

VOLUMEN 13. 1960

OCTUBRE - DICIEMBRE. NUMERO 4

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
EXCHANGE DESIRED

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 Aclimatación. 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
Las zonas poco densas a los electrones en cortes ultrafinos de bacterias y su relación con los núcleos bacterianos, por <i>Miguel Rubio-Huertos y Paul R. Desjardins</i>	329
Efectos producidos por el telurito potásico sobre el desarrollo de los <i>Azotobacter</i> en medios de cultivo sólidos, por <i>V. Callao y E. Montoya</i>	351
Termorresistencia y activación del virus vacunal, por <i>Angel P. García-Gancedo y Carmen Gil</i>	361
Estudios sobre la debarioidina. II. Influencia de la relación superficie/volumen en la producción, por <i>Julio Pérez Silva y Rosario Gil Alvarez</i>	381
The growth of <i>Nocardia V.</i> on various aromatic compounds, by <i>Julio Rodríguez-Villanueva</i>	387
Desarrollo de la resistencia a penicilina, estreptomycin y aureomicina en <i>Mycobacterium phlei</i> y <i>Escherichia coli</i> , por <i>Genoveva Tejerina</i>	393
Un método rápido y sencillo para el aislamiento de nuevos microorganismos productores de antibióticos, por <i>Emilio Muñoz Ruiz y Julio Rodríguez-Villanueva</i>	409

Microbiología Española

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

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.

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID, 6 (ESPAÑA)

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

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

INDICE

	Páginas
Actas de la Sociedad	223
<i>Alonso, M.^a Luisa, y Portolés, A.</i> —Comportamiento de la flora bacteriana aeróbica de lactantes frente a los antibióticos...	101
<i>Alonso, M.^a Luisa.</i> —Véase <i>García-Gancedo, A. P.</i>	
<i>Alonso, M.^a Luisa.</i> —Véase <i>Gil, Carmen.</i>	
<i>Callao, V., y Montoya, E.</i> —Efectos producidos por el telurito potásico sobre el desarrollo de los <i>Azotobacter</i> en medios de cultivo sólidos	351
<i>Desjardins, P. R.</i> —Véase <i>Rubio-Huertos, M.</i>	
El Premio “Francisco Franco”, de Ciencias	327
<i>Gallardo, E.</i> —Véase <i>García-Gancedo, A. P.</i>	
<i>Gallardo, E.</i> —Véase <i>Gil, Carmen.</i>	
<i>García-Gancedo, A. P.; Alonso, M.^a Luisa, y Gallardo, E.</i> —Ensayos con el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) sobre los virus rábico fijo, poliomiéltico, vacunal y encefalítico equino Oeste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	31
<i>García-Gancedo, A. P.; Alonso, M.^a Luisa, y Gallardo, E.</i> —Ensayos con el indol-3-acético sobre los virus rábico fijo, poliomiéltico, vacunal y encefalítico equino Oeste, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	49
<i>García-Gancedo, A. P.</i> —Véase <i>Gil, Carmen.</i>	
<i>García-Gancedo, A. P., y Gil, Carmen.</i> —Termorresistencia y activación del virus vacunal	361
<i>Gil, Carmen; García-Gancedo, A. P.; Alonso, M.^a Luisa, y Gallardo, E.</i> —Estudio comparativo de diversas cepas de virus vacunal cultivadas sobre células HeLa. (Conclusión.)	311
<i>Gil, Carmen.</i> —Véase <i>García-Gancedo, A. P.</i>	
<i>Gil, Rosario.</i> —Véase <i>Pérez-Silva, J.</i>	
<i>Montoya, E.</i> —Véase <i>Callao, V.</i>	
<i>Morales, J.</i> —Nuevo estudio biológico del género <i>Azotobacter</i> (descubrimiento de sus formas L)	59
<i>Morales, J.</i> —Nuevo estudio biológico del género <i>Azotobacter</i> (descubrimiento de sus formas L). (Conclusión.)	111
<i>Moreno, R.</i> —Véase <i>Rubio-Huertos, M.</i>	
<i>Muñoz, E., y Rodríguez-Villanueva, J.</i> —Un método rápido y sencillo para el aislamiento de nuevos microorganismos productores de antibióticos	409

Otero, R., y Regueiro, B.—Estudios sobre el metabolismo enzimático del <i>Streptomyces griseus</i> . II. Actividad α -manosídásica	15
Otero, R., y Regueiro, B.—Estudios sobre el metabolismo enzimático del <i>Streptomyces griseus</i> . III. Actividad fosfatásica.	225
Otero, R., y Regueiro, B.—Estudios sobre el metabolismo enzimático del <i>Streptomyces griseus</i> . IV. Actividad lipásica	241
Pérez Silva, J., y Gil, Rosario.—Estudios sobre la debariociidina. I. Acción <i>in vitro</i> sobre las levaduras aisladas de enfermos tratados con antibióticos	323
Pérez Silva, J., y Gil, Rosario.—Estudios sobre la debariociidina. II. Influencia de la relación superficie/volumen en la producción	381
Portolés, A.—Véase Alonso, M. ^a Luisa.	
Primer Congreso Internacional de Histoquímica y de Citoquímica	100
Regueiro, B.—Véase Otero, R.	
Regueiro, B.—Véase Vaamonde, Ramona.	
Rodríguez-Villanueva, J.—Characterization of a newly isolated strain of Actinomycete identified as <i>Nocardia</i> V.	169
Rodríguez-Villanueva, J.—The growth of <i>Nocardia</i> V. on various aromatic compounds	387
Rodríguez-Villanueva, J.—Véase Muñoz, E.	
Ronda, E.—Estudio de la acción de varios compuestos de amonio cuaternario frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Este y Oeste	187
Ronda, E.—Estudio de la acción de varios compuestos de amonio cuaternario frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Este y Oeste. (Conclusión.)	257
Rubio-Huertos, M. y Moreno, R.—Bibliografía... ..	93
Rubio-Huertos, M., y Desjardins, P. R.—Las zonas poco densas a los electrones en cortes ultrafinos de bacterias y su relación con los núcleos bacterianos	329
Sánchez, L.—Conferencia en la Academia de Ciencias de Nueva York	221
Tejerina, Genoveva.—Desarrollo de la resistencia a penicilina, estreptomycin y aureomicina en <i>Mycobacterium phlei</i> y <i>Escherichia coli</i>	393
Vaamonde, Ramona, y Regueiro, B.—Estudios sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos en las bacterias. IV. Influencia de algunos factores sobre la actividad enzimática de filtrados de bacterias en el ácido ribonucleico (ARN)	I

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
CITRUS EXPERIMENT STATION. RIVERSIDE, CALIFORNIA

LAS ZONAS POCO DENSAS A LOS ELECTRONES EN CORTES ULTRAFINOS DE BACTERIAS Y SU RELACION CON LOS NUCLEOS BACTERIANOS (*)

POR
MIGUEL RUBIO-HUERTOS y PAUL R. DESJARDINS

INTRODUCCION

Hasta hace unos quince años, aunque se había estudiado con detalle la morfología de la mayor parte de las bacterias, no se había concedido importancia al estudio de su estructura celular, principalmente por su pequeño tamaño y por ser consideradas casi siempre en su aspecto patógeno o fermentativo. Con el auge de la Bioquímica y sobre todo de los estudios de fisiología celular y el concepto de unidad bioquímica celular, se vio en las bacterias los elementos unicelulares ideales para estos estudios, comprendiéndose entonces la importancia de la investigación citológica bacteriana y su comparación con la de las células de organismos superiores. Técnicamente, los nuevos métodos de tinción de elementos nucleares de Robinow y el empleo del microscopio electrónico han contribuido enormemente a estas investigaciones, aunque algunos de los problemas planteados, como, por ejemplo, la localización del núcleo en las bacterias, no estén completamente resueltos.

