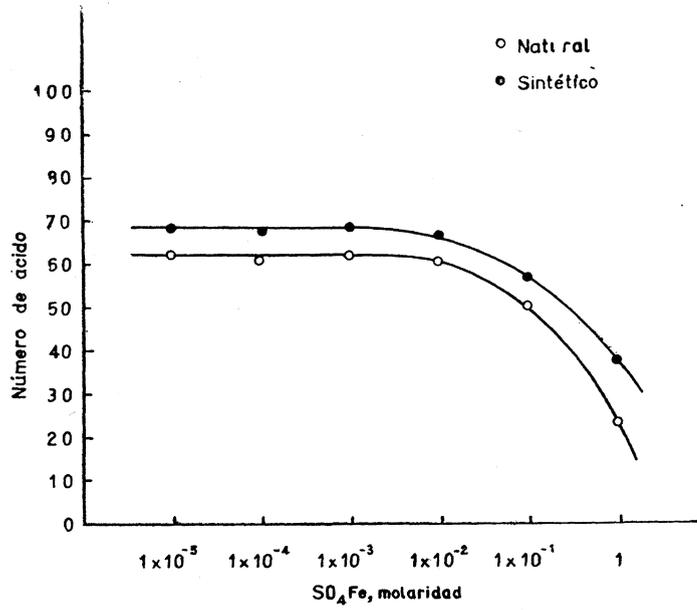


Figura 6

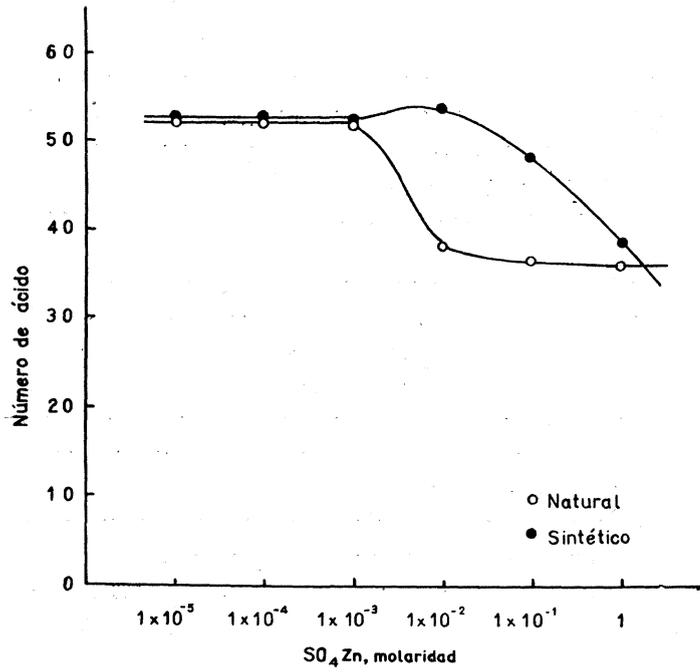


Figura 7

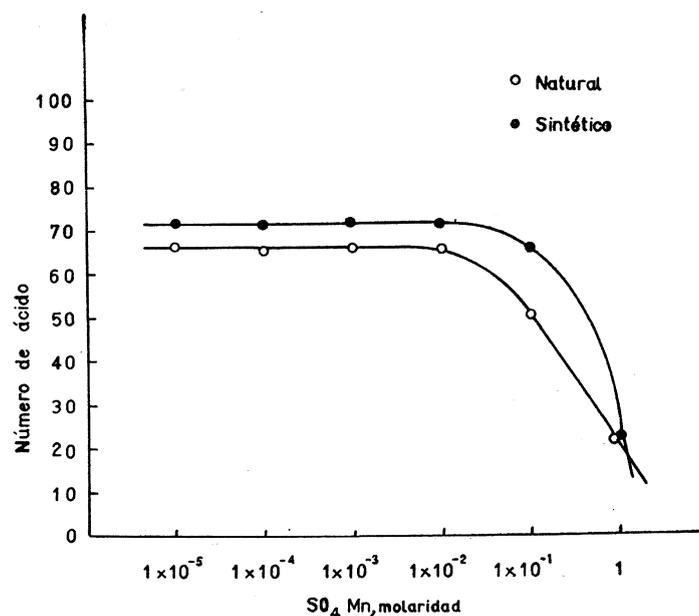


Figura 8

El *hierro* influye sobre la actividad lipásica del micelio de *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, a partir de una concentración de 1×10^{-2} M, en que disminuye un 30 por 100 la actividad de la enzima procedente del micelio crecido en medio natural y un 50 por 100 la del crecido en medio sintético, cuando en ambos casos se añade hierro en concentración 1 M.

El *zinc* no influye en la actividad lipásica del micelio de *St. griseus* crecido en medio natural, hasta una concentración 1×10^{-3} M, en que disminuye un 20 por 100 hasta la concentración 1×10^{-2} M, sin que luego tenga efecto mayor concentración de zinc. En el caso de la enzima procedente de micelio crecido en medio sintético, disminuye la actividad a partir de una concentración 1×10^{-2} M, siendo esta disminución de un 30 por 100 cuando la concentración sube a 1 M.

El *manganeso* influye sobre la actividad lipásica del micelio de *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, a partir de una concentración de 1×10^{-2} M, siendo esta disminución de un 70 por 100 cuando la concentración es 1 M.

Resumiendo: las concentraciones mínimas de iones metálicos, necesarias para disminuir la actividad lipásica intracelular del *St. griseus*, se recogen en el cuadro 2.

Cuadro 2

	Micelio (m. natural)	Micelio (m. sintético)
Magnesio	1×10^{-1} M	1×10^{-1} M (aquí aumenta la actividad)
Hierro	1×10^{-2} M	1×10^{-2} M
Zinc	1×10^{-3} M	1×10^{-2} M
Manganeso	1×10^{-2} M	1×10^{-2} M

Observamos que el zinc es el metal que mayor influencia posee sobre la actividad lipásica intracelular del *St. griseus*, siendo menor la actividad del manganeso y hierro y, sobre todo, la del magnesio.

e) *Influencia de los componentes del medio sintético en la actividad lipásica*

Se comprende que estos componentes son los necesarios para el crecimiento del *St. griseus* en medio sintético. Se utilizan micelio desecado (enzima intracelular) y filtrado (enzima exocelular) de doce días de edad. Los resultados obtenidos se recogen en el cuadro 3.

Cuadro 3

Medio	Filtrado	Micelio
Normal	0,0	0,0
N - mitad de nitrato sódico ...	0,0	0,5
N - nitrato sódico	1,5	
N - mitad de "corn steep"		0,0
N - "corn steep"	0,0	7,5
N - mitad de magnesio	0,0	0,0
N - mitad de hierro	45,5	53,5
N - mitad de manganeso	10,5	53,0

En las condiciones de trabajo que se desarrollan, no se observa actividad lipásica exo e intracelular del *St. griseus* en medio sintético. En todos los casos hay un ligero aumento de actividad si se suprime el nitrato sódico (exocelular) y el "corn steep" (intracelular).

Cuando se disminuye el hierro hay un aumento grande en las enzimas exo y endocelular, y si se reduce el manganeso hay un aumento grande de enzima endocelular y ligero de enzima exocelular.

DISCUSION

De trabajos anteriores se deduce que la composición del medio en que se desarrolla el *St. griseus* influye sobre la biosíntesis enzimática; esto se observó con las enzimas α -glucosidasa, α -manosidasa y fosfatasa. En el presente trabajo se trata de demostrar lo mismo con la enzima lipasa. Esta es importante porque juega un gran papel en el metabolismo de las grasas por los microorganismos.

En la bibliografía pueden encontrarse referencias de trabajos sobre lipasas de hongos, levaduras y bacterias. Existen divergencias entre algunos autores con referencia a si la lipasa es enzima constitutiva o adaptativa; claro que estas diferencias pueden ser debidas a técnicas de trabajo empleadas. La lipasa bacteriana puede ser exocelular o endocelular, pues de ambos tipos han sido estudiadas. Existen también diferencias entre los autores con relación al pH óptimo: algunos lo fijan en 6,0 y otros en 8,0. No se encuentran referencias sobre la actividad lipásica de los *Streptomyces*, la cual es interesante, sobre todo, teniendo en cuenta la gran cantidad de ellos utilizados hoy en la producción de antibióticos y sabiendo que en los medios utilizados con tal finalidad se añaden aceites antiespumantes, sobre los que pueden actuar las enzimas del tipo de la lipasa.

La lipasa del *St. griseus*, tanto exocelular como intracelular, empieza a producirse a partir de las veinticuatro horas, es decir, durante la fase de crecimiento logarítmico del hongo. En medio sintético se produce menos que en medio natural, aunque en los dos casos se añade aceite anti-espuma. Esto también parece que está en contraposición con la afirmación de Cutchins, Doetsch y Pelczar (7) de que cuanto más sencilla es la fuente de nitrógeno, más aumenta la actividad lipásica.

Cuando se estudia la influencia de varios factores sobre la actividad lipásica intracelular (micelio) del *St. griseus* creciendo en medio natural o sintético, se encuentran ciertas diferencias.

La constante de Michaelis se encuentra con 0,1 cm³ de sustrato para enzima producida en medio natural, pero a esta cantidad no se llega con la enzima producida en el medio sintético, que, por lo tanto, para la misma unidad de peso, se considera de menor actividad.

El pH óptimo de la lipasa del *St. griseus* se encuentra entre 7,5 y 8,0, es decir, actúa mejor del lado alcalino. Esto está de acuerdo con el trabajo de Davies (8), pero no con los de Nelson (5) y Stern, Ordal y Halvorson (9).

Está poco estudiada la influencia de los elementos traza o iones metálicos sobre la actividad lipásica. Nosotros estudiamos la influencia del magnesio, hierro, zinc y manganeso sobre la lipasa intracelular del *St. griseus*.

En general, las concentraciones mínimas de metales que influyen sobre la lipasa son las mismas para la producida por el micelio crecido en medio natural que en medio sintético. Vienen a ser: 1×10^{-1} M para el magnesio, 1×10^{-2} M para el hierro, 1×10^{-3} M para el zinc y 1×10^{-2} M para el manganeso. El zinc, sobre todo, puede ser considerado como el metal de más influencia en la actividad lipásica del *St. griseus*, como también lo fue sobre las enzimas estudiadas anteriormente.

Por otro lado, si observamos la relación entre los componentes del medio de cultivo sintético del *St. griseus* y la actividad lipásica, no encontramos diferencias muy grandes entre la enzima exocelular y la intracelular. El efecto más importante encontrado fue que la reducción del hierro y manganeso hace aumentar de forma considerable la actividad lipásica del *St. griseus*, tanto exocelular como intracelular, aunque la disminución de manganeso afecta menos a la lipasa exocelular.

CONCLUSIONES

1.^a El *St. griseus*, cuando crece en un medio natural o sintético, a partir de las veinticuatro horas, produce lipasa endocelular y una pequeña cantidad de lipasa exocelular.

2.^a El pH óptimo de actividad lipásica del *St. griseus*, crecido en medio natural o sintético, está entre 7,5 y 8,0.

3.^a Las concentraciones mínimas a las que actúan algunos iones metálicos sobre la lipasa del *St. griseus* crecido en medio natural o sintético, son las siguientes: 1×10^{-1} M para el magnesio, 1×10^{-2} M para el hierro, 1×10^{-3} M para el zinc y 1×10^{-2} M para el manganeso. A partir de estas concentraciones disminuye la actividad enzimática, a excepción del magnesio, en el caso de la enzima procedente del micelio crecido en medio sintético.

4.^a La disminución de hierro o manganeso en el medio sintético de crecimiento del *St. griseus*, hace aumentar de manera considerable la actividad lipásica, tanto endocelular como exocelular, pero sobre todo la primera.

RESUMEN

En el presente trabajo se trata de establecer la relación entre la producción y los caracteres de una lipasa del *Streptomyces griseus* y la biosíntesis o degradación de la estreptomycinina.

Se observa que el micelio forma lipasa a partir de las veinticuatro horas y que el pH óptimo de esta lipasa es de 7,5 a 8,0. Cuando en el medio sintético disminuye la concentración de hierro o manganeso, aumenta en gran manera la cantidad de lipasa.

Se estudian los factores más importantes que tienen influencia en la actividad de la enzima: constante de Michaelis, pH óptimo y el efecto de la concentración de algunos iones metálicos, como magnesio, zinc, hierro y manganeso.

SUMMARY

In the present paper we try to establish a relationship between the production and characters of lipase from the *Streptomyces griseus* and the biosynthesis or degradation of streptomycin.

We have observed that the micelium form lipase since 24 hours and that de optimun pH of this lipase it is 7,5-8,0. When in the synthetic medium decrease the concentration of iron or manganese, increase very much the quantity of lipase.

The most important factors having influence on the activity of the enzyme are being studied, such as: their Michaelis's constant, the pH optimum, and the effect of concentrations of some metallic ions, such as: magnesium, zinc, iron and manganese.

BIBLIOGRAFIA

1. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1959. Microbiol. Españ., 12, 1.
2. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1960. Microbiol. Españ., 13, 15.
3. OTERO, R., y REGUEIRO, B. 1960. Microbiol. Españ., 13, 225.
4. GOODMAN, J. J. 1950. Science, 112, 176.
5. NELSON, W. O. 1951. Bact. Proc., 65.
6. PETERS, I. I., y NELSON, F. E. 1951. J. Bacteriol., 61, 501.
7. CATCHINS, E. C.; DOETSCH, R. N., y PELCZAR (Jr.), M. J. 1952. J. Bacteriol., 63, 269.
8. DAVIES, M. E. 1954. J. Gen. Microbiol., 11, 37.
9. STERN, A. M.; ORDAL, Z. J., y HALVORSON, H. O. 1954. J. Bacteriol., 68, 24.

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

ESTUDIO DE LA ACCION DE VARIOS COMPUESTOS
DE AMONIO CUATERNARIO FRENTE A
LOS VIRUS VACUNAL Y ENCEFALITICOS
EQUINOS ESTE Y OESTE

(Conclusión)

POR
EMILIO RONDA LAIN

*Experimentos de contacto entre el virus vacunal y las
substancias ensayadas*

Para los experimentos con este virus y los compuestos de amonio hemos utilizado una ampolla de liofilizado de pulpa vacunal por cada una de las diluciones de la substancia a comprobar.

A partir de la solución patrón de cada sal hicimos la serie de diluciones necesaria, cuyos límites ya habíamos fijado en nuestras determinaciones de toxicidad. De cada una de estas diluciones se tomó 1 cm.³ que se añadió a otras tantas ampollas de liofilizado al 1/10, con lo cual obtuvimos una mezcla de virus vacunal (que es siempre del mismo título, por proceder de un mismo lote del virus liofilizado) y del compuesto en estudio, a la dilución deseada. Otra ampolla de liofilizado se utilizó como testigo de virus, rehidratándola con 1 cm.³ de agua destilada estéril.

Una vez preparadas las mezclas a inocular, se dejaron en reposo y a la oscuridad a la temperatura de 20° C. A los veinte minutos de efectuada la mezcla se llevó a cabo la primera serie de inoculaciones, comenzando siempre por el testigo de virus y siguiendo por las concen-

traciones más bajas del antiséptico, que se inocularon a partir de la zona más cercana a la cabeza del animal y aumentando estas concentraciones a medida que nos acercábamos al tercio posterior.

En las inoculaciones hemos colocado siempre al animal de manera que tuviese la cabeza dirigida hacia nuestra derecha, con lo cual hemos logrado una unificación en la topografía de las lesiones, precaución que nos resultó muy útil en el estudio y lectura de los resultados.

Pasada una hora de la preparación de la mezcla se llevó a cabo la segunda serie de inoculaciones, siguiendo la misma marcha; a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de la preparación de la mezcla sal de amonio-virus vacunal, se efectuaron la tercera y cuarta, respectivamente, series de inoculaciones con las mismas precauciones, efectuándose la lectura de los resultados el quinto día a partir de la inoculación.

Los resultados se irán detallando por separado a continuación, indicando para cada substancia las diluciones y las características de la lesión (medidas de eritema, nódulo y necrosis) producida por el virus tratado.

Bromuro de tetra-metil-amonio

A partir de la solución madre de esta sal, se preparó en solución salina estéril la serie de diluciones 1/100, 1/200, 1/300, 1/500, 1/700, 1/1.000 y 1/2.000.

De cada una de estas diluciones se añadió 1 cm³ a igual número de ampollas de liofilizado de virus vacunal. Se preparó el testigo de virus añadiendo 1 cm³ de agua destilada estéril a otra ampolla de liofilizado y se conservaron todas ellas a temperatura ambiente de laboratorio y en oscuridad.

Se efectuaron inoculaciones intradérmicas de 0,2 cm³ en dorso de conejo a los veinte minutos, una hora, veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas de la preparación de las mezclas. Los resultados se reflejan en las figuras 6-13.

Cloruro de bencil-trimetil-amonio

Se preparó la serie de diluciones de esta sal al 1/100, 1/200, 1/300, 1/500, 1/700, 1/1.000 y 1/2.000 en solución salina estéril.

A cada una de 7 ampollas de liofilizado se añadió 1 cm³ de un término de esta serie de diluciones. Se preparó el testigo de virus por adición de 1 cm³ de agua destilada estéril a una ampolla de liofilizado.

La conservación de las mezclas y marcha de las inoculaciones se efectuaron según se explicó para el compuesto anterior. Véanse las figuras 14-21.

Cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio

Hicimos la serie de diluciones de esta sal en solución salina estéril, al 1/1.000, 1/2.000, 1/3.000, 1/5.000, 1/7.000, 1/10.000 y 1/20.000.

Se añadió 1 cm³ de cada una de estas diluciones a cada una de 7 ampollas de liofilizado de virus. Se preparó un testigo de virus añadiendo 1 cm³ de agua destilada estéril a otra ampolla.

La marcha seguida para la inoculación y los tiempos en que se efectuó son los mismos que los estudiados para los compuestos anteriores. Véanse las figuras 22-33.

Cloruro de cetil-trimetil-amonio

A partir de la solución madre de este compuesto y en solución salina estéril se preparó una serie de diluciones al 1/1.000, 1/2.000, 1/3.000, 1/5.000, 1/7.000, 1/10.000 y 1/20.000.

Se rehidrató una ampolla de liofilizado con 1 cm³ de agua destilada estéril, para utilización como testigo de virus.

La marcha seguida para la conservación de las mezclas y tiempos de inoculación es la misma que la estudiada para los compuestos anteriores. Véanse las figuras 34-45.

Bromuro de tetra-etil-amonio

Se preparó la serie de diluciones de esta sal al 1/100, 1/200, 1/300, 1/500, 1/700, 1/1.000 y 1/2.000 en solución salina estéril.

A cada una de 7 ampollas de liofilizado se añadió 1 cm³ de un término de esta serie de diluciones. Se preparó el testigo de virus por adición de 1 cm³ de agua destilada estéril a una ampolla de liofilizado.

La conservación de las mezclas y marcha de las inoculaciones se efectuaron según se explicó para el compuesto anterior. Véanse las figuras 46-53.

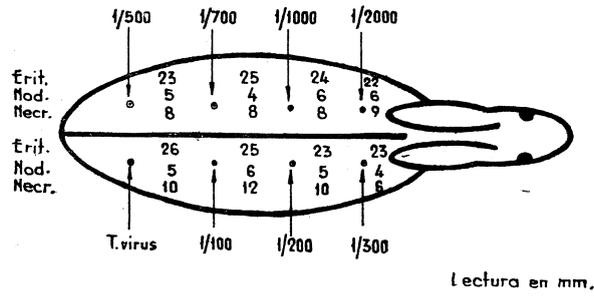


Figura 6. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (20 min.)

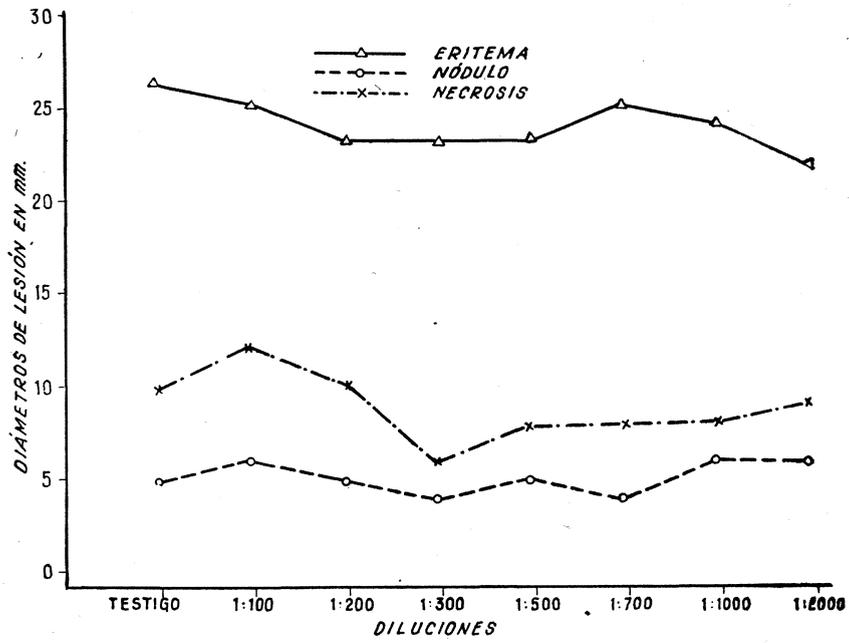


Figura 7. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (20 min.)

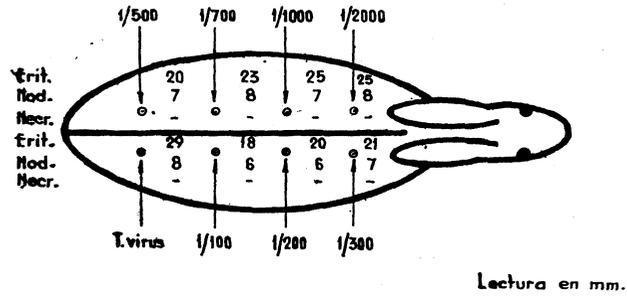


Figura 8. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (1 h.)

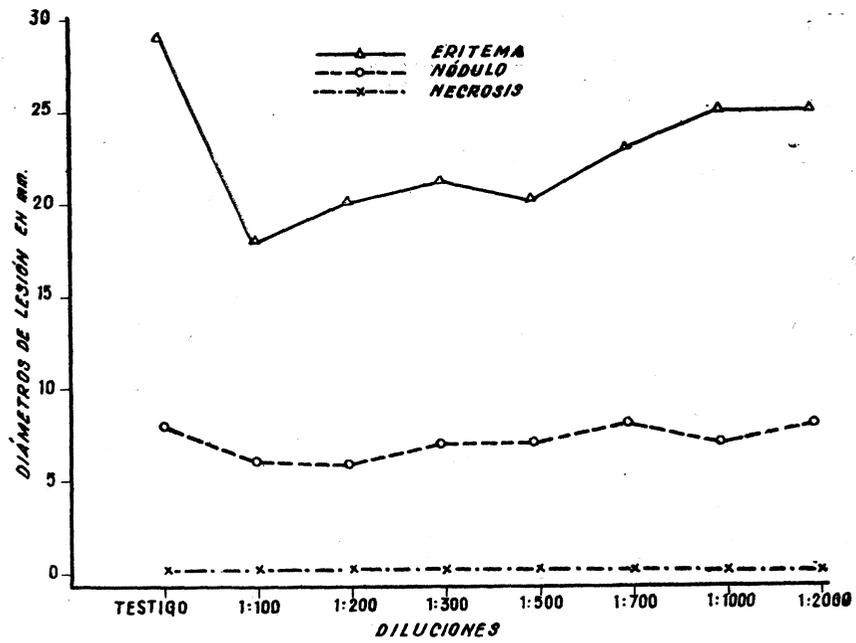


Figura 9. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (1 h.)

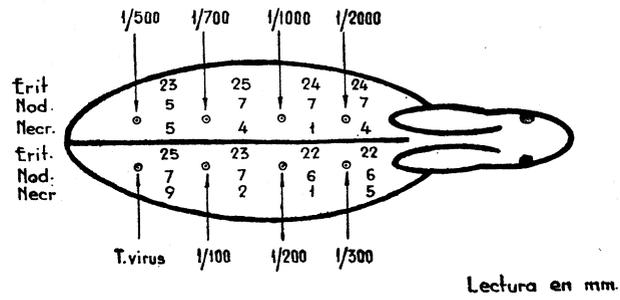


Figura 10. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (24 h.)

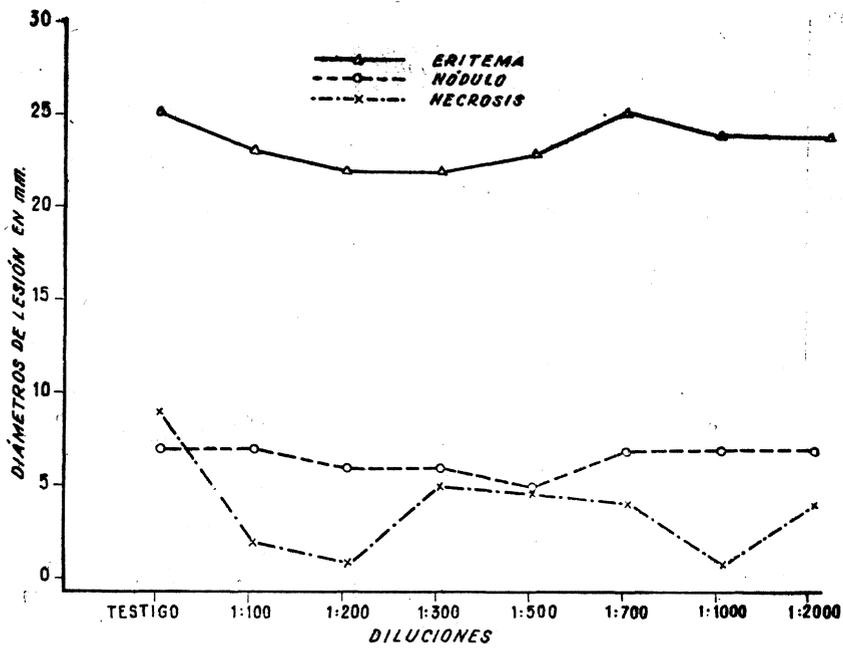


Figura 11. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (24 h.)

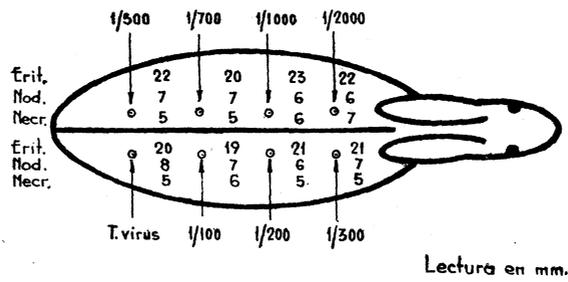


Figura 12. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (48 h.)

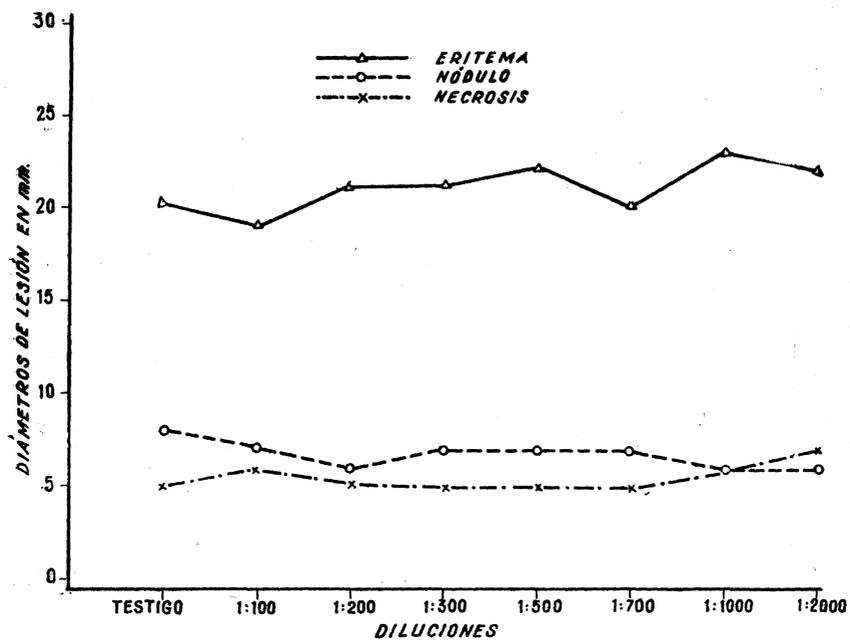


Figura 13. Virus vacunal en contacto con T.M.A. (48 h.)

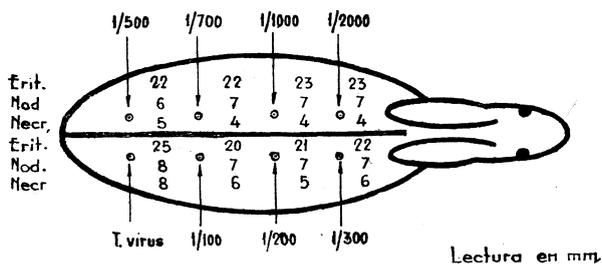


Figura 14. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (20 min.)

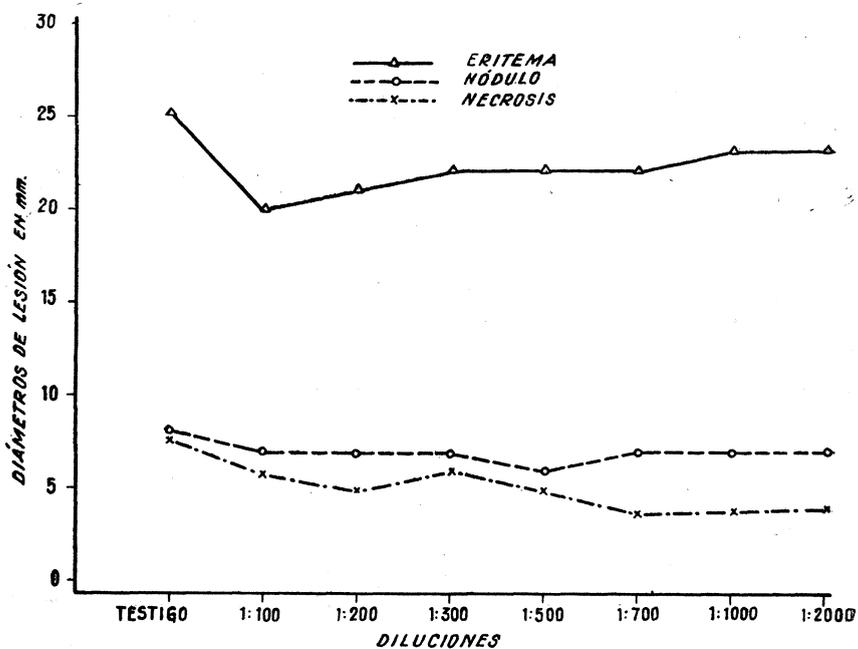


Figura 15. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (20 min.)

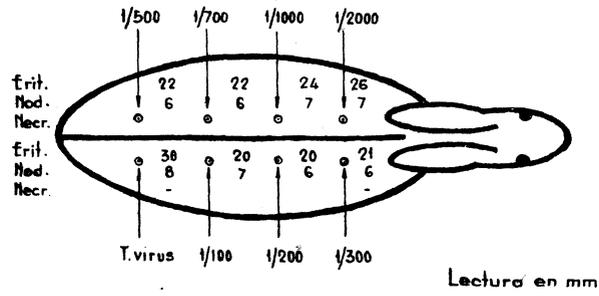


Figura 16. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (1 h.)

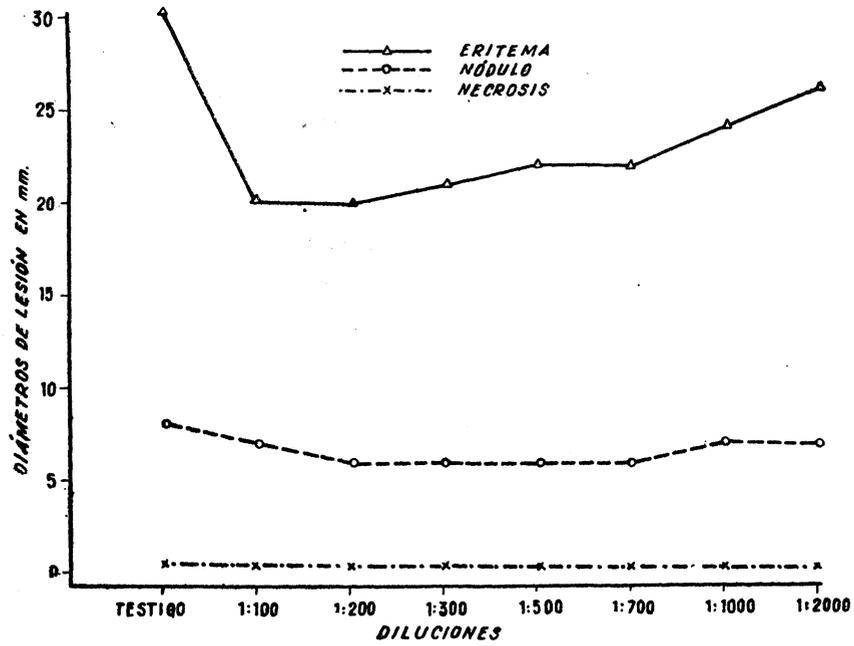


Figura 17. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (1 h.)

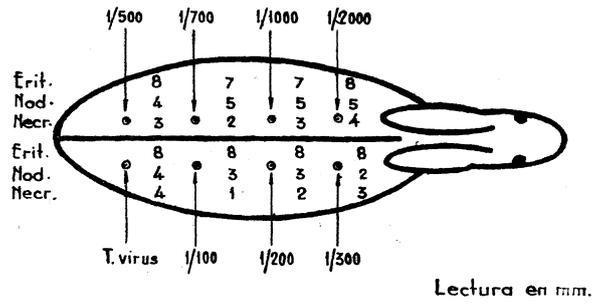


Figura 18. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (24 h.)

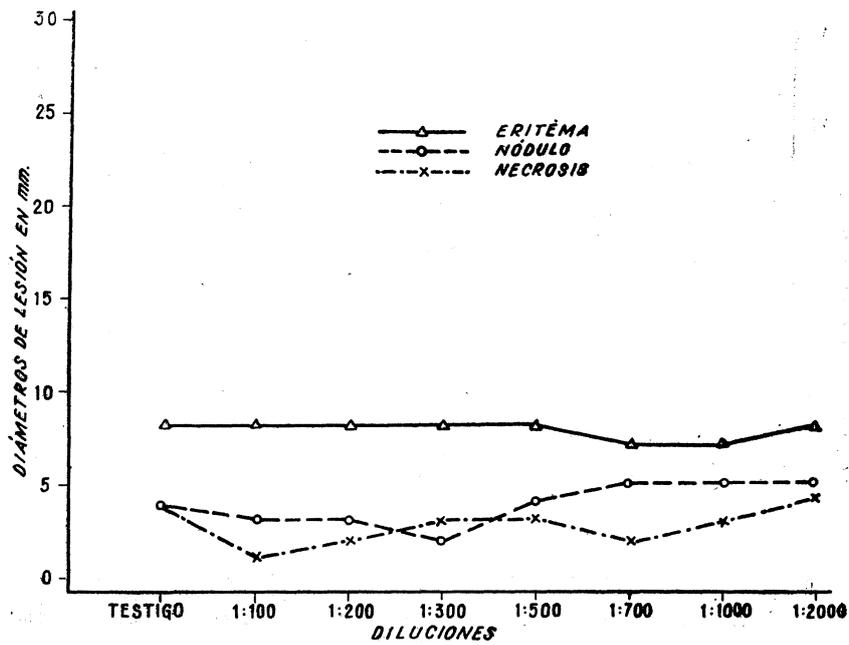


Figura 19. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (24 h.)

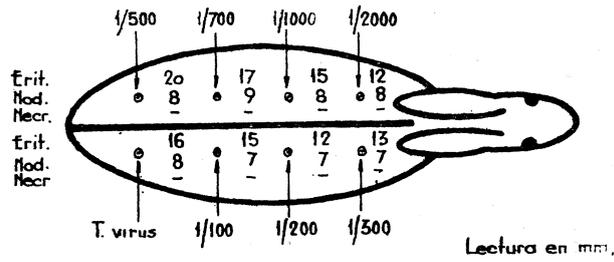


Figura 20. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (48 h.)