En este trabajo intentamos aclarar las relaciones que puedan existir entre las estructuras vacuolares en las bacterias que en él describimos y los núcleos de células de tipo superior. Para mayor claridad cree-

(*) Un resumen de este trabajo ha sido publicado en Nature, 187, V, 1.043-1.044. 1960.

mos necesario presentar de antemano un breve resumen del estado actual del problema (*).

Hasta ahora, las observaciones con el microscopio electrónico, de secciones ultrafinas de numerosas especies de bacterias realizadas por diferentes investigadores, han demostrado un tipo de estructura común que puede resumirse como sigue: una pared celular bien definida, una membrana citoplasmática, el citoplasma granular con una o varias inclusiones de material más denso, y que han sido llamadas condrioides por Kelleberger, y, ocupando generalmente la parte central de la bacteria, una zona de forma irregular, que más adelante describimos en detalle, mucho menos densa a los electrones que el citoplasma. Los estudios realizados con el microscopio corriente, siguiendo los métodos de tinción de Robinow y algunas observaciones con el microscopio de contraste de fases, han llevado a la mayoría de los investigadores a asociar esta zona con el núcleo de la bacteria, habiendo sido llamada, por lo tanto, *Kernvacuole*, *Kernäquivalent*, nucleoide, focos nucleares y aparato nuclear. Las estructuras reticulares que a veces se encuentran dentro de esta zona, han sido consideradas como materia nuclear, ácido desoxirribonucleico y hasta han sido calificadas de cromosomas.

Según Murray (16), haciendo una recopilación de los últimos conocimientos sobre la estructura, naturaleza y localización del núcleo bacteriano, existen dos teorías que pretenden explicarlo:

- a) "El complejo cromatínico consiste en una ramificación continua, y el componente ADN (ácido desoxirribonucleico) encierra o recubre un componente más fino de ARN (ácido ribonucleico) y proteína, formando todo ello una estructura esponjosa situada dentro del citoplasma y ramificándose dentro de éste; dependiendo del metabolismo de la célula su grado de agregación o dispersión. Se cree que tal estructura esponjosa forma un caparazón parcial alrededor de una zona de citoplasma, formando una estructura central. No hay evidencia morfológica de que existan cromosomas".
- b) "El complejo cromatínico está contenido dentro de una zona de la célula, caracterizada por su baja densidad a los electrones y una red compleja de densas y muy finas fibras de ARN y proteínas. No se co-

(*) Para una información mayor sobre este tema se pueden consultar las revisiones sobre citología bacteriana en *Bacterial Anat.*, 6th Symposium Soc. Gen. Microbiol., 1956; *The Bacteria*, I, y *Ann. Rev. Microbiol.*

riocce la distribución del ADN dentro de esta red y la forma total y el estado de sus elementos pueden ser modificados por factores físicoquímicos, en estado vivo y durante la fijación. La zona que contiene la cromatina puede estar penetrada por ramificaciones o penínsulas del citoplasma, que pueden llegar a estar rodeadas completamente por la cromatina agregada, formando una zona densa central”.

Ya el hecho de que existan dos teorías sobre el núcleo de las bacterias y que su contenido sea realmente bastante vago, nos prueba dos cosas: primera, que todavía no se sabe exactamente cuál es la estructura del núcleo, ni donde está localizado en la bacteria; y segunda, que no se ha encontrado (o si se ha encontrado ha pasado desapercibida o ha sido confundida con alguna inclusión celular) estructura alguna en la bacteria que pueda ser comparada con los núcleos de levaduras, hongos y organismos superiores de los cuales se conoce bastante bien la morfología, localización y estructura.

MATERIALES Y METODOS

Hemos empleado células de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe B38, del Departamento de Fitopatología de la Universidad de Los Angeles (California), cultivadas durante cuarenta y ocho horas en agar-caldo en tubo inclinado, fijadas con permanganato potásico unas, y otras con ácido ósmico al 1 por 100 en tampón de acetato de veronal, lavadas e incorporadas en bloques de agar, que luego deshidratamos pasando por la serie de alcoholes, según las técnicas corrientes de deshidratación y, una vez deshidratados, incluimos en metacrilato que se endurece por medio de radiación ultravioleta durante doce horas. Los bloques de metacrilato se tallaron convenientemente con una hoja de afeitar para colocarlos en el ultramicrotomo.

Las secciones fueron cortadas con un ultramicrotomo Porter-Blum, con navaja de diamante.

Las microfotografías fueron hechas con un microscopio electrónico R. C. A., modelo E. M. U. 3B.

Como ejemplo de núcleos de un organismo superior, se deshidrataron trozos de tallo de *Lycopersicum esculentum*, después de fijar con ácido ósmico al 1 por 100 e incluyéndose en metacrilato, realizando los cortes y observación como en el caso de las bacterias.

Unos cortes se examinaron directamente, otros tras tinción con nitrato de lantano al 1 por 100 en alcohol etílico de 70 por 100, y otros disolviendo el metacrilato con benceno y sombreando con paladio los cortes libres.

RESULTADOS

A) Observaciones en secciones ultrafinas de células de A. tumefaciens, sin eliminar el metacrilato y tratadas algunas con nitrato de lantano.

En estos cortes se observaron las estructuras descritas por los diferentes autores, es decir, pared celular, que parece estar formada por dos capas bien definidas (figuras 1-2, P); membrana citoplasmática (figuras 1 y 2, m), estructura que hasta los trabajos de Chapman ha sido difícil de distinguir por microscopía electrónica; un citoplasma granular (figuras 1-4, C) y la zona poco densa a los electrones y que en las microfotografías que hemos obtenido presenta las siguientes características:

a) En la mayoría de los cortes esta zona clara no se encuentra localizada en el centro de la bacteria, sino distribuida por todo el protoplasto bacteriano (figuras 1-4). En otros casos esta zona aparece localizada en la parte central de la bacteria. En cortes extremadamente finos, el área fácilmente atravesada por los electrones ocupa la mayor parte del protoplasto bacteriano (figuras 4 y 9).

b) El contenido de las zonas claras, en algunos casos presenta como una finísima red de fibrillas con poco contraste, pero la mayoría de las veces la zona clara parece vacía, es decir, tiene un contraste igual al del fondo de la preparación, y no se observa ningún tipo de estructura en ella. Por último, dentro de estas zonas vacías se encuentran, a veces, masas de material más denso a los electrones que el citoplasma (figuras 5 y 6).

El nitrato de lantano no parece que se deposite selectivamente en ciertas estructuras, sino da solamente una mayor densidad a los electrones a todo el corte, consiguiéndose así una mejor resolución en las microfotografías, en comparación con los cortes sin tratar.