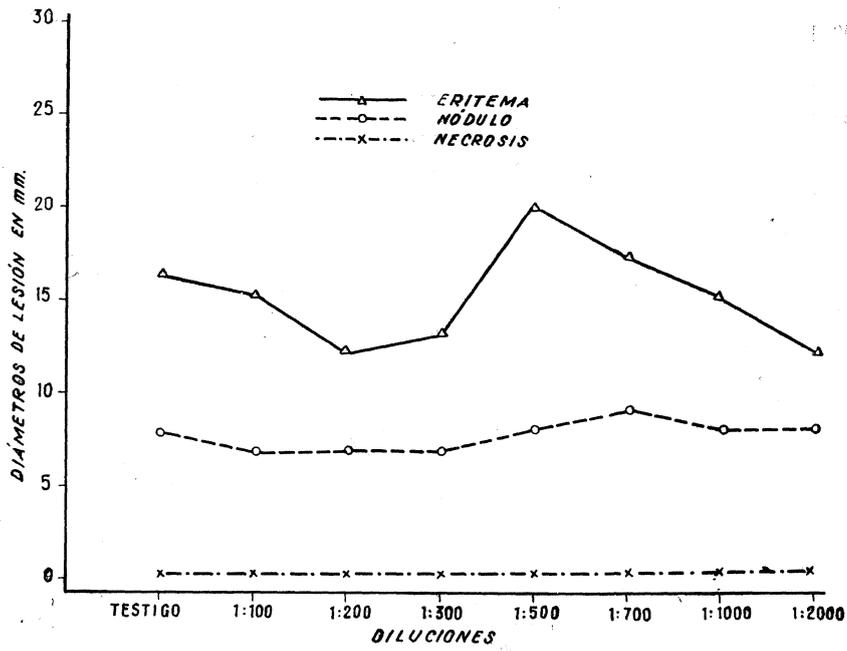


Figura 21. Virus vacunal en contacto con B.T.A. (48 h.)

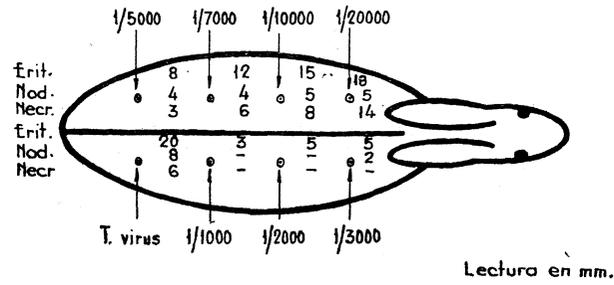


Figura 22. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (20 min.)

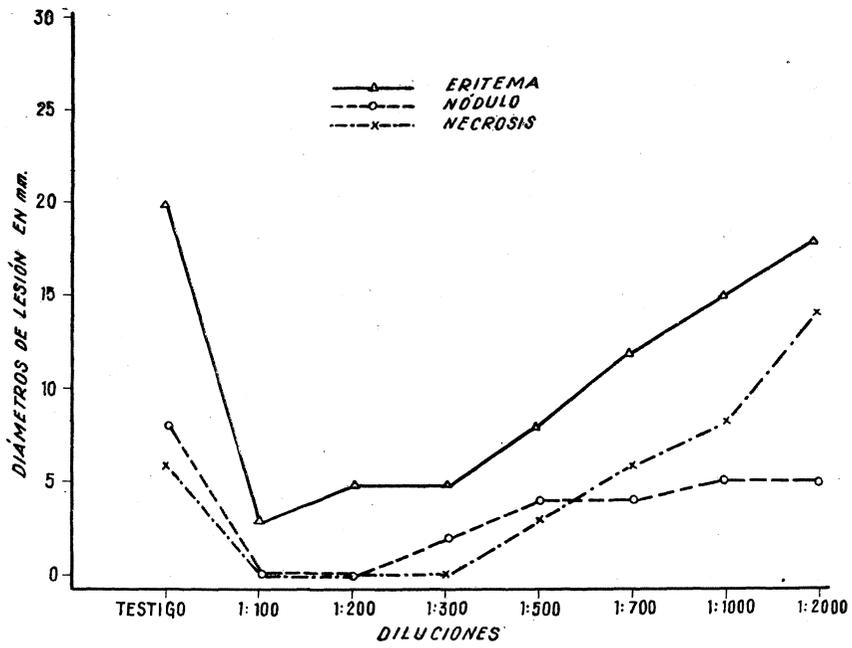


Figura 23. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (20 min.)

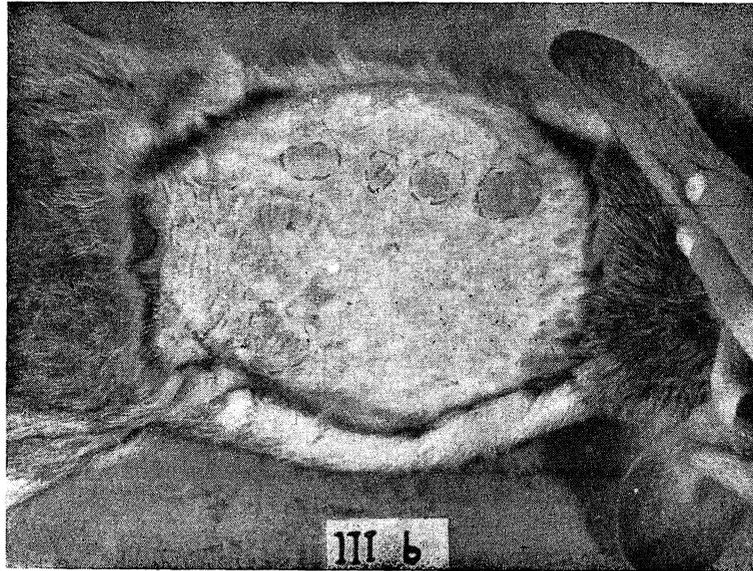


Figura 24. Dorsal de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.D.B.A. (contacto: 20 min.) y con testigo del virus

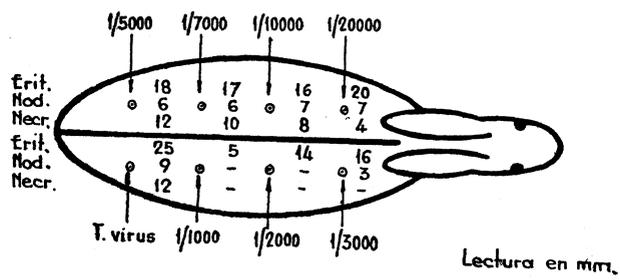


Figura 25. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (1 h.)

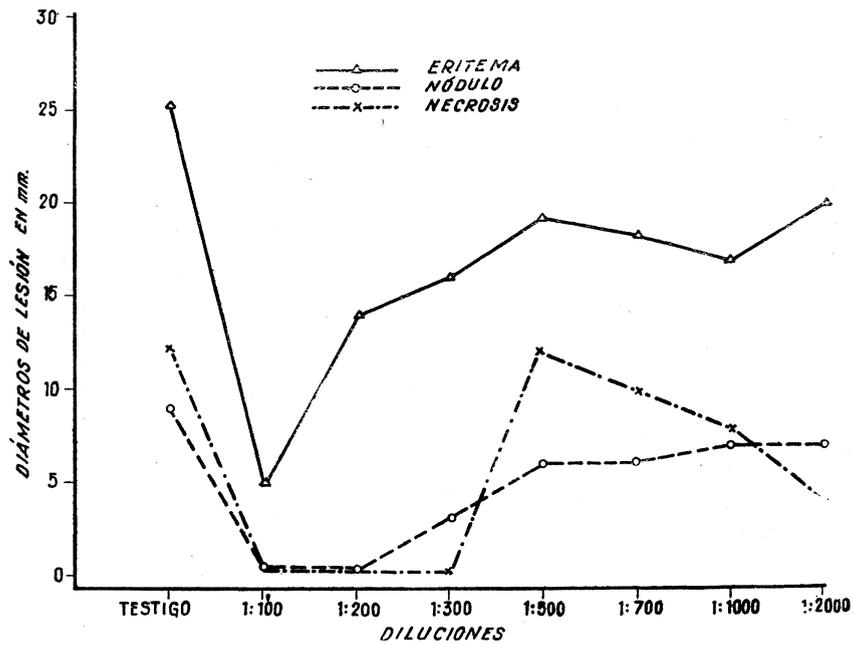


Figura 26. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (1 h.)

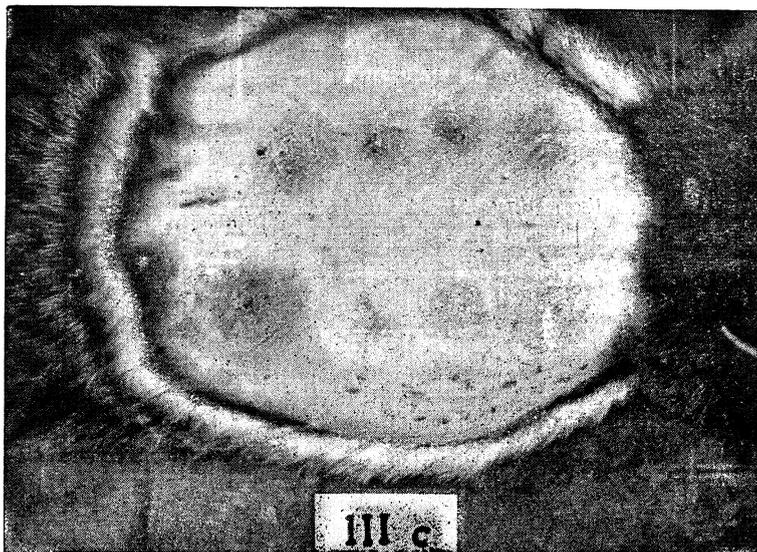


Figura 27. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.D.B.A. (contacto: 1 h.) y con testigo del virus

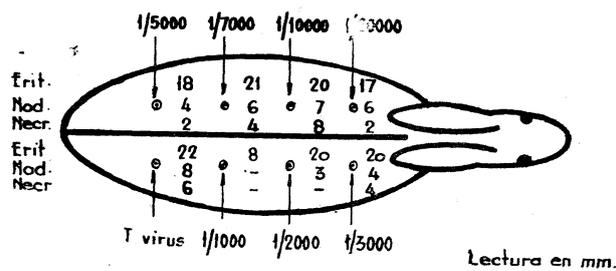


Figura 28. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (24 h.)

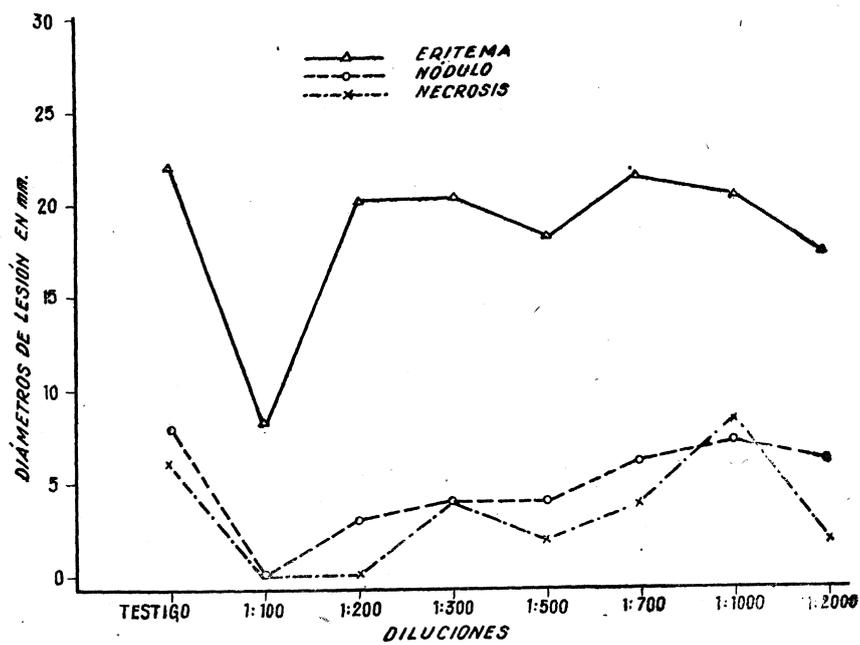


Figura 29. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (24 h.)

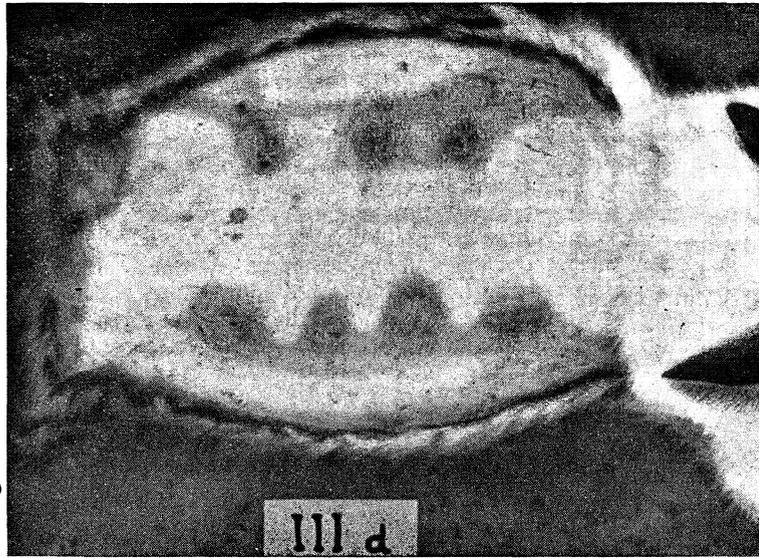


Figura 30. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.D.B.A. (contacto: 24 h.) y con testigo del virus

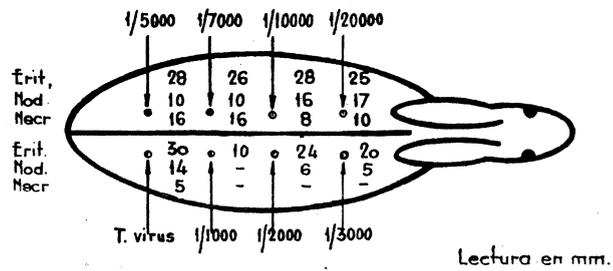


Figura 31. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (48 h.)

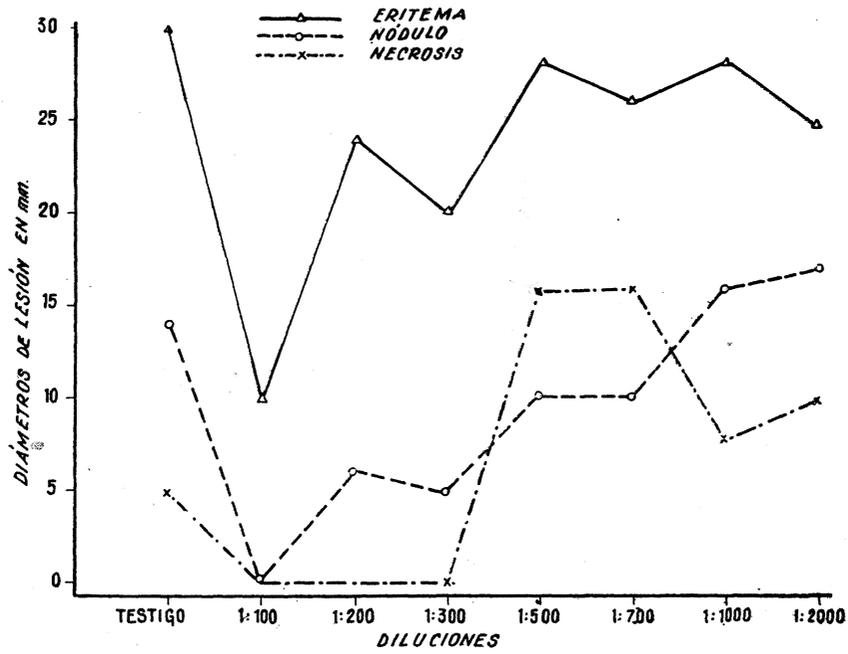


Figura 32. Virus vacunal en contacto con C.D.B.A. (48 h.)

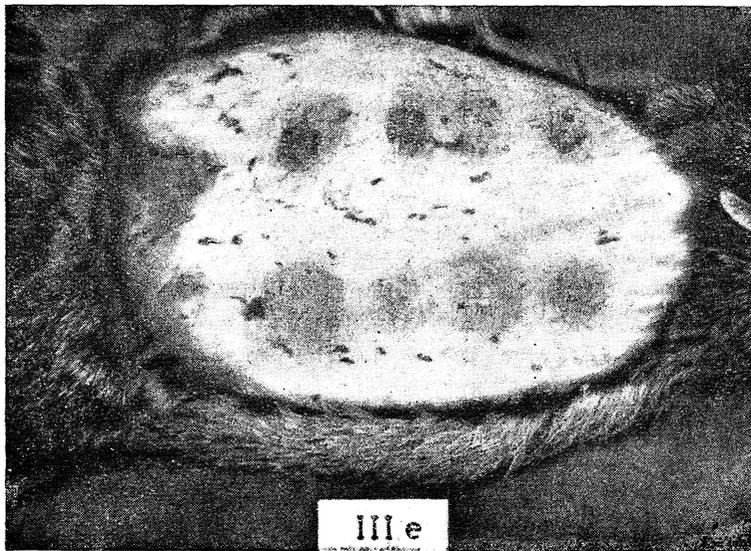


Figura 33. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.D.B.A. (contacto: 48 h.) y con testigo del virus

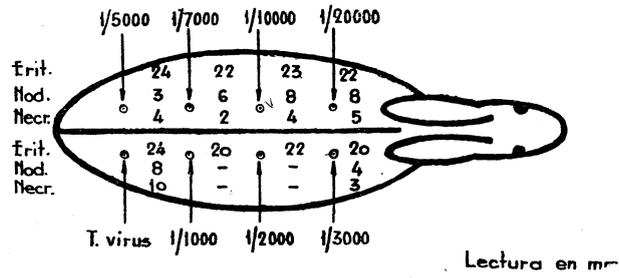


Figura 34. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (20 min.)

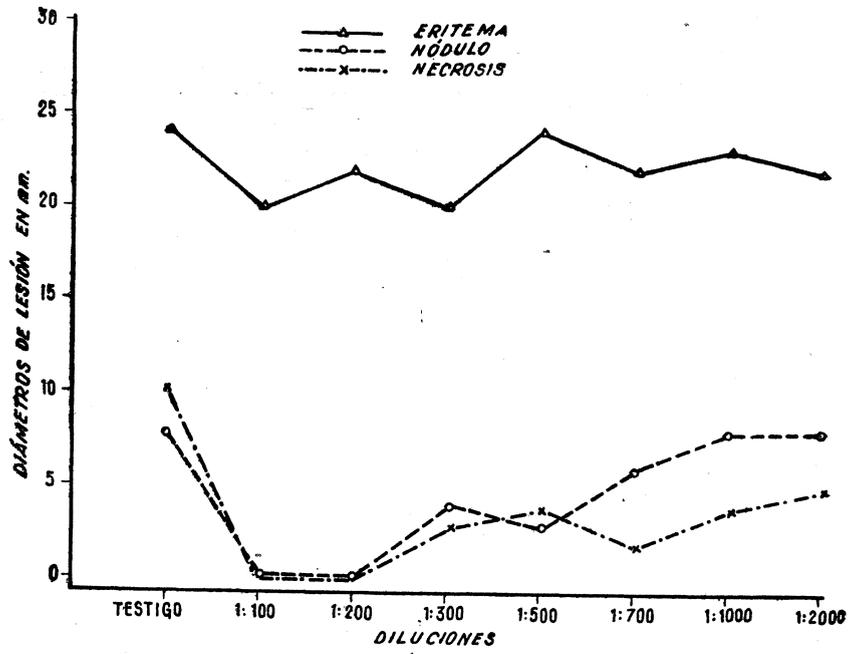


Figura 35. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (20 min.)

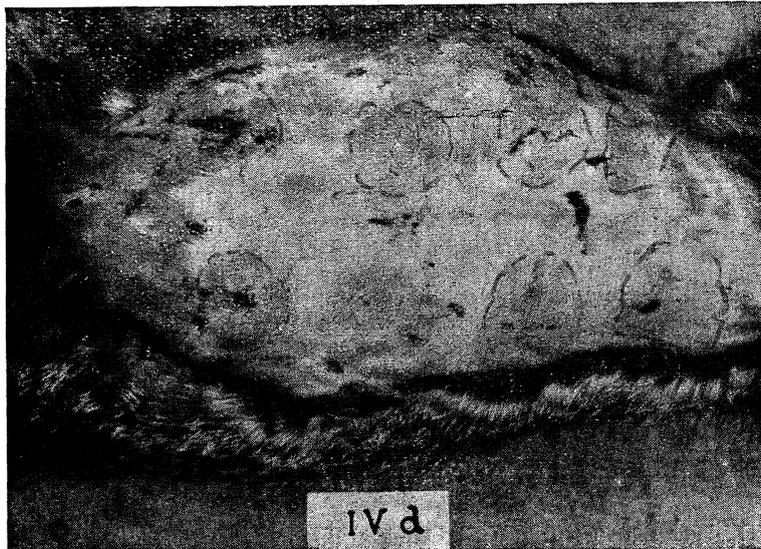


Figura 36. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.D.B.A. (contacto: 20 h.) y con testigo del virus

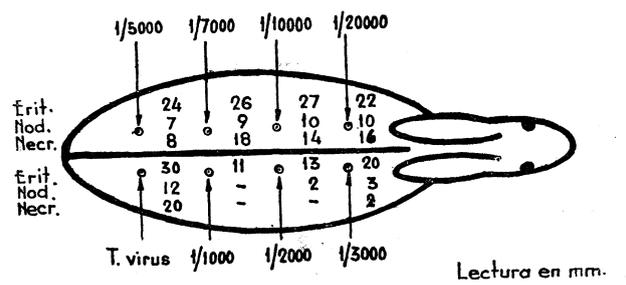


Figura 37. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (1 h.)

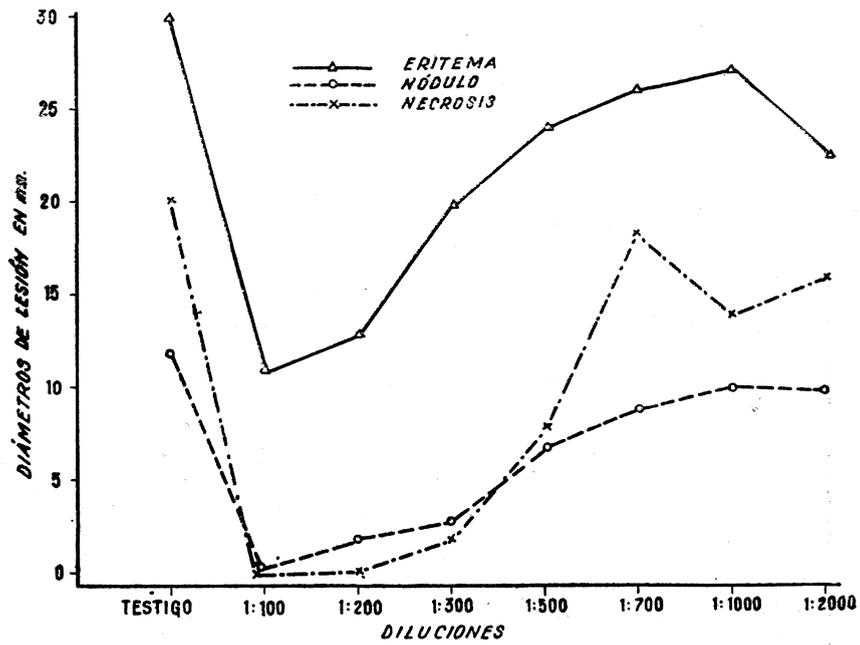


Figura 38. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (1 h.)

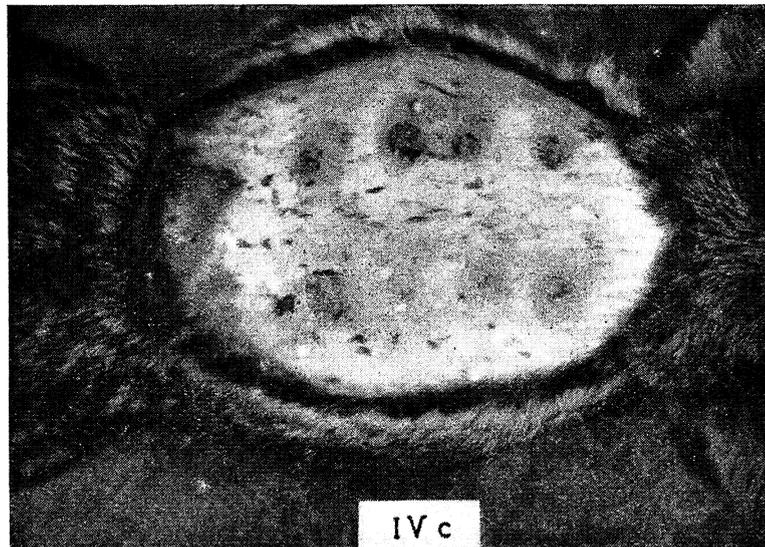


Figura 39. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.T.A. (contacto: 1 h.) y con testigo del virus

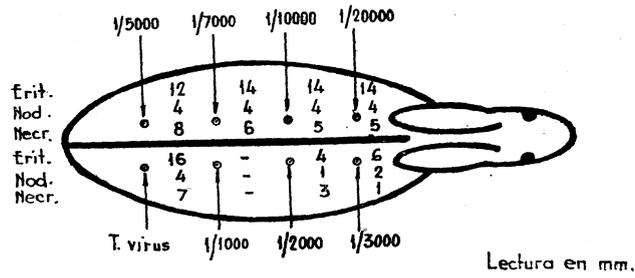


Figura 40. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (24 h.)

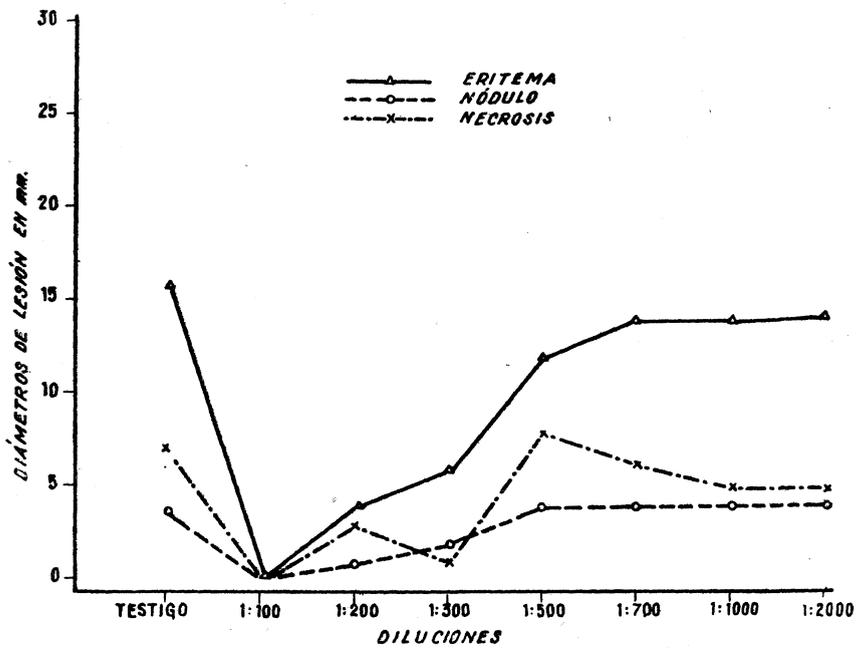


Figura 41. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (24 h.)

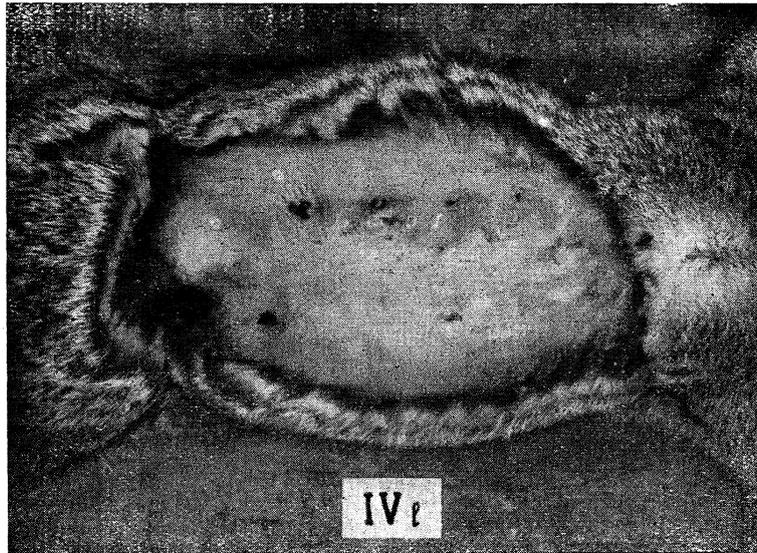


Figura 42. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.T.A. (contacto: 24 h.) y con testigo del virus

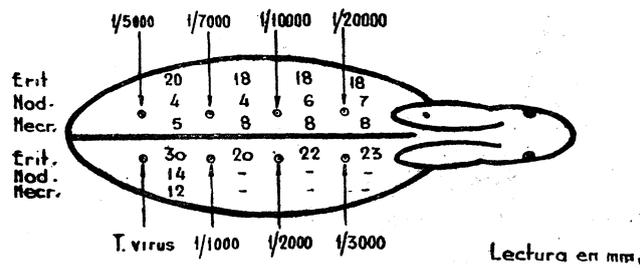


Figura 43. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (48 h.)

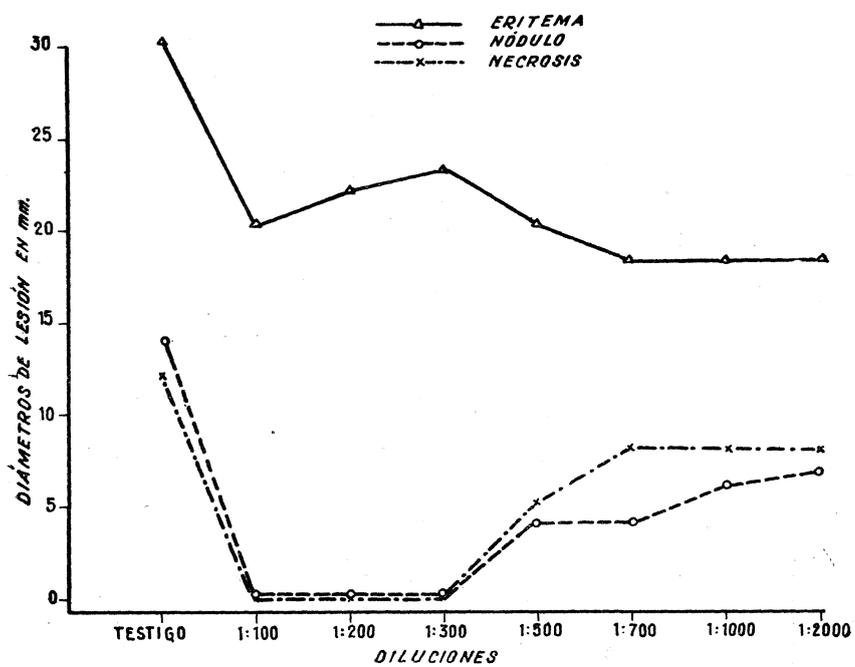


Figura 44. Virus vacunal en contacto con C.T.A. (48 h.)

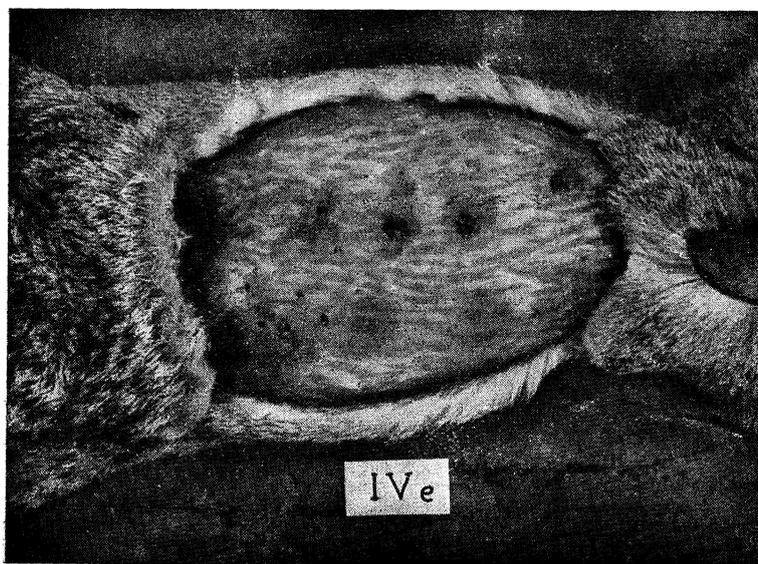


Figura 45. Dorso de conejo inoculado con virus vacunal sometido a la acción de distintas diluciones de C.T.A. (contacto: 48 h.) y con testigo del virus

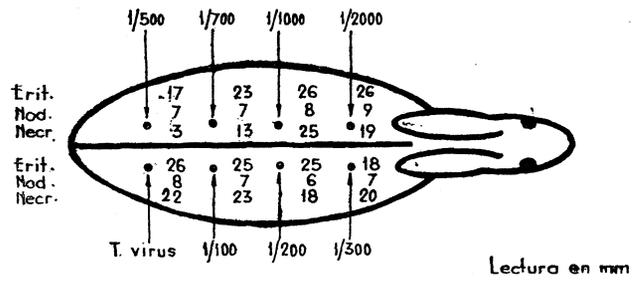


Figura 46. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (20 min.)

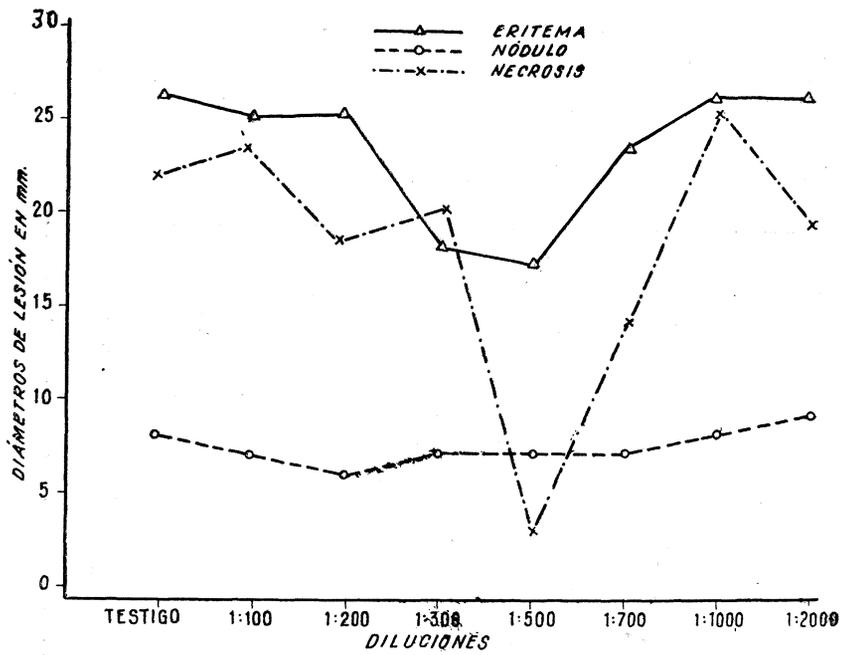


Figura 47. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (20 min.)

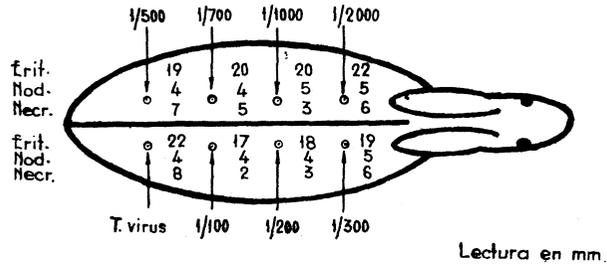


Figura 48. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (1 h.)