B) *Observaciones en secciones ultrafinas de A. tumefaciens de las que se ha eliminado el metacrilato y seguidamente han sido sombreadas con paladio.*

Las secciones embebidas en el metacrilato forman un bloque continuo. Al disolver el metacrilato el corte queda sobre el soporte de colodión o formvar con su relieve natural, que se puede hacer resaltar perfectamente con la técnica corriente de sombreado. De esta forma hemos podido comprobar que las zonas claras a los electrones corresponden a espacios vacíos, a huecos, dentro del citoplasma bacteriano, unidos o no entre sí, o formando una vacuola central cruzada por algunas fibras conectadas con el citoplasma, y algunos gránulos muy densos que surgen también del citoplasma (figuras 7-9).

El haber realizado cortes de grosor diferente nos ha permitido tener una idea de la posición de esta zona clara o vacuola en profundidad, no sobre un solo plano.

La pared celular, empleando esta técnica, aparece formada por gránulos o partículas esferoidales (figura 9). No se puede distinguir bien la membrana citoplasmática, aunque en algunos cortes muy finos, en los que la pared celular está bastante separada del protoplasto, se ve una estructura que pudiera corresponder a dicha membrana, que, por otra parte, aparece rota por varios sitios (figura 6, m), probablemente debido al ángulo del corte y lo fino de la sección.

C) *Observaciones en secciones ultrafinas de tallo tumoral de L. esculentum L., de las que se ha eliminado el metacrilato y seguidamente han sido sombreadas con paladio.*

Las células del *L. esculentum*, por su tamaño, apenas caben enteras en el campo del microscopio electrónico; sin embargo, en ellas se pueden apreciar claramente las siguientes características: una fuerte pared celular; un citoplasma compuesto de fibrillas y gránulos, formando una red muy tenue, rodeando y entrecruzándose a través de una gran vacuola que ocupa la mayor parte del protoplasto; diversos tipos de inclusiones: plastidios, mitocondrias, etc.; y el núcleo, que constituye una masa densa a los electrones, de un tamaño variable, pero más bien grande en estas células epiteliales y formado por una malla bastante tupida de fibrillas con engrosamientos esferoidales rodeadas por una membrana, que en

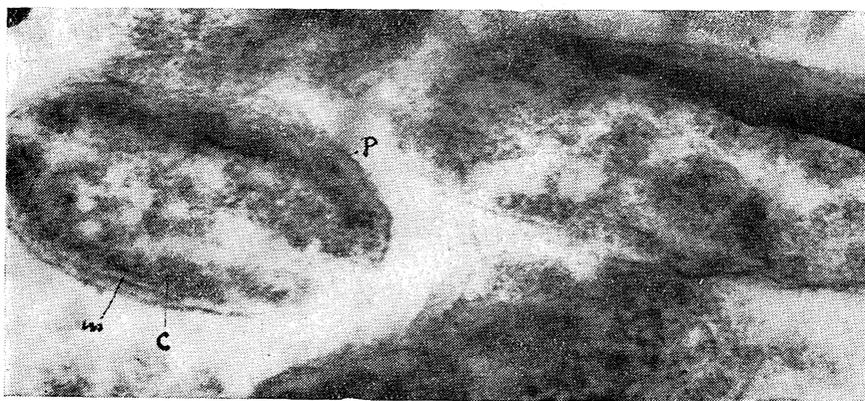
algunos puntos se puede observar con claridad (figura 3, m). El nucleolo, que se puede ver en la mayoría de los cortes, parece estar formado por un material granular muy fino y muy apretado, siendo más denso a los electrones que el núcleo (figuras 11, 12 y 14 n).

DISCUSION

De los resultados obtenidos con los cortes de *A. tumefaciens* se desprende una conclusión evidente, y es que las zonas poco densas a los electrones corresponden a vacuolas. En otras especies bacterianas se han descrito ya sistemas vacuolares: Houwink (8) mostró en *Halobacterium halobium* un sistema vacuolar complejo, no relacionado con el núcleo, y Knaysi, trabajando con *Mycobacterium thamnopheos*, concluyó que "el efecto destructivo de la hidrólisis ácida se debe atribuir a la presencia de vacuolas en las células de este organismo". En *Thiovulum majus*, Faure-Fremiet (4) observó por medio de secciones ultrafinas la presencia de vacuolas formando un sistema vacuolar que, en vida, parece estar formado por inclusiones de azufre.

Respecto a que los sistemas vacuolares pudieran estar relacionados con el núcleo de las bacterias, a pesar de que la mayoría de los investigadores (1-3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 y 18) consideran que esta zona vacuolar es o contiene al núcleo o equivalente nuclear, los trabajos de Knaysi (9) con *Bacillus cereus*, en el que observó la división y fusión de gránulos densos, indican que los núcleos corresponden a áreas más densas que el citoplasma, y que algunas de las llamadas inclusiones citoplasmáticas pudieran ser los verdaderos núcleos. Preusser (20), estudiando secciones ultrafinas de *Escherichia coli*, llegó a la conclusión de que las zonas de poca densidad a los electrones dentro de las células bacterianas, son productos del metabolismo celular y no se pueden comparar con los núcleos de organismos superiores.

Por otro lado, la correspondencia que parece haber entre las zonas claras observadas en cortes ultrafinos con el microscopio electrónico y el material nuclear teñido con el Feulgen, observado con el microscopio corriente, es debida, probablemente, al hecho de que al observar con el microscopio corriente se ve la célula bacteriana completa, y toda ella en foco al haber sido aplastada por la fijación o desecación contra el porta y siendo imposible, por lo tanto, el estar seguro de si el material teñido



Figuras 1 y 2. Secciones ultrafinas de *A. tumefaciens* incluídas en metacrilato. Se pueden observar la pared celular, P, la membrana citoplasmática, m, y la zona, poco densa a los electrones, de forma irregular. $\times 37.900$

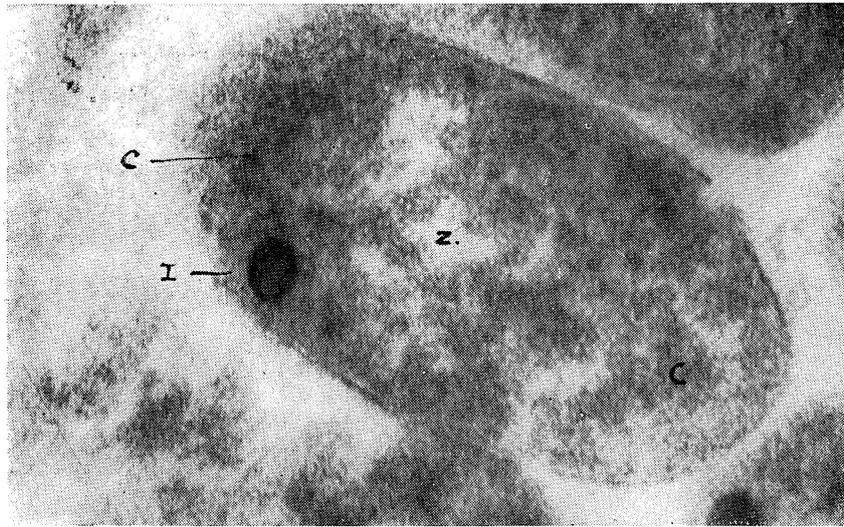


Figura 3. Igual que las anteriores. En ella se ve la zona poco densa y una inclusión densa en el citoplasma, I. $\times 50.000$

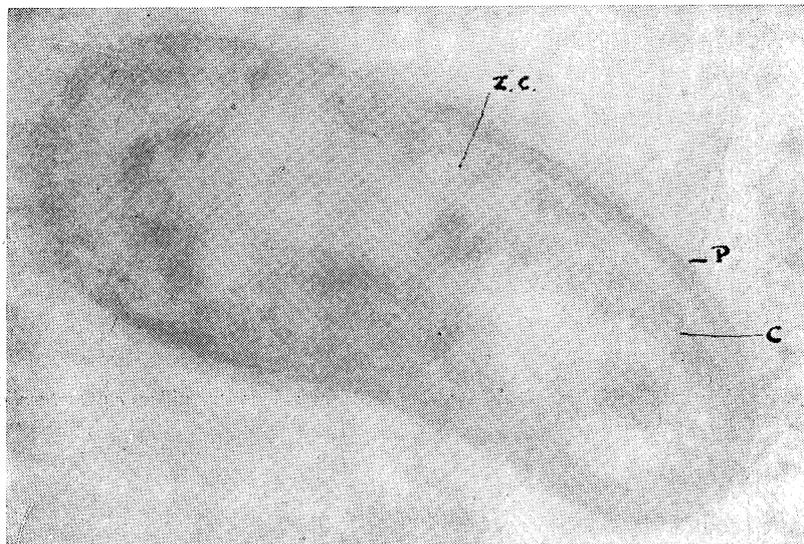
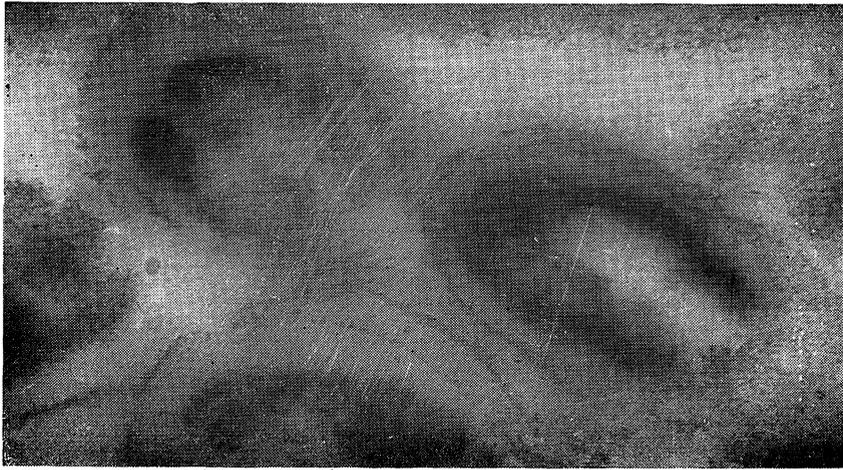
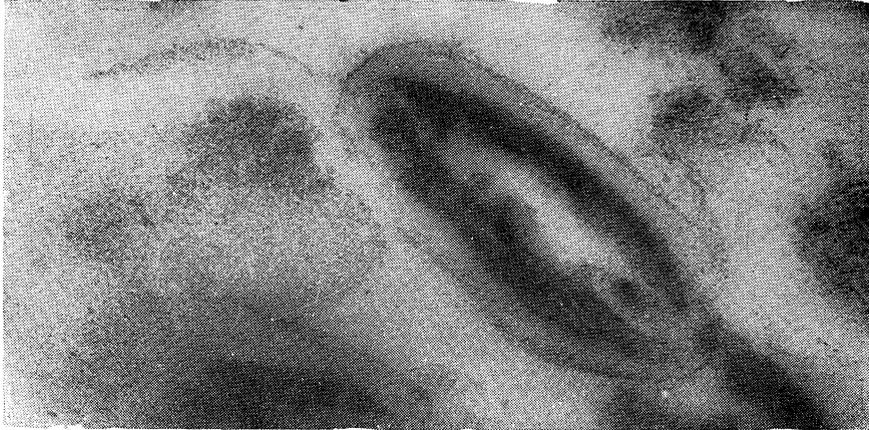


Figura 4. Una sección extremadamente fina en la que se pueden observar el citoplasma esponjoso y la zona poco densa extendida por toda la bacteria $\times 50.000$



Figuras 5 y 6. En estas secciones se observan vacuolas centrales y algunos corpúsculos densos dentro de las vacuolas. X 37.900



Figura 7. Secciones ultrafinas de A. tumefaciens de las que se ha eliminado el metacrilato. Se ve un grupo de células cortadas en diferentes planos, mostrando los huecos correspondientes a las vacuolas. X 10.500



Figura 8. Igual a la anterior, con mayor aumento. \times 34.000

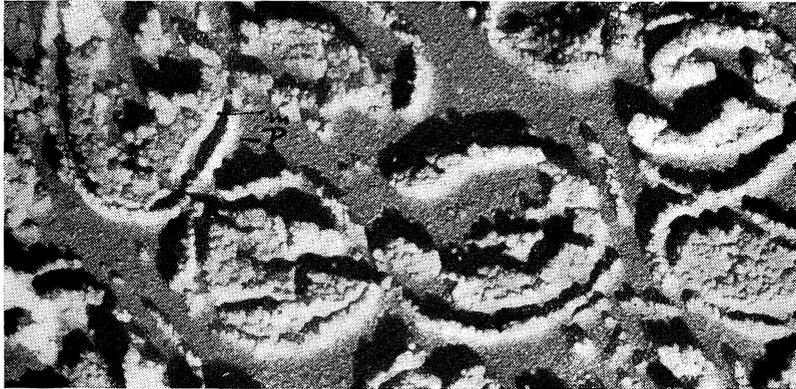


Figura 9. Secciones más finas que las anteriores y que permiten ver la estructura granular de la pared celular y la vacuola irregular. $\times 35.000$



Figura 10. Una bacteria de la cual se ha cortado solamente una pequeña capa superior que permite ver la estructura interna

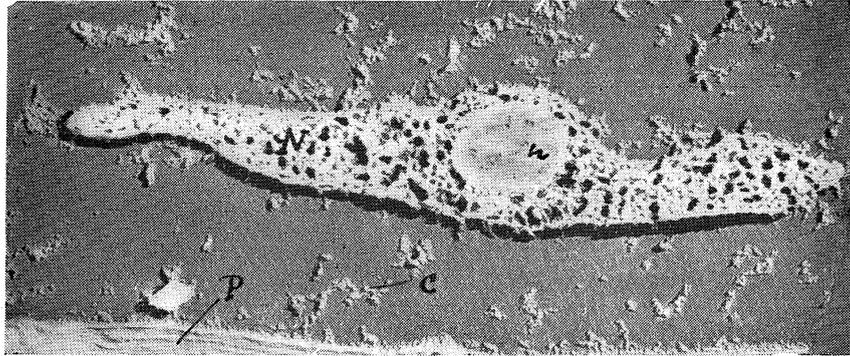


Figura 11. Núcleo de una célula de *L. esculentum*. P, pared celular; C, citoplasma; N, núcleo; n, nucleolo. $\times 6.500$