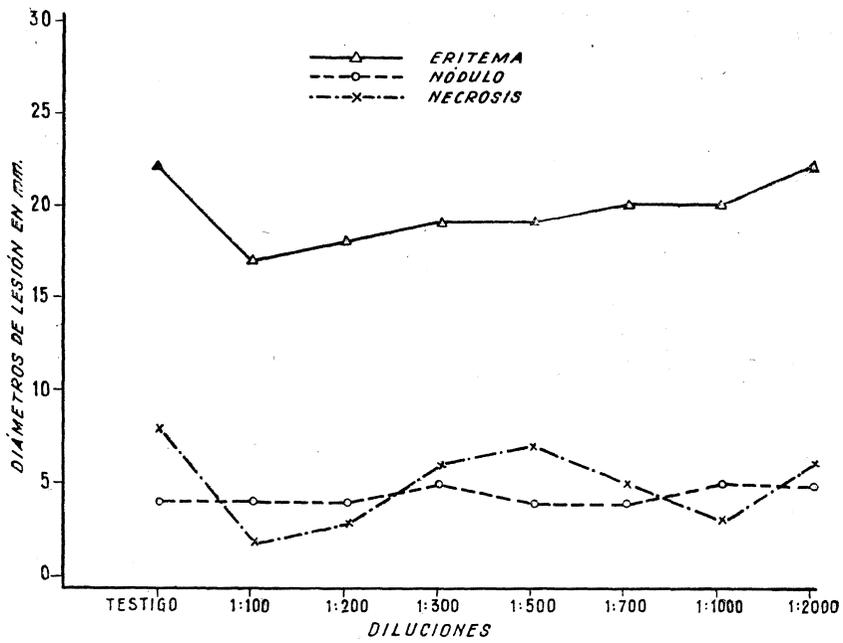


Figura 49. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (1 h.)

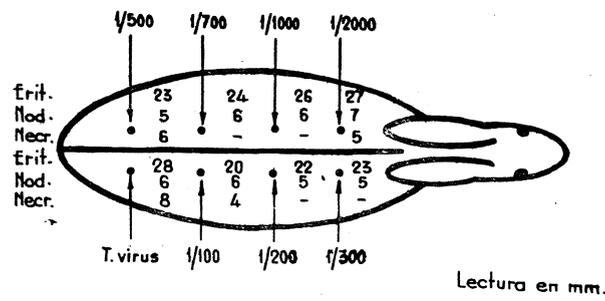


Figura 50. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (24. h.)

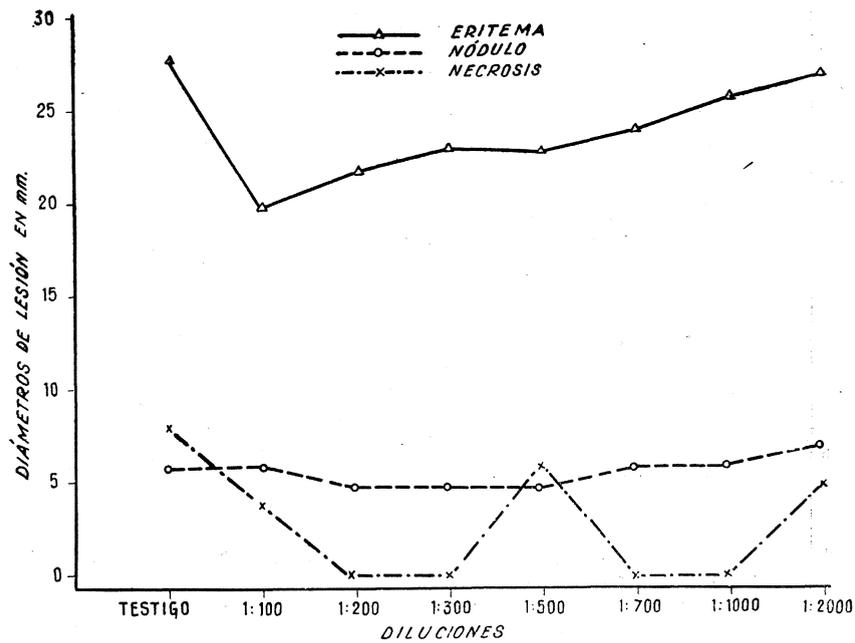


Figura 51. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (24. h.)

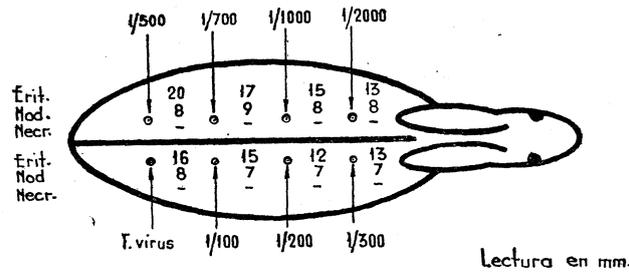


Figura 52. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (48. h.)

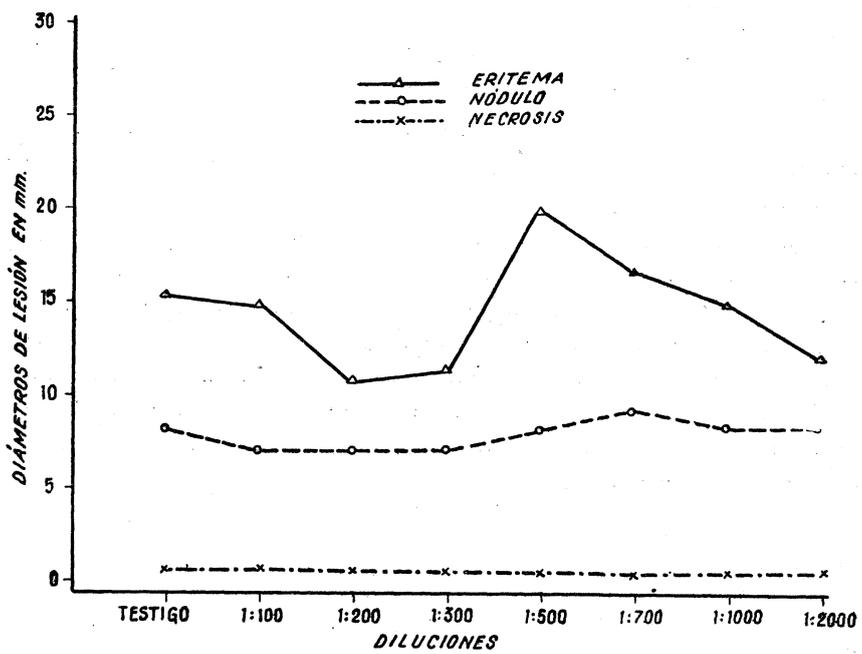


Figura 53. Virus vacunal en contacto con T.E.A. (48. h.)

*Experimentos de contacto entre el virus encefalítico Oeste
y las sustancias ensayadas*

Para la investigación de la actividad de estas sustancias frente al virus Oeste hemos seguido la siguiente marcha general, sin perjuicio de exponer en cada compuesto los detalles diferenciales.

A partir de una ampolla de liofilizado del virus, a la que ya se ha restituido su volumen y dilución con 1 cm³ de agua destilada estéril, se prepara en solución salina estéril una dilución 1/25 (200 DL₅₀).

Por otra parte, a partir de la solución patrón de cada uno de los compuestos en estudio se hizo una solución de concentración doble de la establecida previamente como atóxica, para que al añadirla al mismo volumen de suspensión del virus quedase a la concentración requerida.

Una vez obtenidos ambos elementos, se mezclaron en volúmenes iguales, con lo cual se logró una dilución final de 1/50 para el virus (100 DL₅₀) y la dilución adecuada para la inoculación del compuesto en estudio.

Antes de llevar a cabo esta mezcla, hemos separado una parte de la dilución 1/25 del virus, para que llevada al 1/50 nos sirva de testigo del virus en las inoculaciones.

Tanto la mezcla como el testigo son divididos en 3 fracciones que se conservan en la oscuridad a las 3 temperaturas a ensayar (4° C., 20° C. y 37° C.). De cada una de estas tres fracciones se hacen tomas a los veinte minutos, una hora, veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas para inocular intracerebralmente en grupos de ratones para cada una de las variantes; del mismo modo se hicieron tomas del testigo de virus sin tratar, a los mismos tiempos y temperaturas, para inocular en las mismas condiciones.

Bromuro de tetra-metil-amonio

Se preparó la dilución del virus Oeste a partir del liofilizado hasta llegar a 1/25 (200 DL₅₀).

Por otra parte, a partir de la dilución patrón de la sustancia llegamos a la dilución 1/500 por sucesivas diluciones en solución salina estéril.

De la dilución 1/25 del virus se tomaron 2,5 cm³ que agregados a 2,5 cm³ de la dilución 1/500 del bromuro dan lugar a 5 cm³ de mezcla, que contiene virus Oeste al 1/50 (100 DL₅₀), y bromuro de tetrametil-amonio al 1/1.000, que es la dilución atóxica para este compuesto.

De estos 5 cm³ se hicieron tres partes, llevándose cada una de ellas a la temperatura a que se querían conservar para la inoculación y en la oscuridad.

El sobrante de la dilución 1/25 del virus se adicionó a igual volumen de solución salino estéril, con lo que se obtuvo una dilución 1/50 del virus que nos sirvió de testigo de virus, después de haber hecho tres fracciones para su distribución a las temperaturas en estudio.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,3 cm³ de mezcla. En los cuadros 14-16 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 14. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		20	50	30		100
Testigo	20 min.		20	40	40		100
Mezcla	1 h.		10	40	40	10	100
Testigo	1 h.			20	60	20	100
Mezcla	24 h.		20	80			100
Testigo	24 h.			60	40		100
Mezcla	48 h.			70	30		100
Testigo	48 h.		20	20	60		100

Cuadro 15. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.			80	20		100
Testigo	20 min.		40	20	40		100
Mezcla	1 h.		10	70	10	10	100
Testigo	1 h.		40	20	40		100
Mezcla	24 h.		20	50	30		100
Testigo	24 h.			20	60	20	100
Mezcla	48 h.			60	30	10	100
Testigo	48 h.		40	20	40		100

Cuadro 16. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación				Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	
		Porcentaje de muertes				
Mezcla	20 min.		20	70	10	100
Testigo	20 min.		20	40	40	100
Mezcla	1 h.		30	60	10	100
Testigo	1 h.		20	20	60	100

Cloruro de bencil-trimetil-amonio

Siguiendo las normas fijadas en nuestra marcha de trabajo, obtuvimos la dilución de esta sal de amonio al 1/500 a partir de la solución patrón.

Preparamos asimismo la suspensión del virus Oeste al 1/25 (200 DL₅₀) y la mezcla de ambos para obtener el inóculo final de 100 DL₅₀ de virus Oeste al 1/1.000 del cloruro de bencil-trimetil-amonio.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 17-19 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 17. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.			70	30		100
Testigo	20 min.		20	40	40		100
Mezcla	1 h.		10	50	30	10	100
Testigo	1 h.			40	60		100
Mezcla	24 h.		10	60	30		100
Testigo	24 h.			60	40		100
Mezcla	48 h.			80	20		100
Testigo	48 h.		20	20	40	20	100

Cuadro 18. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.			60	40		100
Testigo	20 min.		40	20	40		100
Mezcla	1 h.			70	20	10	100
Testigo	1 h.		20	20	60		100
Mezcla	24 h.		10	50	30	10	100
Testigo	24 h.			20	80		100
Mezcla	48 h.			80	20		100
Testigo	48 h.		20	60	20		100

Cuadro 19. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		10	60	30		100
Testigo	20 min.			80	20		100
Mezcla	1 h.			70	20	10	100
Testigo	1 h.		20	40	40		100

Cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio

Al igual que hicimos en los dos compuestos anteriores, preparamos la dilución 1/25 (200 DL₅₀) del virus Oeste para obtener, por un lado, el testigo de virus por adición de solución salina estéril y, por el otro, la mezcla del virus y del compuesto.

En este caso hemos llevado la dilución de la sal hasta 1/1.000 para obtener la dilución final de 1/2.000 al añadir la suspensión de virus.

El producto resultante contiene 100 DL₅₀ al 1/2.000 del cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio en 0,03 cm³.

Teniendo en cuenta que este compuesto a temperaturas más bajas de 8° C. presenta anomalías en su disolución, prescindimos de efectuar los experimentos a la temperatura de 4° C.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 20 y 21 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 20. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación								Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	8	
		Porcentaje de muertes								
Mezcla	20 min.									0
Testigo	20 min.				40	20		40		100
Mezcla	1 h.									0
Testigo	1 h.					60	20	20		100
Mezcla	24 h.									0
Testigo	24 h.					40	20		40	100
Mezcla	48 h.									0
Testigo	48 h.					40	60			100

Cuadro 21. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación							Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	
		Porcentaje de muertes							
Mezcla	20 min.								0
Testigo	20 min.				40	60			100
Mezcla	1 h.								0
Testigo	1 h.					60	20	20	100

Cloruro de cetil-trimetil-amonio

Ateniéndonos a los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad hemos preparado la dilución 1/500, que es la hallada por nosotros como atóxica.

Se preparó el virus Oeste según la marcha indicada en los otros compuestos, hasta obtener la dilución 1/25 (200 DL₅₀).

La obtención del testigo virus 100 DL₅₀ y la mezcla de la dilución 1/25 del virus con la sal de amonio al 1/50 para dar lugar al inóculo

(100 DL₅₀ (1/50) de virus Oeste en dilución 1/1.000 del compuesto), se ha realizado igual que hemos hecho con los compuestos anteriormente estudiados.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 22-24 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 22. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación								Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Mezcla	20 min.									0
Testigo	20 min.				20		40	20	20	100
Mezcla	1 h.									0
Testigo	1 h.					40		40	20	100
Mezcla	24 h.									0
Testigo	24 h.							100		100
Mezcla	48 h.									0
Testigo	48 h.					60		40		100

Cuadro 23. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación							Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	
Mezcla	20 min.								0
Testigo	20 min.					40		60	100
Mezcla	1 h.								0
Testigo	1 h.				40			40	80
Mezcla	24 h.								0
Testigo	24 h.					40	40	20	100
Mezcla	48 h.								0
Testigo	48 h.						40	60	100

Cuadro 24. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación								Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	8	
		Porcentaje de muertes								
Mezcla	20 min.									0
Testigo	20 min.				20	80				100
Mezcla	1 h.									0
Testigo	1 h.				40		40		20	100

Bromuro de tetra-etil-amonio

Hemos preparado el inóculo final de 100 DL₅₀ en dilución 1/500 de esta sal de amonio según los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad, que indican que el compuesto a dilución 1/500 es atóxico para la inoculación en cerebro de ratón.

Se siguió la misma marcha que en los cuatro compuestos anteriores.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 25-27 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 25. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación											Porcentaje total de muertes		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
		Porcentaje de muertes													
Mezcla	20 min.					30	40	20	10						100
Testigo	20 min.				60	40									100
Mezcla	1 h.					40	40	20							100
Testigo	1 h.					20	60	20							100
Mezcla	24 h.					40	10	30			10	10			100
Testigo	24 h.					20	80								100
Mezcla	48 h.					50	50								100
Testigo	48 h.					20	20	60							100

Cuadro 26. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación										Porcentaje total de muertes	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
		Porcentaje de muertes											
Mezcla	20 min.				10	40	20	20			10		100
Testigo	20 min.				40	40				20			100
Mezcla	1 h.				40	30	30						100
Testigo	1 h.				60	40							100
Mezcla	24 h.				20	20			30		20	10	100
Testigo	24 h.				40	20				20		20	100
Mezcla	48 h.				40	50			10				100
Testigo	48 h.				20	20	60						100

Cuadro 27. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación							Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	
		Porcentaje de muertes							
Mezcla	20 min.					50	30	20	100
Testigo	20 min.						100		100
Mezcla	1 h.					10	40	50	100
Testigo	1 h.					80	20		100

Experimentos de contacto entre el virus encefalítico Este y las substancias ensayadas

Para estos experimentos hemos partido de ampollas de virus Este liofilizado rehidratadas con 1 cm³ de agua destilada estéril, y a partir de esta dilución llegamos a la 1/250 (200 DL₅₀) en solución salina estéril.

El resto de la marcha es exacto a como se explicó para el virus en-

refalítico Oeste, variando solamente la concentración de la suspensión del virus, puesto que está fijada la 100 DL₅₀ en la dilución 1/500.

Las temperaturas y tiempos de conservación son los mismos que para el virus Oeste; al igual que con ese virus, se realizaron a 37° C. tan sólo las inoculaciones de veinte minutos y una hora, a causa de la inactivación que presentan estos virus a 37° C. pasada la hora.

Bromuro de tetra-metil-amonio

Estudiaremos con un poco de atención la marcha de la operación para este compuesto, siendo válida para todos los restantes al variar tan sólo la concentración a que debe ser inoculado cada uno.

Se preparó la suspensión del virus hasta llegar a la dilución 1/250, partiendo de la ampolla del liofilizado de virus Este.

Por otro lado, a partir de la solución patrón de esta sal obtuvimos por diluciones sucesivas en solución salina estéril la final de 1/500.

De la dilución 1/250 de la suspensión del virus tomamos 6 cm³ que unidos a 6 cm³ de la dilución 1/500 del compuesto dan lugar a una mezcla, que con 0,03 cm³ contiene 100 DL₅₀ en una dilución 1/1.000 del compuesto estudiado.

Estos 12 cm³ son divididos en 3 partes y llevados a las 3 temperaturas que se consideran.

Cuadro 28. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.			10	60	30	100
Testigo	20 min.			20	60	20	100
Mezcla	1 h.			10	60	30	100
Testigo	1 h.			60	20	20	100
Mezcla	24 h.			10	30	60	100
Testigo	24 h.			40	60		100
Mezcla	48 h.			10	40	50	100
Testigo	48 h.			40	40	20	100

De la suspensión 1/250 del virus se separaron 2 cm³ que agregados a 2 cm³ de solución salina estéril dieron lugar al testigo virus de 100 DL₅₀.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 28-30 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 29. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación						Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	
		Porcentaje de muertes						
Mezcla	20 min.			10	50	30	10	100
Testigo	20 min.			60		40		100
Mezcla	1 h.			20	60	20		100
Testigo	1 h.			40	60			100
Mezcla	24 h.			40	20	30	10	100
Testigo	24 h.			20	40	40		100
Mezcla	48 h.			20	40	30	10	100
Testigo	48 h.			60	20		20	100

Cuadro 30. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación						Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	
		Porcentaje de muertes						
Mezcla	20 min.			20	60	10	10	100
Testigo	20 min.			20	60	20		100
Mezcla	1 h.			30	30	20	20	100
Testigo	1 h.			40	40	20		100

Cloruro de bencil-trimetil-amonio

Seguimos la misma marcha que en el compuesto anterior, puesto que la dilución final de la sal de amonio es 1/1.000.

Las temperaturas y tiempos de inoculación son las fijadas en el protocolo de trabajo.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 31-33 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 31. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		10	30	50	10	100
Testigo	20 min.			40	60		100
Mezcla	1 h.		10	40	30	20	100
Testigo	1 h.			20	80		100
Mezcla	24 h.			60	30	10	100
Testigo	24 h.			60	20	20	100
Mezcla	48 h.			40	40	20	100
Testigo	48 h.		20	60	20		100

Cuadro 32. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		10	40	50		100
Testigo	20 min.			40	40	20	100
Mezcla	1 h.			50	40	10	100
Testigo	1 h.			40	40	20	100
Mezcla	24 h.			30	70		100
Testigo	24 h.		20	20	60		100
Mezcla	48 h.		40	40	10	10	100
Testigo	48 h.		40	60			100

Cuadro 33. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.			40	50	10	100
Testigo	20 min.			40	40	20	100
Mezcla	1 h.			50	50		100
Testigo	1 h.			60	20	20	100

Cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio

La marcha es la seguida en el estudio de las sales anteriores, pero teniendo en cuenta que este compuesto debe ser inoculado intracerebralmente con una dilución final de 1/2.000. Por presentar precipitaciones a la temperatura de 4° C., no hemos efectuado las determinaciones correspondientes a la citada temperatura para esta substancia.

La obtención de la mezcla de sal y virus y la del testigo de virus sin tratar se hizo como en los compuestos precedentes.

Cuadro 34. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación				Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	
		Porcentaje de muertes				
Mezcla	20 min.			20	10	30
Testigo	20 min.		40	20	40	100
Mezcla	1 h.					0
Testigo	1 h.		20	40	40	100
Mezcla	24 h.					0
Testigo	24 h.			40	60	100
Mezcla	48 h.					0
Testigo	48 h.		60	20	20	100

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 34-36 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 35. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación				Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	
		Porcentaje de muertes				
Mezcla	20 min.				20	20
Testigo	20 min.			60	40	100
Mezcla	1 h.					0
Testigo	1 h.		20	60	20	100

Cloruro de cetil-trimetil-amonio

Hemos seguido la misma marcha para la preparación de la suspensión del virus Este, tanto para testigo como para mezcla del presunto viricida. La dilución final necesaria para este compuesto es de 1/1.000.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 36-38 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 36. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.			10	20	10	40
Testigo	20 min.			40	60		100
Mezcla	1 h.						0
Testigo	1 h.			60	40		100
Mezcla	24 h.						0
Testigo	24 h.		20	60	20		100
Mezcla	48 h.						0
Testigo	48 h.			80	20		100

Cuadro 37. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
Mezcla	20 min.				20		20
Testigo	20 min.		20	60	20		100
Mezcla	1 h.						0
Testigo	1 h.			80	20		100
Mezcla	24 h.						0
Testigo	24 h.			40	40	20	100
Mezcla	48 h.						0
Testigo	48 h.		20	20	60		100

Cuadro 38. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación			Porcentaje total de muertes
		1	2	3	
Mezcla	20 min.			10	10
Testigo	20 min.		40	60	100
Mezcla	1 h.				0
Testigo	1 h.		20	80	100

Bromuro de tetra-etil-amonio

La marcha de la preparación de la suspensión de virus, substancia y mezcla de ambas porciones es la misma, teniendo en cuenta que la dilución final necesaria para esta sal de amonio es la 1/500.

Se llevó a cabo la inoculación intracerebral en ratón a dosis de 0,03 cm³ de mezcla. En los cuadros 39-41 se recogen los ensayos efectuados.

Cuadro 39. Temperatura de contacto: 4° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		10	40	50		100
Testigo	20 min.		20	40	40		100
Mezcla	1 h.			50	40	10	100
Testigo	1 h.		20	40	40		100
Mezcla	24 h.		10	70	20		100
Testigo	24 h.			60	20	20	100
Mezcla	48 h.		20	50	20	10	100
Testigo	48 h.			20	80		100

Cuadro 40. Temperatura de contacto: 20° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		10	60	30		100
Testigo	20 min.			60	40		100
Mezcla	1 h.			50	40	10	100
Testigo	1 h.		20	40	40		100
Mezcla	24 h.		10	80	10		100
Testigo	24 h.			80	20		100
Mezcla	48 h.			50	30	20	100
Testigo	48 h.		20	60	20		100

Cuadro 41. Temperatura de contacto: 37° C.

	Tiempo de contacto	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	
		Porcentaje de muertes					
Mezcla	20 min.		10	50	40		100
Testigo	20 min.			60	40		100
Mezcla	1 h.			60	30	10	100
Testigo	1 h.			60	40		100

DISCUSION

Hemos podido ver que el cloruro de bencil-trimetil-amonio y el bromuro de tetra-etil-amonio no muestran poder bactericida ni bacteriostático en presencia de la linfa vacunal por contacto directo, ni tampoco frente a las 5 cepas bacterianas más frecuentemente aisladas de estas pulpas de ternera.

El bromuro de tetra-metil-amonio inhibe las bacterias aisladas a diluciones de 6×10^{-3} y produce bacteriostasias durante diez a doce días a la concentración de 8×10^{-3} , y de dos a tres días a la de 4×10^{-4} con valores intermedios también, pero no tiene actividad bacteriostática alguna cuando se emplea directamente frente a linfa problema. Este último fenómeno demuestra la interferencia que el componente orgánico ejerce sobre esta acción antiséptica, hecho que es aún más patente en el cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y en el cloruro de cetil-trimetil-amonio, que dan lugar a bacteriostasias relativas de seis a dos días, con concentraciones que oscilan entre 2 y 6×10^{-5} y son antisépticos a las diluciones de 6×10^{-4} y 8×10^{-4} , respectivamente, cuando actúan frente a las bacterias aisladas de la pulpa vacunal; mientras que necesitan de una concentración de 1×10^{-3} para mostrar actividad frente a las mismas bacterias incluidas en la pulpa de ternera.

En el curso del trabajo pudo advertirse que estas diferencias de com-

portamiento frente a las bacterias guardaban relación con las diferencias de actividad que encontramos frente a los virus estudiados.

En cuanto a la actividad viricida de estos compuestos, hemos podido comprobar que el virus vacunal en contacto de veinte minutos, una hora, veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas, con diluciones de 1/100, 1/200, 1/300, 1/500, 1/700, 1/1.000 y 1/2.000 de bromuro de tetrametil-amonio, produce lesiones análogas a las obtenidas con los testigos sin tratar. Esta falta de actividad se manifiesta aún a la dilución más concentrada de 1/100, incluso después de cuarenta y ocho horas de contacto, aunque hubiera cabido esperar otro resultado por el ligero descenso de la curva de eritema que se inició para el contacto de una hora a la dosis de 1/100 y por los antecedentes que ya teníamos de actividad sobre las bacterias aisladas de pulpa. Sobre los encefalíticos Oeste y Este, diluciones de 10^{-3} no logran ningún efecto, ni a los contactos más prolongados.

Análogos resultados negativos se obtienen con el bromuro de tetraetil-amonio y con el cloruro de bencil-trimetil-amonio para el virus vacunal y virus encefalíticos.

Por el contrario, se han obtenido resultados positivos con el cloruro de cetil-dimetil-amonio y con el cloruro de cetil-trimetil-amonio frente a los virus estudiados en las condiciones experimentales utilizadas.

El cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio a la dilución de 1/1.000 inutiliza al virus vacunal para los cuatro tiempos de contacto ensayados y la mezcla no produce lesiones dérmicas específicas (nódulo y necrosis); estos efectos viricidas son menores a medida que disminuye la concentración de la substancia, siendo nula su acción a la dilución 1/10.000.

Frente a los virus encefalíticos, podemos decir que para el Oeste, en las pruebas de inoculación a ratones, del virus en contacto con el detergente, se ha demostrado plenamente su acción viricida al 1/2.000, sobreviviendo la totalidad de los ratones.

Igualmente, para el virus Este, a la dilución 1/2.000, como hicimos con el anterior virus, se obtienen resultados de inactivación, si bien con veinte minutos de contacto a las temperaturas de 20° C. y 37° C. todavía se produce la muerte de algunos ratones, con cuadro encefalítico, debido sin duda a insuficiente tiempo de contacto, interpretación confirmada al obtener supervivencia de la totalidad de los ratones cuando el contacto era de una hora.

Cuadro 42. Resumen de los resultados obtenidos con los detergentes estudiados frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Oeste y Este de Estados Unidos de América del Norte

Detergentes	Virus vacunal			
	Tiempo de contacto a 20° C.			
	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.
T.M.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁
B.T.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁
C.D.B.A.	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄
C.T.A.	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄
T.E.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁

Detergentes	Virus encefalítico equino Oeste											
	Tiempo de contacto a 4° C.				Tiempo de contacto a 20° C.				Tiempo de contacto a 37° C.			
	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.
T.M.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	I	I
B.T.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	I	I
C.D.B.A.	P	P	P	P	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	I	I
C.T.A.	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	I	I
T.E.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	I	I

Detergentes	Virus encefalítico equino Este											
	Tiempo de contacto a 4° C				Tiempo de contacto a 20° C.				Tiempo de contacto a 37° C.			
	20 min	1 h.	24 h.	48 h.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.
T.M.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	I	I
B.T.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	I	I
C.D.B.A.	P	P	P	P	R ₃	R ₄	R ₄	R ₄	R ₃	R ₄	I	I
C.T.A.	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₂	R ₄	R ₄	R ₄	R ₃	R ₄	I	I
T.E.A.	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	I	I

T.M.A. = Bromuro de tetra-metil-amonio.
 B.T.A. = Cloruro de bencil-trimetil amonio.
 C.D.B.A. = Cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio.
 C.T.A. = Cloruro de cetil-trimetil-amonio.
 T.E.A. = Bromuro de tetra-etil-amonio.

I = Inactivación espontánea del virus a este tiempo y temperatura.
 P = Precipitación de la substancia en la disolución a esta temperatura.
 R₁ = Lesión análoga al testigo virus o muerte de todos los ratones.
 R₂ = Muerte de más del 25 por 100 de ratones.
 R₃ = Muerte del 25 por 100 o menos de ratones.
 R₄ = Ausencia de nódulo y necrosis con disminución apreciable del eritema o supervivencia del total de ratones.

También el cloruro de cetil-trimetil-amonio resultó activo, comprobándose para el virus vacunal, en la serie completa de contactos, la inutilización para provocar lesiones dérmicas, de nódulo y necrosis e incluso del eritema a la dilución de 1/1.000, excepto para contactos de veinte minutos, donde la curva de este eritema no presentó el descenso tan típicamente acusado, hecho que pudiera atribuirse a sensibilidad particular del animal.

Para los encefalíticos, la acción viricida sobre el del Oeste fue completa, sobreviviendo la totalidad de los ratones inoculados en todos los ensayos efectuados, y lo mismo se puede decir del virus Este, salvo que son necesarios tiempos de contacto superiores a los veinte minutos para lograr la inactivación completa, ya que se registró alguna muerte en el grupo de animales inoculados con el virus en contacto con el detergente en este período de tiempo.

Consideraciones de índole general pueden hacerse en cuanto a que es posible que los resultados negativos obtenidos por nosotros pudieran resultar positivos para mayores concentraciones de las sustancias problema, hecho imposible de comprobar en este trabajo por razones de limitación debidas al grado de toxicidad para los animales.

También es probable que, para las sustancias que resultaron activas frente a los virus encefalíticos, pudieran lograrse efectos positivos con concentraciones menores, pero como la comprobación de este límite inferior de actividad hubiera llevado al empleo de un número mucho mayor de ratones, nos hemos conformado con estudiar la actividad en el límite superior no tóxico, puesto que el propósito fundamental era investigar la posible acción viricida.

Se ha comprobado, a lo largo de esta experimentación, el interesante fenómeno de que la temperatura de contacto no influye en la actividad viricida de los compuestos activos.

Una vez más parece comprobarse que la actividad viricida así como la bactericida, guardan relación con el grado de complejidad o longitud de los radicales alcohólicos existentes en su molécula. Así, tenemos que las dos sustancias activas presentan un radical cetílico de 12 átomos de carbono, que es el único motivo estructural de diferencias entre los compuestos hallados activos y los que no lo son. Actividad que, por otra parte, es paralela a su toxicidad, siendo ésta más patente en el caso

del cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio, que es asimismo el de mayor complejidad molecular de los cinco compuestos estudiados.

Los resultados obtenidos en la comprobación del poder viricida de las sustancias que hemos estudiado, permiten separarlas en dos grupos: el primero de ellos, desprovisto de acción viricida, en el que agruparemos el bromuro de tetra-etil-amonio, el bromuro de tetra-metil-amonio y el cloruro de bencil-trimetil-amonio; y el segundo grupo, caracterizado por su marcada actividad frente a los virus ensayados, en el que se encuentran el cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y el cloruro de cetil-trimetil-amonio.

Como resumen de los resultados obtenidos, presentamos en el cuadro 42 los datos en que más tarde se apoyarán nuestras conclusiones.

CONCLUSIONES

1.^a Los virus vacunal y encefalíticos equinos Oeste y Este debidamente estabilizados por liofilización y con los títulos respectivos de 10^{-6} , $10^{-3,68}$ y $10^{-4,68}$, se han mostrado como testigos eficaces en las pruebas de actividad viricida de los compuestos de amonio cuaternario, objeto del trabajo.

2.^a El bromuro de tetra-etil-amonio, el bromuro de tetra-metil-amonio y el cloruro de bencil-trimetil-amonio no tienen actividad viricida.

3.^a El cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio es tóxico a concentraciones mayores de 1/1.000 por vía intradérmica en conejo, y de 1/2.000 por vía intracerebral en ratón. El cloruro de cetil-trimetil-amonio es tóxico a concentraciones mayores de 1/1.000, por vía intradérmica en conejo e intracerebral en ratón.

4.^a El cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y el cloruro de cetil-trimetil-amonio a las diluciones de 1/1.000 para el virus vacunal y de 1/2.000 y 1/1.000, respectivamente, para los virus encefalíticos equinos Oeste y Este, presentan una manifiesta actividad viricida.

5.^a El cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y el cloruro de cetil-trimetil-amonio sufren interferencias por la sustancia orgánica, que reduce su actividad de 60 a 80 veces.

6.^a Las temperaturas entre 4° C. y 37° C. no modifican la actividad viricida de los citados compuestos.

NOTA

Respecto a los porcentajes de muertes que se recogen en los cuadros correspondientes, aunque solamente se indican los días en que ocurrieron las muertes, la observación y los porcentajes totales se refieren a un periodo de quince días.

RESUMEN

Se hace un estudio experimental sobre la actividad viricida de los siguientes compuestos de amonio cuaternario: bromuro de tetra-metil-amonio, bromuro de tetra-etil-amonio, cloruro de bencil-trimetil-amonio, cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y cloruro de cetil-trimetil-amonio.

A fin de controlar las posibles variables que pueden intervenir en estas experiencias se han estudiado con todo detalle: las posibles *interferencias* orgánicas y el *poder bactericida* frente a gérmenes existentes en linfa vacunal, y el grado de *toxicidad* para conejo por inoculación intradérmica y para ratón por inoculación intracerebral, para las sustancias problema. Por otra parte, fueron *titulados* los virus empleados, a fin de conocer su actividad patógena, y se investigó su *resistencia* frente a las temperaturas utilizadas en los ensayos de contacto (4° C., 20° C. y 37° C.) en tiempos de veinte minutos, una hora, veinticuatro horas y cuarenta y ocho horas.

Los virus utilizados fueron el vacunal con título de 10^{-6} , el encefalítico equino Oeste con DL_{50} de $10^{-3,68}$ y el encefalítico equino Este con DL_{50} de $10^{-4,68}$.

Se puede concluir, para los detergentes de amonio cuaternario utilizados, en relación con la determinación de su toxicidad, que:

a) El bromuro de tetra-metil-amonio, bromuro de tetra-etil-amonio y cloruro de bencil-trimetil-amonio, para inóculos de 0,2 cm³, no producen lesiones en el conejo por vía intradérmica a dilución de 1/100 y lo mismo se puede decir del cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y cloruro de cetil-trimetil-amonio para la dilución 1/1.000. Referente a toxicidad en

ratón por vía intracerebral, en dosis de 0,03 cm³, se puede afirmar que no son tóxicos el bromuro de tetra-etil-amonio al 1/500; el bromuro de tetra-metil-amonio, el cloruro de bencil-trimetil-amonio y el cloruro de cetil-trimetil-amonio al 1/1.000, y el cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio al 1/2.000, escala de toxicidad paralela en su mayor complejidad molecular y actividad frente a los microorganismos.

b) Fue valorada la interferencia que sufren en su actividad cuando se ponen en contacto con la linfa vacunal, reduciéndose aquella de 60 a 80 veces respecto a su actividad frente a los microorganismos aislados de dicha linfa.

c) El bromuro de tetra-metil-amonio, bromuro de tetra-etil-amonio y cloruro de bencil-trimetil-amonio no presentaron acción frente a los virus vacunal y encefalíticos equino Oeste y Este a las concentraciones ensayadas no tóxicas. Por el contrario, se observó neta actividad viricida del cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio y del cloruro de cetil-trimetil-amonio, bastando tiempos de contacto de veinte minutos para lograr esta acción, excepto en el caso del virus encefalítico Este, que precisa de un contacto de veinte minutos a una hora. La temperatura a que se efectúan los contactos (entre 4° C. y 37° C.) no influyó en los resultados.

SUMMARY

A study is made of the *in vitro* antiviral activity from the ammonium quaternary compounds: Benzyltrimethylammonium chloride, tetraethylammonium bromide, tetramethylammonium bromide, cetyldimethylbenzylammonium chloride and cetyltrimethylammonium chloride.

In this work is measured the inhibitory power of organic matter in relation to these compounds. Their toxicity is studied by intradermal injection into rabbits and by intraneural injection into mice.

The viruses used were: vaccinia virus with lesional activity up to 10⁻⁶, Eastern equine encephalomyelitis virus DL₅₀ 10^{-3.68} and Eastern equine encephalomyelitis virus DL₅₀ 10^{-4.68}.

A study is made about the resistance of both the encephalomyelitis viruses in relation to several temperatures during 20 min., 1 hr., 24 hr., and 48 hr.

Tetraethylammonium bromide, tetramethylammonium bromide and benzyltrimethylammonium chloride, did not show any action in relation to the viruses used.

We observed antiviral activity of cetyldimethylbenzylammonium chloride and cetyltrimethylammonium chloride, being sufficient a contact of 20 min., except in the case of Eastern equine encephalomyelitis which needs a minimum contact of 1 hr.