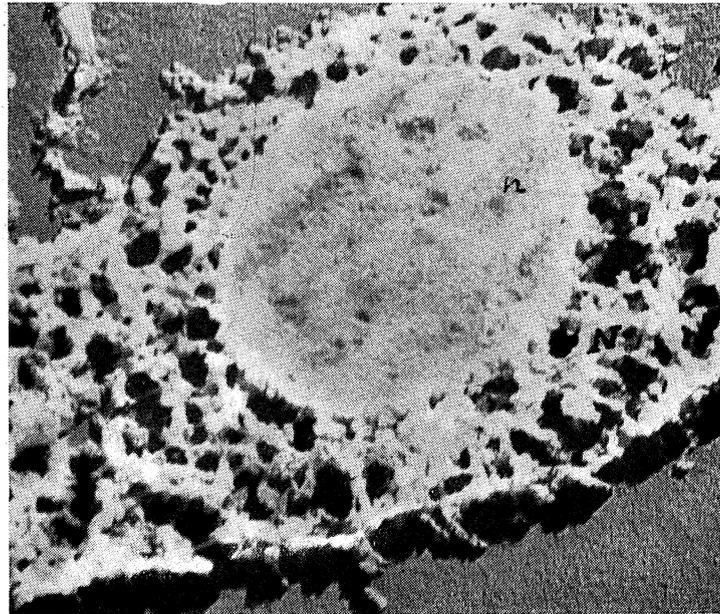


Figura 12. Mayor aumento de la parte central del núcleo de la figura 11 con el nucleolo en detalle. $\times 22.000$



Figura 13. Corte de otra célula de *L. esculentum*. No se observa el nucleolo. m, membrana nuclear. $\times 7.500$

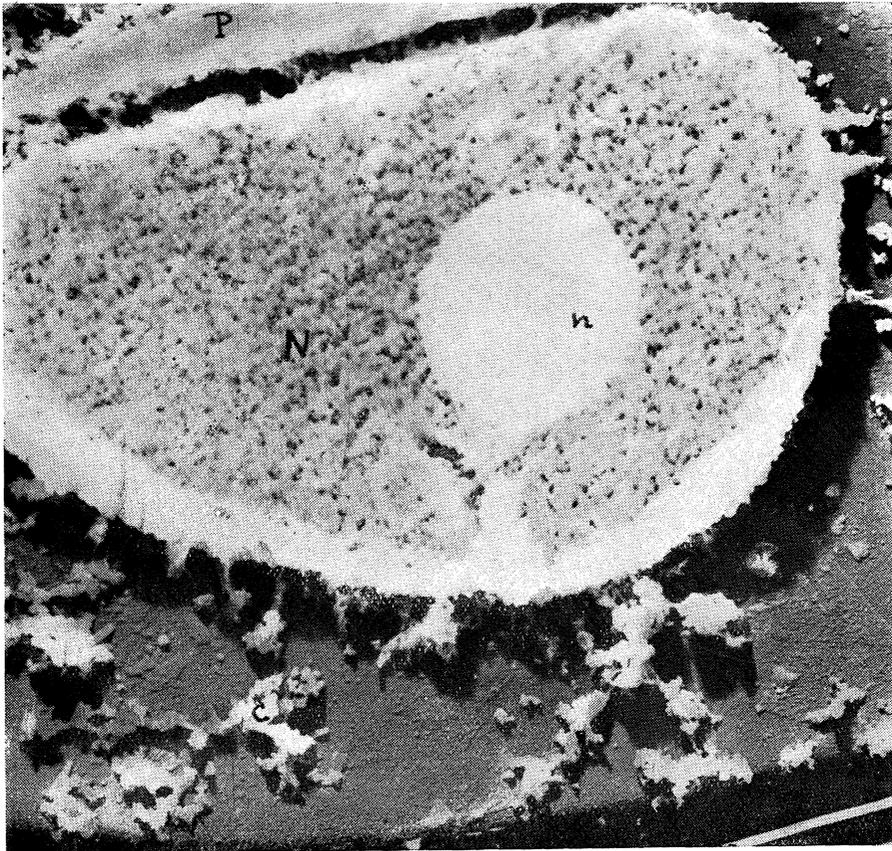


Figura 14. Un corte un poco más grueso de una célula de L. esculentum. $\times 10.000$

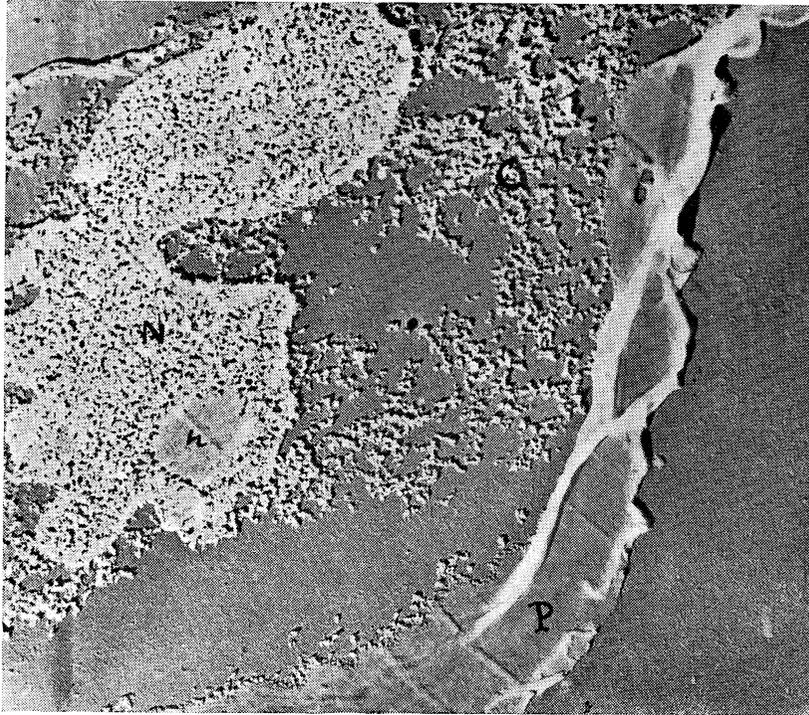


Figura 15. Célula de *L. esculentum* con un núcleo de forma irregular. $\times 6.500$

se encuentra dentro de estas zonas claras o dentro del citoplasma, por encima o por debajo de las vacuolas o zonas claras y aparece superpuesto sobre ellas.

Las imágenes que hemos obtenido de estas zonas claras en algunos cortes ultrafinos de *A. tumefaciens*, mostrando que esta zona clara se encuentra distribuída irregularmente por todo el protoplasto y entremezclada con el citoplasma, no parecen indicar correspondencia alguna con las imágenes obtenidas con la tinción nuclear de Feulgen o de Robinow, con el microscopio corriente.

Ryter y Kelleberger, en 1958 (21), observaron el efecto de soluciones salinas y diferentes métodos de fijación sobre el aspecto que presentan al microscopio electrónico las estructuras que aparecen dentro de esta zona clara, que ellos llaman zona nuclear, encontrando que según se fijen las células en ácido ósmico a pH 6, o pH 7 con iones cálcicos, o sean tratadas previamente con soluciones salinas, bacterias de la misma especie y de la misma edad pueden presentar estructuras diferentes, tales como retículos finos, en el caso de los iones cálcicos; glomérulos más densos que el citoplasma en el centro de la vacuola, cuando los cortes han sido previamente tratados con soluciones salinas; y otras, como la mayoría de las que nosotros hemos observado, en las que la zona vacuolar no contiene ninguna estructura visible. Todo esto parece afirmar que estas zonas poco densas a los electrones son realmente estructuras vacuolares que, en vivo, contendrán un líquido, en el que estarán disueltas o en suspensión cantidades mayores o menores de metabolitos de naturaleza variable, y entre éstos, probablemente en gran parte, proteínas y productos de su degradación, y que por el efecto de los fijadores, de la deshidratación y el proceso de inclusión en metacrilato dichos metabolitos se coagularán o precipitarán formando la serie de estructuras descritas y no responderán en todos los casos a la estructura en vivo, siendo, por lo tanto, artefactos, a los cuales creemos no se les puede atribuir el nombre de elementos nucleares, tal como hasta ahora se viene haciendo.