The temperature in which the contacts are made was between 4° C. and 37° C. after the results.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, A.; ITATANI, M. K., y MOULDER, J. W. 1952. The effect of trypsin and other enzymes on feline pneumonitis virus. *J. Infecto. Dis.*, 91, 184.
2. CALMETTE y GUERIN. 1901. *Ann. Inst. Pasteur*, 8, 161.
3. CROWLEY, J. J., y JACKSON, G. F. 1951. Anterior poliomyelitis; treatment of bulbar and cervical lesions by intravenous aureomycin and amigen; management in a general hospital. *Med. Times*, 79, 280.
4. DOMAGK, G. 1935. Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Dtsch. med. Wschr.*, 61, 829.
5. DUCOR, D. H. 1947. An improved method of producing Smallpox vaccine of low bacterial count. *U. S. Public Hlth. Rep.*, 62, 565.
6. FABER, H. K., y DONG, L. 1953. Virucidal activity of some common surface antiseptics, with special reference to poliomyelitis. *Am. J. Dis. Child.*, 86, 469.
7. GALLARDO, E. 1945. Nuevas aportaciones al conocimiento del virus vacunal. *Publicaciones del C. S. I. C.*
8. GARCÍA GANCEDO, A. 1955. Obtención de antígenos y sueros hiperinmunes de las encefalitis de San Luis, Japonesa, B, equinas Este y Oeste y ensayos de fijación de complemento con los mismos. *Microbiol. Españ.*, 8, 15 y 101.
9. GROTH. 1929. *Ergebn. Hyg. Bakt.*, 10, 355.
10. HAMMON, W. M., y REVES, W. C. 1945. Certain bacteriostatic agents added to sera used in diagnostic tests for neurotropic virus infections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 60, 84.
11. HORNUNG, H. 1935. Zephirol, eine neues Desinfektionsmittel. *Zeit. Immunitätsforsch.*, 84, 119.
12. JACOBS, W. A. 1916. The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. *J. Exp. Med.*, 23, 563.

13. KAISER, M. 1937. Ueber eine ökonomische Art von Blatternimpfstoffbereitung. Wien. Klin. Wschr., 2, 75.
14. KAISER, M. 1951. Ueber einen Kochfesten vaccinestamm. Arch. ges. Virusforsch., 4, 187.
15. KALTER, S. S.; MORDAUNT, Y., y CHAPMAN, O. D. 1946. The isolation of *Escherichia coli* phage by means of cationic detergents. J. Bact., 52, 237.
16. KLEIN, M. 1956. The evaluation of the virucidal activity of germicides. Proc. Chem. Specialties Manufacturers Assoc., May, 98.
17. KLEIN, M.; KALTER, S. S., y MUDD, S. 1945. The action of synthetic detergents upon certain strains of bacteriophage and virus. J. Immunol., 51, 389.
18. KLEIN, M., y STEVENS, D. A. 1945. The *in vitro* and *in vivo* activity of synthetic detergents against influenza A virus. J. Immunol., 50, 265.
19. KNIGHT, C. A., y STANLEY, W. M. 1944. The effect of some chemicals on purified influenza virus. J. Exp. Med., 79, 291.
20. LAUFFER, M. A., y GELLER, J. H. 1950. Destruction of influenza A virus infectivity by amino compounds. Arch. Biochem., 25, 363.
21. MAIER, E. 1939. Preparation of biological fluids with alkyldimethylbenzylammonium Cl. J. Bact., 38, 33.
22. MANNICH, C., y HAHN, F. L. 1911. Ueber eine Synthese von α -Aminoketonen mittels Hexamethylentetramin. Ber. dtsh. chem. Ges., 44, 1542.
23. Personnel of U. S. Naval Laboratory Research Unit n.º 1. 1942. A method for the removal of bacterial contaminants from suspensions of influenza virus. Science, 96, 534.
24. REED y MUENCH. 1938. Amer. J. Hyg., 27, 493.
25. RIDENOUR, G. M., y ARMBRUSTER, E. H. 1948. Some factors affecting the properties of quaternary ammonium compounds as sanitizers. Am. J. Pub. Hlth., 38, 504.
26. SANDER. 1934. ImmunForsch., 83, 215.
27. SCHNEIDER, G. 1935. Untersuchungen über das Desinfektionsmittel Zephirol. ImmunForsch., 85, 194.
28. TOOMEY, J. A., y TAKACS, W. S. 1945. Effect of cationic detergents in cotton rats: neutralizing effect of cetamium against poliomyelitis virus. Arch. Pediat., 62, 337.
29. U. S. Navy Medical Research Unit n.º 1. 1946. Studies on the primary isolation of influenza viruses U. S. Naval Med. Bull., 46, 369.
30. VINNARD, R. T. 1951. The local treatment of dog bites. Med., 10, 332.
31. WORLEY, G. 1951. Rabies prophylaxis in the human. Wisconsin Med. J., 50, 885.

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

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

(Conclusión)

POR

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

NEUROVACUNA

La suspensión original de virus de la neurovacuna procedente de un triturado de cerebro de conejo se titula en capa monocelular de cultivo de células HeLa en MCA (*) y por punturas en piel de conejo.

Se encuentra que es más sensible a la neurovacuna la MCA, después la piel de conejo y por último las células HeLa. En MCA da un título de $1,8 \times 10^6$ y en células HeLa $2,9 \times 10^2$, siendo inferior en 4 unidades logarítmicas.

Curva de crecimiento de neurovacuna en células HeLa

Se obtiene de la misma forma que para la dermovacuna. Los resultados se indican en la figura 2.

Como puede verse, también en este caso la máxima cantidad de virus se encuentra en el interior de las células, no empezando a liberarse virus al medio hasta las veintiséis horas.

(*) Membrana corioalantoidea.

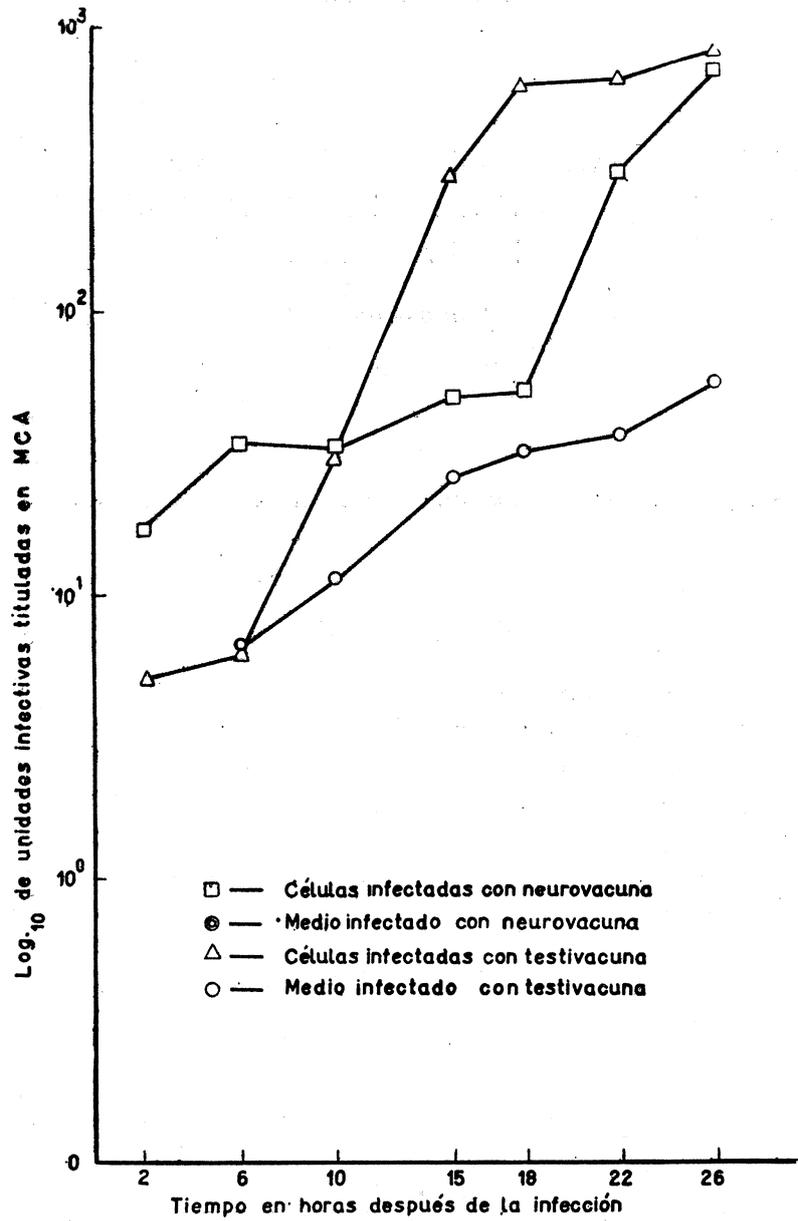


Figura 2. Crecimiento del virus vacunal en células HeLa

Pases realizados con neurovacuna en células HeLa

Se inocula un frasco con capa monocelular con una suspensión de virus con un título para célula HeLa de $2,9 \times 10^2$; 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 el medio de cultivo.

Se observan los efectos citopatogénicos sobre las células; a los seis días de la infección están redondeadas, con bordes marcados, pero no son tan grandes como con la dermovacuna. En el segundo pase los efectos son más marcados que en el primero y aparecen antes.

Se hacen 25 pases consecutivos, lo mismo que con la dermovacuna, titulando los pases 15, 20 y 25, según el cuadro 2.

Cuadro 2

	Titulación en conejo								Titulación en M.C.A. Núm. partículas infectivas/ cm^3
	Diluciones del virus (diámetro de las lesiones en mm.)								
	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	
Título del filtrado	26 N	22 N	20	13	8	0	0	0	$1,8 \times 10^6$
Pase 1									$5,0 \times 10^2$
Pase 15	25 N	23 N	21 N	17 N	10	8	0	0	$3,0 \times 10^6$
Pase 20	24 N	23 N	18	9	8	0	0	0	$4,5 \times 10^6$
Pase 25	30 N	24 N	20	18	9	8	0	0	$2,0 \times 10^7$

(*) Solución salina tamponada exenta de calcio y magnesio (Solución A de Dulbecco y Vogt).

El título MCA aumenta 5 unidades logarítmicas a partir del pase 1. Este crecimiento no es tan sensible en conejo.

A partir del tercer pase el virus se estabiliza, produciéndose la destrucción total del cultivo a los tres días, por término medio.

TESTIVACUNA

La cepa de testivacuna se titula, igual que las anteriores, en células HeLa, en MCA de embrión de pollo y por punturas en piel de conejo.

El virus dio la máxima reacción en conejo, al producir lesiones con la dilución más elevada.

En MCA dio un título de 5×10^7 y en células HeLa de $1,08 \times 10^2$.

Las células HeLa se han mostrado como las más resistentes para el virus de la testivacuna.

Curva de crecimiento de testivacuna en células HeLa

Se obtiene como ya se ha descrito en dermovacuna. Los resultados se indican en la figura 2.

La máxima cantidad de virus se encuentra en el interior de las células; empieza a liberarse el virus al medio hacia las seis horas y va aumentando hasta las veintiséis, en que da el máximo de liberación.

Pases realizados con testivacuna en células HeLa

Se inocula un frasco con células a partir del filtrado de testivacuna, de título $1,08 \times 10^2$. Se procede como ya se ha descrito.

Los efectos citopatógenicos se observan en las células a las veinticuatro horas y destrucción total al tercer día, en los cuatro primeros pases. A partir del quinto pase y hasta el catorce la destrucción total fue a las cuarenta y ocho horas. En los últimos diez pases la destrucción total de las células se realizó a las veinticuatro horas.

También se hacen 25 pases consecutivos, titulando los pases 15, 20 y 25. Véase el cuadro 3.

Cuadro 3

	Titulación en conejo								Titulación en M.C.A. Núm. partículas infectivas/cm ³
	Diluciones del virus (diámetro de las lesiones en mm.)								
	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	
Título del filtrado	33 N	27 N	25 N	23 N	15 N	12	11	9	5 × 10 ⁷
Pase 1									4 × 10 ⁴
Pase 15	29 N+	25 N	22 N	20 N	14 N	13	8	6	2,2 × 10 ⁶
Pase 20	26 N ⁺ +	24 N	20 N	11 N	10	6	5	0	1,27 × 10 ⁷
Pase 25	21 N+	19 N	15 N	10 N	9	6	0	0	1,85 × 10 ⁷

El título en MCA aumenta en 3 unidades logarítmicas a partir del pase 1, mientras que en conejo no ha variado sensiblemente.

CONCLUSIONES

Para dermovacuna y testivacuna es más sensible la piel de conejo, siguiendo MCA y células HeLa. Sin embargo, para neurovacuna es más sensible MCA, siguiendo piel de conejo y células HeLa. Para las tres cepas, como se ve, son las más resistentes las células HeLa. Estos resultados se refieren a las cepas vacunales antes de su cultivo en HeLa.

En las curvas de crecimiento del virus obtenido de las células se observa gran paralelismo entre dermovacuna y testivacuna; se alcanza cierta estabilización para dermovacuna a las veintidós horas y para testivacuna a las dieciocho. El crecimiento exponencial claro empieza en la dermovacuna a las diez horas y en la testivacuna a las seis horas. Para neurovacuna se observa menos paralelismo; el crecimiento exponencial empieza a las dieciocho horas y no hay estabilización a las veintiséis horas.

En el virus liberado al medio, las curvas de dermovacuna y testivacuna también son bastante paralelas, comenzándose a liberar antes de las

diez horas, y a las veintiséis horas se alcanza un título análogo. En neurovacuna sólo aparecen a las veintiséis horas.

Los efectos citopatogénicos para dermovacuna y testivacuna son semejantes y para neurovacuna más lentos. En dermovacuna y testivacuna la adaptación del virus a las células evoluciona de forma semejante, los primeros 5 pases presentan destrucción total del cultivo a los tres días, apareciendo efectos citopatogénicos a las veinticuatro horas; en los 10 pases siguientes la destrucción total se presenta a las cuarenta y ocho horas y en los últimos pases a las veinticuatro horas. En neurovacuna es más lenta la evolución, tardando en destruirse el cultivo seis días en los primeros pases, estabilizándose después en tres días.

El título MCA para dermovacuna aumenta 3 unidades logarítmicas a partir del pase 1; para testivacuna, 3 unidades, y para neurovacuna, 5 unidades.

Se observan inclusiones citoplasmáticas en células HeLa, del mismo tipo para los tres virus, y aparecen ya a las seis horas de cultivo.

RESUMEN

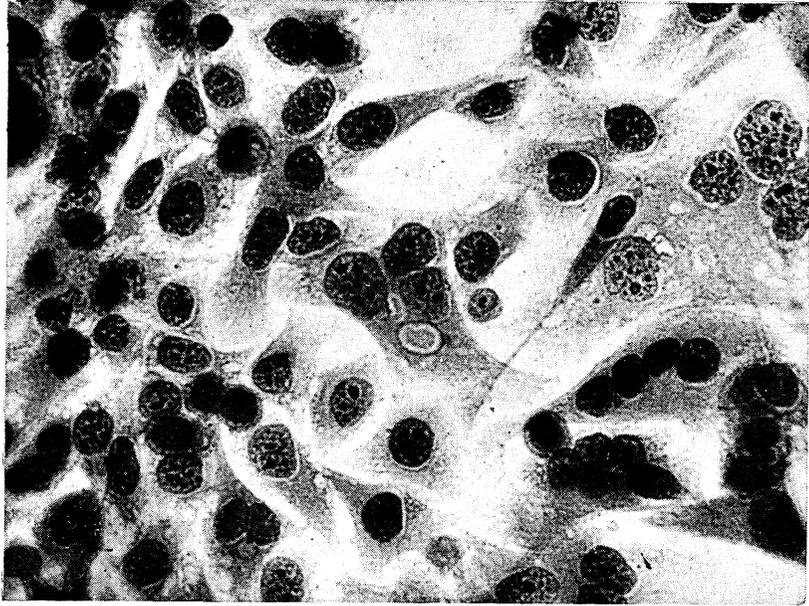
Se ha llevado a cabo un estudio comparativo acerca del comportamiento de varias cepas de virus vacunal sobre células HeLa. En condiciones idénticas, se comportan análogamente la dermovacuna y la testivacuna. Por el contrario, la neurovacuna se adapta más lentamente a estas células.

SUMMARY

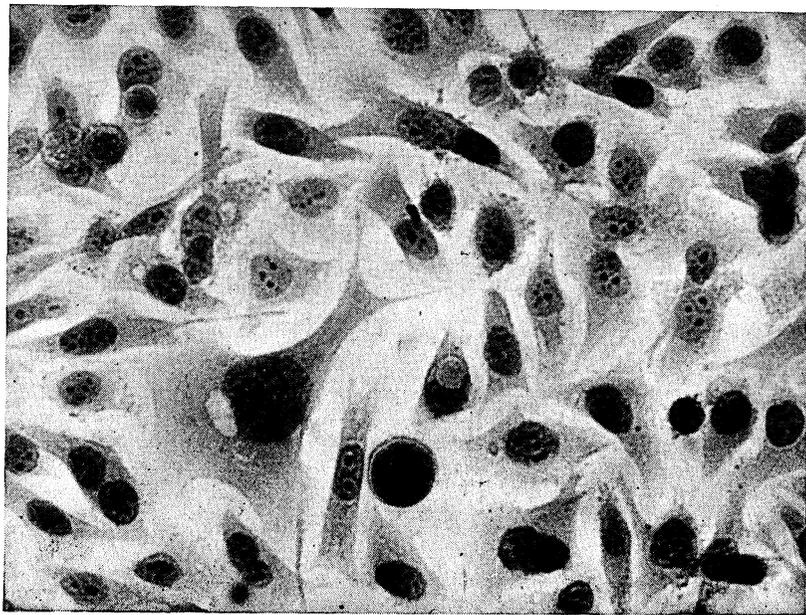
A comparative study has been made of the behaviour of different strains of vaccinia virus on HeLa cells. Under identical conditions the dermal strain of vaccinia passed in rabbit testes behave similarly. Neurovaccinia virus on the contrary is more slowly adapted to these cells.