Ahora bien, si aceptamos que estas zonas claras son efectivamente elementos nucleares y corresponden a las que dan la reacción Feulgen positiva en tinciones para el microscopio correspondiente, es de suponer que su contenido sea una mezcla de ARN y ADN, predominando el segundo, y proteína, en concentraciones apreciables. sin embargo, sabemos que las estructuras que contienen nucleoproteínas o ácidos nucleicos

son bastantes densas a los electrones, siendo en la mayor parte de los casos más densas que el citoplasma y en otros, al menos, tan densas como éste (cortes de partículas de virus y núcleos de organismos superiores). Luego, si en estas vacuolas existen ácidos nucleicos, deben encontrarse en muy pequeña cantidad, lo que no concuerda con los análisis químicos que se han realizado, hasta ahora, en bacterias (14).

El no existir una membrana separando esta zona clara del resto de la célula es otro hecho que resalta la diferencia entre estas zonas claras y los núcleos que hasta ahora conocemos.

Si comparamos los núcleos de un microorganismo en el que los elementos nucleares son bien conocidos, como en el caso de las levaduras, vemos que en éstas la porción Feulgen positiva se encuentra dentro del citoplasma y no en la vacuola, como se pensaba hace unos años, y en secciones ultrafinas aparece como una zona de una densidad un poco mayor que el citoplasma y rodeada de una membrana bien definida (6). Los núcleos de organismos superiores presentan un aspecto parecido al descrito para la levaduras al ser observados en secciones ultrafinas al microscopio electrónico, presentando la mayoría de ellos, en fase de reposo, uno o varios nucleolos más densos aún que el material cromático. En el caso de los núcleos de *L. esculentum* que hemos estudiado, la mayor densidad a los electrones del núcleo y nucleolo en comparación con la del citoplasma, es bien patente.

Todas las consideraciones nos llevan a pensar que o bien la zona clara de las bacterias no corresponde al verdadero núcleo bacteriano y se trata solamente de un sistema vacuolar, como existe en la mayoría de las células, en cuyo caso el núcleo se encontraría dentro del citoplasma y sería de una densidad a los electrones sensiblemente igual a la del citoplasma, y por ello no se ha podido distinguir con los procedimientos empleados hasta ahora; o bien, si esta zona clara es verdaderamente el núcleo, es un núcleo de estructura y características muy diferentes de las conocidas en otros organismos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se han realizado observaciones con el microscopio electrónico sobre secciones ultrafinas de *Agrobacterium tumefaciens* siguiendo las técnicas corrientes y también tras disolver el metacrilato de los cortes y som-

brearlos con paladio, con lo cual se obtiene el relieve de dichos cortes.

Se han comparado los resultados con observaciones sobre cortes ultrafinos de células de *Lycopersicum esculentum* tratados de la misma forma. Los resultados obtenidos nos llevan a la conclusión de que las zonas internas de poca densidad a los electrones, de las células bacterianas son vacuolas o forman parte de un sistema vacuolar, como existe en la mayoría de las células vegetativas de organismos superiores, y dada su poca densidad a los electrones, lo que parece indicar la carencia de una concentración suficiente de ácidos nucleicos, su irregular distribución en la célula y falta de una membrana limitante no parecen tener relación con los núcleos de otros organismos y por lo tanto, no creemos que formen el núcleo o equivalente nuclear bacteriano, en contra de lo propuesto por la mayoría de los investigadores.

SUMMARY

Cells of *Agrobacterium tumefaciens* grown on agar slants for 48 hours were fixed in potassium permanganate, incorporate into agar blocks and embedded in methacrylate. Ultrathin sections of these cells showed the presence of a cell wall, a cytoplasmic membrane, a granular cytoplasm and a low electron density area within the cytoplasm of irregular shape as described by different workers. However after removal of the methacrylate with benzene, followed by shadow-casting with palladium, the central core of low electron density is observed as a vacuole crossed by a few strands and with some dense granules protruding from the cytoplasm into it. Structures that could represent a vacuolar membrane have not been observed.

Ours results are compared with the work of different authors and with ultrathin sections of cells of *Lycopersicum esculentum* as example of nuclei of higher organisms, being the opinion of the authors that the central core or zone of low electron density in *A. tumefaciens* represents a vacuolar system and is probably not the site of the bacterial nucleus or nuclear equivalent.

BIBLIOGRAFIA

1. BIRCH-ANDERSEN, A., y MAALOE, O. 1953. High-resolution electron micrographs of section of *E. coli*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 12, 395.
2. CHAPMAN, G., y HILLIER, J. 1953. Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. I. Cellular division in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 66, 392.
3. CHAPMAN, G. B. 1959. Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. III. Cell wall, cytoplasmic membrane and nuclear material. *J. Bacteriol.*, 78, 96.
4. FAURÉ-FREMIET, E., y ROULLER, C. 1958. *Exptl. Cell Research*, 14, 29.
5. GIESBRECHT, P., y PIEKARSKI, G. 1958. Zur Organisation des Zellkerns von *Bacillus megaterium*. *Arch. Mikrobiol.*, 31, 68.
6. HASHIMOTO, T.; CONTI, S. F., y NAYLOR, H. B. 1958. Fine structure of microorganisms. III. Electron microscopy of resting and germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 76, 406.
7. HILLIER, J.; MUDD, S., y SMITH, A. G. 1949. Internal structure and nuclei in cells of *Escherichia coli* as shown by improved electron microscopic techniques. *J. Bacteriol.*, 57, 319.
8. HOUWINK, A. L. 1956. Flagella, gas vacuoles and cell wall structure in *Halo-bacterium halobium*. An electron microscope study. *J. Gen. Microbiol.*, 15, 146.
9. KNAYSI, G. 1955. The structure, composition and behavior of the nucleus in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 29, 117.
10. KNAYSI, G. 1956. The bacterial nucleus. *Ann. Rev. Microbiol.*, 10, 253.
11. KNOLL, H., y NIKLOWITZ, W. 1958. Zur Feinstruktur der *Sarcina ventriculi*. *Arch. Mikrobiol.*, 31, 125.
12. MAALOE, O., y BIRCH-ANDERSEN, A. 1954. Electron micrographs of sections of *E. coli* cells infected with the bacteriophage T4. *Biochim. et Biophys. Acta*, 15, 12.
13. MAALOE, O., y BIRCH-ANDERSEN, A. 1956. On the organization of the nuclear material in *Salmonella typhimurium*. *Bacterial Anat.*, 6th Symposium Soc. Gen. Microbiol., London, 1956, 261.
14. MORSE, M. L., y CARTER, C. E. 1949. *J. Bacteriol.*, 58, 317.
15. MUDD, E.; SMITH, A. G.; HILLER, J., y BEUTNER, E. H. 1950. Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei. III. The nuclear sites in metal shadowed cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 60, 365.
16. MURRAY, R. G. E. 1960. En *The Bacteria*, I., 35. Academic Press, Nueva York.
17. PIEKARSKI, G. 1940. Über Kernähnliche strukturen bei *Bacillus mycoides* Glügge. *Arch. Mikrobiol.*, 11, 406.

18. PIEKARSKI, G., y RUSKA, H. 1939. Übermikroskopische untersuchungen an bakterien, unter besonderer berücksichtigung der sogen Nucleoide. Arch. Mikrobiol., 10, 302.
19. PREUSSER, H. J. 1958. Elektronenmikroskopische untersuchungen über die Cytologie von *Proteus vulgaris*. Arch. Mikrobiol., 29, 17.
20. PREUSSER, H. J. 1959. Form und Grosse des Kernäquivalentes von *Escherichia coli* in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen. Arch. Mikrobiol., 33, 105.
21. RYTER, A., y KELLEMBERGER, E. 1958. Z. Naturforsch., 13 b, 597.

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

EFECTOS PRODUCIDOS POR EL TELURITO POTASICO SOBRE EL DESARROLLO DE LOS AZOTOBACTER EN MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS

POR
V. CALLAO y E. MONTOYA

En experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio, en relación con el efecto producido por ciertos colorantes sobre el desarrollo de los *Azotobacter*, pudimos comprobar que estos gérmenes, y por consiguiente sus colonias, poseen un fuerte poder reductor sobre algunos de los colorantes ensayados. Este hecho nos llevó a pensar que sería interesante estudiar el comportamiento de los *Azotobacter* frente a un compuesto que al reducirse diera un precipitado visible. Fue elegido para este fin el telurito potásico, y los resultados que a continuación se exponen han demostrado que este compuesto, no solamente es reducido por los *Azotobacter*, sino que además tiene la propiedad de inhibir el crecimiento de estos gérmenes cuando se aplica en determinadas concentraciones.

MATERIALES Y METODOS

Organismos

Se han utilizado 5 razas de *Azotobacter chroococcum* (razas 17, 55, 103, 331 y 567), 5 razas de *A. vinelandii* (615, 621, 668, 704 y 705), 3 razas de *A. agilis* (44, 573 y 701) y 5 razas de *A. beijerinckii* (11, 12, 332, 546 y 597), aisladas en nuestro laboratorio en el transcurso de los tres últimos años y clasificadas de acuerdo con las técnicas de Jensen (3), Jensen y Petersen (4) y el esquema de Callao y Montoya (2). En el cuadro 1 se exponen algunas de las características bacteriológicas de las razas de *Azotobacter* citadas.

Cuadro 1. Pigmentación, movilidad, formación de quistes, límite inferior de pH para el crecimiento, habilidad para utilizar varias fuentes de carbono y desarrollo en medios sólidos con pironina al 1/25.000 y fucsina diamante al 1/50.000 de los *Azotobacter* ensayados

Especies	Razas	Pigmentación	Movilidad	Form. quistes	pH límite	Pironina	Fucsina	Glucost	Manita	Arabinosa	Xilosa	Sacarosa	Manosa	Galactosa	Lactosa	Etanol	Glicerina	Lactato sódico	Acetato sódico	Tartrato sódico	Benzoato sódico	Citrato sódico	Almidón
<i>A. chroococcum</i>	17	n	m	qq	5,6	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	55	n	m	q	5,2	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	103	n	m	q	5,8	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	331	n	m	q	5,7	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	567	n	m	qq	5,6	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>A. vine-landii</i>	615	av	mm	qq		+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	621	av	m	qq		+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	668	av	mm	qq		+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	704	av	mm	qq		+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	705	av	m	qq		+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>A. agilis</i>	44	av	mm	nq		-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	573	av	mm	nq		-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	701	av	m	nq		-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>A. beijerinckii</i>	11	np	nm	nq	5,2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	12	np	nm	nq	5,1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	332	np	nm	q	5,3	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	546	np	nm	nq	5,2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	597	np	nm	q	5,1	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+

Pigmentación: n, parda a negra; av, amariloverdosa; np, incolora.

Movilidad: mm, fuerte; m, moderada; nm, negativa.

Formación de quistes: qq, abundante; q, moderada; nq, dudosa o nula.

+, crecimiento positivo.

-, crecimiento dudoso o negativo.

Medios

En todas las experiencias se utilizó el agar-77 de Allen (1), pero, con objeto de facilitar el desarrollo de las razas de *A. agilis*, la manita fué sustituida por una mezcla de maltosa y glucosa, ambas a la concentración del 0,5 por 100 (p/v).

Técnica

Cantidades medidas de una solución no esterilizada de telurito potásico (Merck) al 1/100 (p/v) fueron añadidas a matraces conteniendo 400 cm³ de agar-77 previamente fundido y mantenido a 50° C., con objeto de conseguir en este medio concentraciones de telurito desde 1/1.000 a 1/200.000 (p/v). Los matraces fueron agitados cuidadosamente y el contenido de cada uno de ellos repartido entre 20 placas de Petri, estériles, de 100 mm. de diámetro. La inoculación se efectuó diseminando sobre la superficie de las placas suspensiones de *Azotobacter* procedentes de cultivos de cuarenta y ocho horas. Las placas se incubaron a 30° C. y el desarrollo de los gérmenes se observó a las noventa y seis horas de practicada la inoculación.

RESULTADOS Y DISCUSION

El crecimiento de los *Azotobacter* sobre medios de cultivo sólidos con telurito potásico da lugar a que se produzcan dos fenómenos diferentes: de una parte, el telurito, a determinadas concentraciones, es capaz de inhibir el desarrollo de los *Azotobacter*, mientras que de otra, cuando la concentración de telurito permite su crecimiento, todas las razas ensayadas tienen la propiedad de reducir este compuesto a teluro metálico, que queda englobado en el interior de las colonias.

Como los dos fenómenos son aparentemente independientes uno del otro, exponemos por separado los resultados obtenidos.

Inhibición del crecimiento

El telurito potásico inhibe el desarrollo de todos los *Azotobacter* ensayados cuando está presente en los medios de cultivo por encima de determinada concentración. Esta concentración límite de telurito, por encima de la cual no hay desarrollo, varía grandemente, según se trate de razas de *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. agilis* o *A. beijerinckii*, y aun dentro de una misma especie las distintas razas ensayadas varían en su tolerancia a la acción del telurito. En el cuadro 2 se expone el comportamiento de todas las razas ensayadas frente a distintas concentraciones de telurito potásico.

Como puede observarse, las razas de *A. vinelandii* son extremadamente sensibles a la acción del telurito, hasta el punto de que ninguna de ellas se desarrolla en presencia del citado compuesto cuando la concentración de éste es superior a 1/175.000. El resto de las razas ensayadas tolera mayores concentraciones de telurito. Las más resistentes son las de *A. chroococcum*, que crecen normalmente en presencia de telurito al 1/7.000, llegando algunas de ellas a tolerar concentraciones de 1/5.000; las siguen las razas de *A. agilis*, que se desarrollan a concentraciones de 1/11.000 - 1/12.000 y, por último, las de *A. beijerinckii*, cuya sensibilidad a la acción del telurito varía bastante, ya que mientras algunas de ellas toleran concentraciones de 1/15.000, otras solamente crecen a las de 1/25.000 ó inferiores.

Evidentemente, aun cuando en cada caso exista cierto grado de variabilidad, la resistencia de las distintas razas ensayadas a la acción inhibidora del telurito es diferente según pertenezcan a una u otra especie de *Azotobacter*, pudiéndose, por tanto, establecer una diferenciación de estas especies de acuerdo con su distinta tolerancia a la acción del citado compuesto.