BIBLIOGRAFIA

1. BENEDEK, A. L., y KEMPE, C. H. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 520.
2. BUTHALA, D. A., y MATHEWS, J. 1957. Cornell. Vet., 47, 143.
3. CARREL, A., y RIVERS, T. M. 1927. C. R. Soc. Biol., 96, 848.
4. CUTCHINS, E., y WARREN, J. 1958. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97, 456.
5. DULBECCO, R., y VOGT, M. 1954. J. Exp. Med., 99, 167.
6. FARNHAM, A. E. 1958. Virology, 6, 317.
7. FELLER, A. E.; ENDERS, J. F., y WELLER, T. H. 1940. J. Exp. Med., 72, 367.
8. GALLARDO, E., y SANZ, J. 1937. Presse Med., 139.
9. GROTH, A. 1929. Ergb. Hyg. Bakt., 10, 355.
10. HAAGEN, E. 1928. Zbl. Bakt., I, 109, 31.
11. HAFF, R. F., y SWIN, H. F. 1956. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93, 200.
12. HARDE, E. S. 1915. C. R. Soc. Biol., 78, 545.
13. LAVILLAUREIX, J. 1957. Ann. Inst. Pasteur, 92, 735.
14. LI, C. P., y RIVERS, T. M. 1930. J. Exp. Méd., 52, 465.
15. MAITLAND, H. B., y MAITLAND, M. C. 1928. The Lancet, 215, 596.
16. MAITLAND, H. B., y LAING, A. W. 1930. Brit. J. Exp. Path., 11, 119.
17. NADEJE, J.; TAMM, I., y OVERMAN, J. R. 1955. J. Lab. Clin. Med., 46, 648.
18. NOYES, W. F. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 426.
19. PARKER, F. J. 1924. J. Med. Res., 44, 645.
20. PLOTZ, H., y MARTÍN, R. 1936. Bull. Acad. Med. París, 116, 454.
21. RAMON, G.; RICHON, R.; THIERY, J. P.; SALOMON, L., y DOUCET, M. 1954. Rev. Immunol., 18, 1.
22. RIVERS, T. M., y WARD, S. M. 1933. J. Exp. Med., 58, 635.
23. RYDEN, W. R., y RANDALL, Ch. C. 1957. Am. J. Path., 33, 293.
24. SCHERER, W. F., y SYVERTON, J. T. 1954. Am. J. Path., 30, 1057.
25. SOLOVIEV, V. D., y MASTYUKOVA, Y. N. 1958. Vop. Virousol, 6, 342.
26. SOLOVIEV, V. D., y MASTYUKOVA, Y. N. 1959. Vop. Virousol, 4, 470.
27. STEINHARDT, E.; ISRAELI, C., y LAMBERT, R. A. 1913. J. Inf. Dis., 13, 294.
28. STOKER, M. G. P., y ROSS, R. W. 1958. J. Gen. Microbiol., 19, 250.
29. SUREAU, P.; DODIN, A., y BRYGOO, E. R. 1958. Ann. Inst. Pasteur, 95, 294.
30. SUREAU, P., y BRYGOO, E. R. 1959. Ann. Inst. Pasteur, 96, 343.
31. VIENCHANG, J.; DE BRION, G., y GRUEST, J. 1957. Ann. Inst. Pasteur, 93, 218.
32. WARREN, J., y CUTCHINS, E. 1957. Virology, 4, 297.
33. WEESLEN, T. 1953. VI Congreso Internacional de Microbiología de Roma, II, 115.



*Figura 3. Inclusiones citoplasmáticas en células HeLa infectadas con dermo-
vacuna, a las seis horas de la inoculación. Tinción con hematoxilina de
Harris-eosina*



*Figura 4. Inclusiones citoplasmáticas en células HeLa infectadas con dermo-
vacuna, a las doce horas de la inoculación. Tinción con hematoxilina de
Harris-eosina*

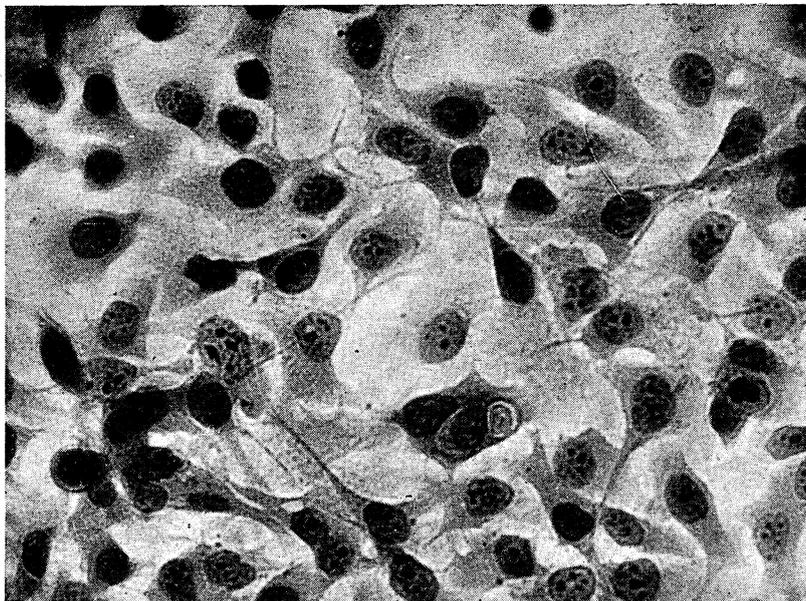


Figura 5. Inclusiones citoplasmáticas en células HeLa infectadas con neurovacuna, a las seis horas de la inoculación. Tinción con hematoxilina de Harris-eosina

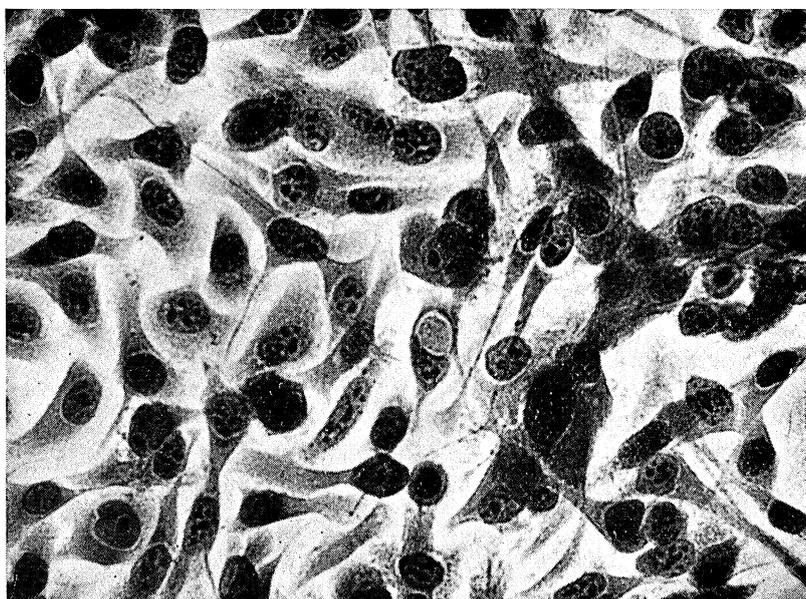


Figura 6. Inclusiones citoplasmáticas en células HeLa infectadas con neurovacuna, a las doce horas de la inoculación. Tinción con hematoxilina de Harris-eosina

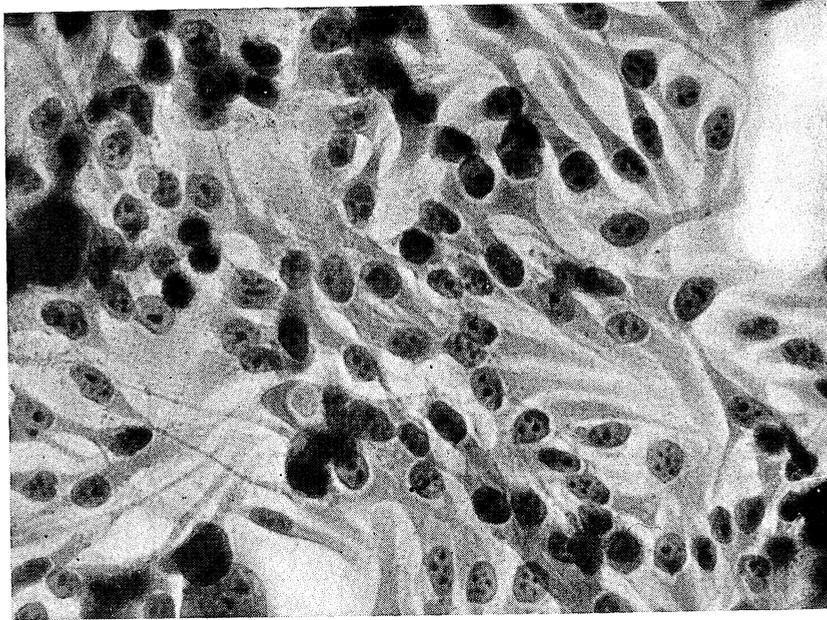


Figura 7. Inclusiones citoplasmáticas en células HeLa infectadas con testicularvacuna, a las doce horas de la inoculación. Tinción con hematoxilina de Harris-eosina

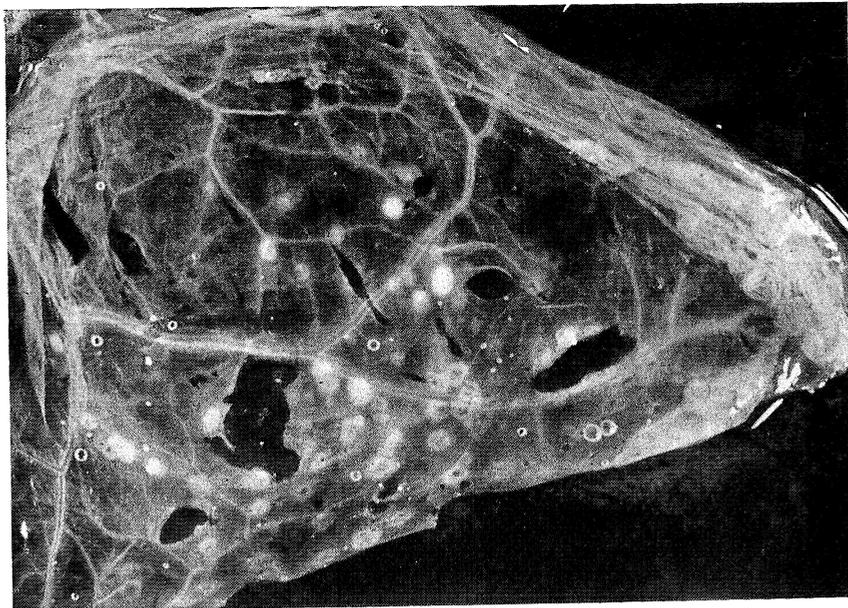


Figura 8. Lesiones en MCA infectada con dermoxvacuna, a las cuarenta y ocho horas de la inoculación

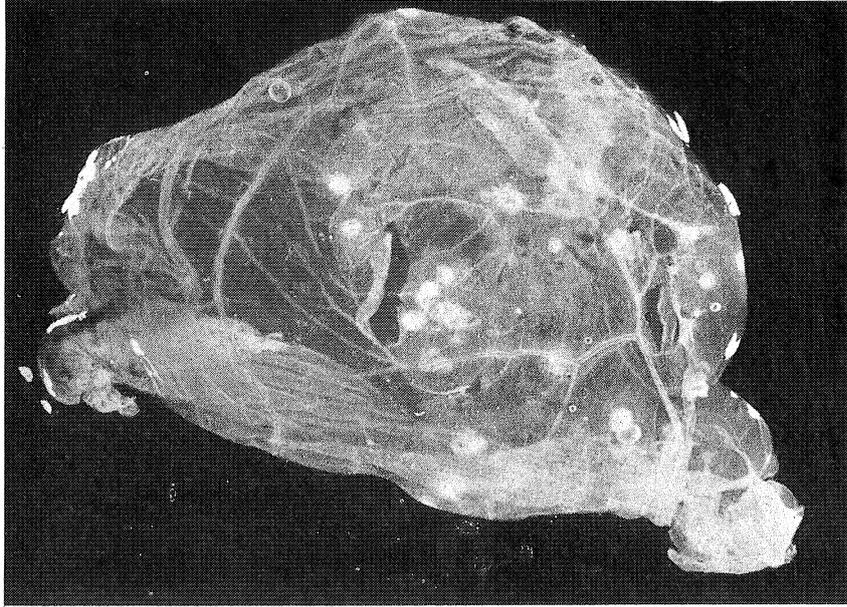


Figura 9. Lesiones en MCA infectada con neurovacuna, a las cuarenta y ocho horas de la inoculación

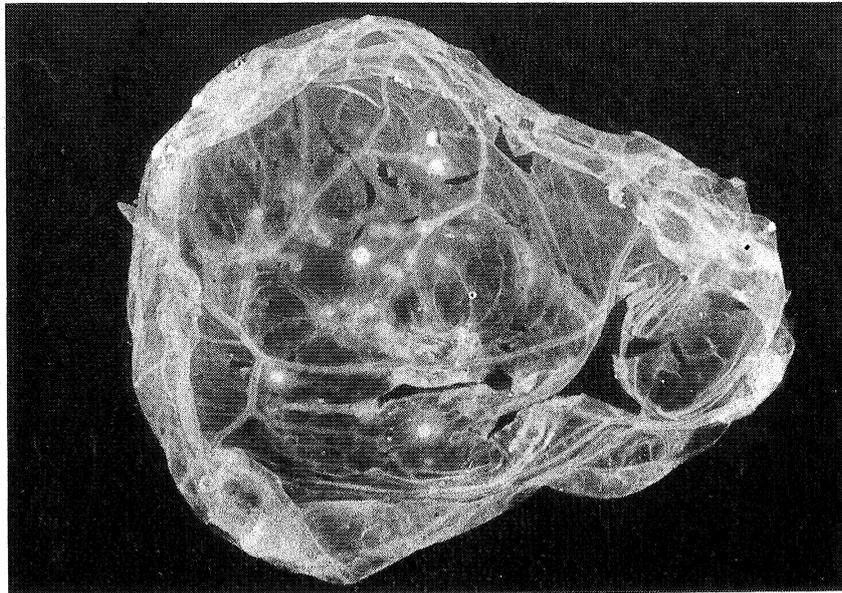


Figura 10. Lesiones en MCA infectada con testivacuna, a las cuarenta y ocho horas de la inoculación

ESTUDIOS SOBRE LA DEBARIOCIDINA

I. Acción *in vitro* sobre levaduras aisladas de enfermos tratados con antibióticos

POR

JULIO PEREZ SILVA y ROSARIO GIL ALVAREZ

En una comunicación anterior (1) dábamos cuenta del hallazgo de un nuevo antibiótico —para el que propusimos el nombre de debariocidina— que mostraba actividad contra las tres estirpes de *Candida albicans* existentes en la colección del Instituto “Jaime Ferrán”, de Microbiología, del C. S. I. C.

Dado que es precisamente *Candida albicans* el hongo que con mayor frecuencia se presenta en las micosis relacionadas con la antibioterapia (2, 3), nos pareció interesante probar la acción de la debariocidina frente a levaduras aisladas de casos patológicos tratados con antibióticos.

MATERIAL Y METODOS

Hemos trabajado con 68 estirpes de levaduras procedentes de micosis urinarias humanas subsiguientes a una antibioterapia más o menos prolongada (2). De estas 68 estirpes, 33 son de *Candida albicans*, 1 de *C. mycoderma*, 6 de *Rhodotorula glutinis*, 12 de *Torulopsis candida*, 7 de *T. famata*, 1 de *T. glabrata*, 6 de *T. versatilis* y 2 de *Trichosporon cutaneum* (*).

Probamos la actividad *in vitro* por el procedimiento de los cilindritos, ya descrito (1), empleando como medio de cultivo el agar-malta e incubando a 37° C.

(*) Estas levaduras han sido aisladas por A. Portolés y clasificadas por E. Feduchy, quienes nos las han facilitado amablemente.

RESULTADOS

La debarioidina inhibe el desarrollo de todas las estirpes de *Candida albicans* probadas (cuadro 1) y no muestra actividad frente a las restantes levaduras que hemos utilizado en este trabajo.

Cuadro 1. Acción de la debarioidina sobre *Candida albicans*

Estirpe	Diámetro del halo, mm.	Estirpe	Diámetro del halo, mm.	Estirpe	Diámetro del halo, mm.
A 1	32	A 12	28	C 6	30
A 2	28	A 13	26	C 7	26
A 3	29	A 14	27	C 8	25
A 4	28	134 AP-AM	22	C 9	29
A 5	24	138 AP-AM	26	C 10	27
A 6	26	139 AP-AM	25	E 1	26
A 7	31	C 1	26	E 2	28
A 8	24	C 2	27	E 3	26
A 9	23	C 3	25	E 4	28
A 10	26	C 4	26	E 5	26
A 11	24	C 5	29	E 6	27

CONSECUENCIAS

A la vista de este cuadro, donde se detalla la acción de la debarioidina sobre cada una de las 33 estirpes de *Candida albicans* probadas, y teniendo en cuenta la incidencia cada vez mayor de las moniliasis relacionadas con la antibioterapia, consideramos de gran interés estos resultados en el sentido de que justifican un posterior trabajo encaminado al estudio de las posibilidades de aplicación de nuestro antibiótico en Medicina.

RESUMEN

Se prueba la acción *in vitro* de la debarioidina frente a 68 estirpes de diferentes especies de levaduras aisladas de afecciones de las vías urinarias humanas tratadas con antibióticos. Nuestro antibiótico presenta una clara acción inhibitoria sobre las estirpes de *Candida albicans*, mientras que no se observa efecto alguno sobre las restantes levaduras probadas.

SUMMARY

The *in vitro* action of debarioidin was tested against the following microorganisms: *Candida albicans* (33 strains), *C. mycoderma* (1 strain), *Rhodotorula glutinis* (6 strains), *Torulopsis candida* (12 strains), *T. famata* (7 strains), *T. glabrata* (1 strain), *T. versatilis* (6 strains) and *Trichosporon cutaneum* (2 strains).

The above organisms were isolated from urinary tract affections which had been treated by antibiotics. The 33 strains of *C. albicans* were the only sensitive organisms to the new antibiotic.

BIBLIOGRAFIA

1. PÉREZ SILVA, J., y LAHOZ, R. 1958 Nota previa acerca de un nuevo antibiótico. Microbiol. Españ., 11, 255-263.
2. PORTOLÉS, A., y FEDUCHY, E. 1959. Micosis urinarias subordinadas a la presencia de sustancias antibióticas. Microbiol. Españ., 12, 199-242.
3. SOCÍAS, A., y PORTOLÉS, A. 1955. Micosis relacionadas con la antibioterapia. Microbiol. Españ., 8, 433-468.

EL PREMIO «FRANCO», DE CIENCIAS

Ha sido concedido el Premio «Francisco Franco», de Ciencias, 1959, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, al trabajo «Microscopía normal y electrónica de las inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas», del que es autor el Dr. Miguel Rubio Huertos, Investigador Científico, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, y Vocal de la Junta Directiva de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15 - Madrid