De acuerdo con ello, el comportamiento de los *Azotobacter* en medios sólidos con telurito potásico, desde el punto de vista del desarrollo, constituye un nuevo carácter taxonómico de la mayor importancia, que permite diferenciar fácilmente las especies que componen este género.

Cuadro 2. Acción del telurito potásico, en diferentes concentraciones, sobre el desarrollo de los Azotobacter

Especies	Razas	1/4.000	1/5.000	1/6.000	1/7.000	1/10.000	1/11.000	1/12.000	1/14.000	1/15.000	1/19.000	1/20.000	1/24.000	1/25.000	1/50.000	1/175.000	1/200.000
		<i>A. beijerinckii</i> 11 12 332 546 597	11 12 332 546 597														
<i>A. agilis</i> 44 573 701	44 573 701																
<i>A. zinc-landii</i> 621 668 704 705	621 668 704 705																
<i>A. chroococcum</i> 17 15 103 331 567 615	17 15 103 331 567 615																

+, crecimiento positivo.
 —, crecimiento dudoso o negativo.

Reducción del telurito potásico

Todas las razas de *Azotobacter* ensayadas tienen la propiedad de reducir el telurito potásico a telurio metálico, que en forma de un precipitado negro queda incluido en el interior de las colonias. De acuerdo con lo dicho en el apartado anterior, este fenómeno solamente se produce, como es lógico, cuando el telurito está presente en el medio en concentraciones que no inhiben el desarrollo de los gérmenes. Nosotros hemos utilizado para estudiar este fenómeno concentraciones de telurito de 1/200.000, que permiten el desarrollo de la totalidad de las razas ensayadas; no obstante, cuando no se trate de razas de *A. vinelandii*, es preferible usar una concentración de 1/100.000, que permite una mejor observación del fenómeno.

La intensidad con que el telurito potásico es reducido y la manera de disponerse el precipitado de telurio en el interior de las colonias, son diferentes según se trate de razas de *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. agilis* o *A. beijerinckii*.

Razas de A. chroococcum

Son las que más fuerte poder reductor poseen. A las noventa y seis horas las colonias aparecen redondeadas, con la superficie mate, ligeramente rugosas e intensamente negras, con un estrecho margen incoloro apenas perceptible (figura 1).

Razas de A. vinelandii

Reducen muy débilmente el telurito. A las noventa y seis horas las colonias aparecen redondeadas, con el borde festoneado y superficie brillante y rugosa con una depresión en el centro de la que parten estrías radiales. El precipitado de telurio, de color grisáceo, se distribuye en la depresión central y a lo largo de las estrías (figura 2).

Razas de A. agilis

Reducen el telurito con menor intensidad que las razas de *A. chroococcum*. A las noventa y seis horas las colonias son plano-convexas, redondeadas, con borde ligeramente ondulado, superficie lisa y brillante y

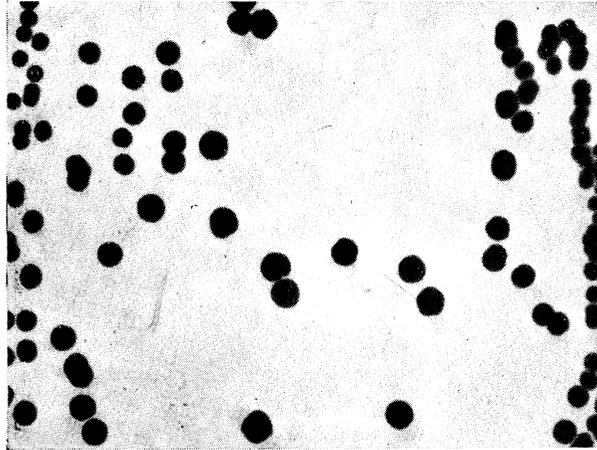


Figura 1. Colonias de *A. chroococcum*. Cultivo de noventa y seis horas en medio con telurito potásico al 1/100.000

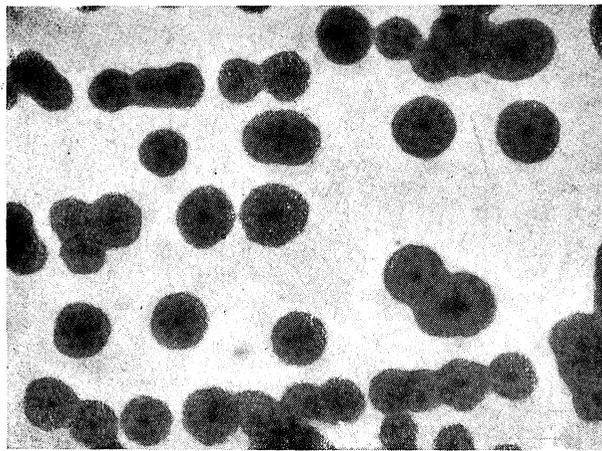


Figura 2. Colonias de *A. vinelandii*. Cultivo de noventa y seis horas en medio con telurito potásico al 1/200.000

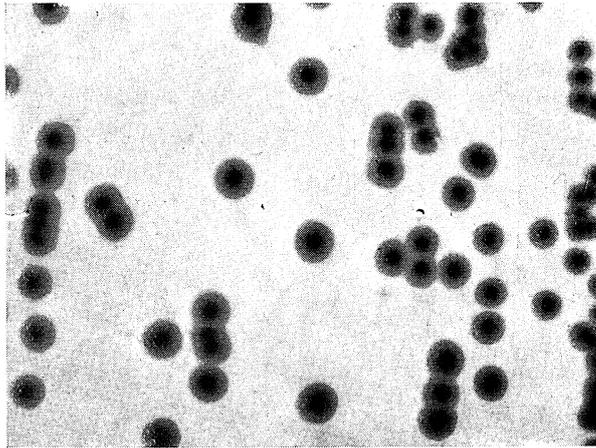


Figura 3. Colonias de A. agilis. Cultivo de noventa y seis horas en medio con telurito potásico al 1/100.000

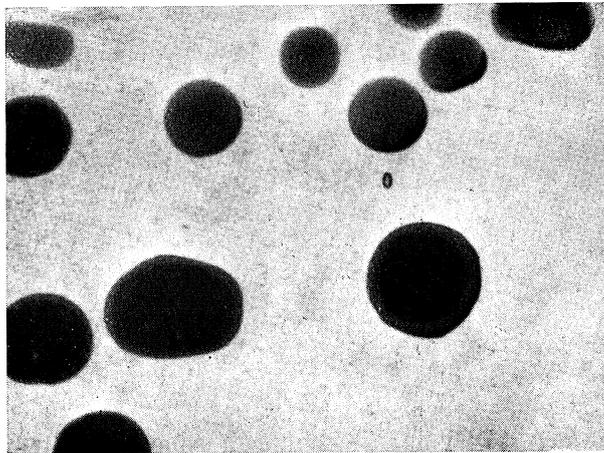


Figura 4. Colonias de A. beijerinckii. Cultivo de noventa y seis horas en medio con telurito potásico al 1/100.000

con un punto central negro rodeado por una ancha zona periférica no coloreada (figura 3).

Razas de *A. beijerinckii*

Poseen una capacidad de reducción del telurito intermedia entre la de los *A. chroococcum* y *A. agilis*. A las noventa y seis horas las colonias aparecen redondeadas y convexas, mucosas, con el borde continuo y la superficie lisa y brillante, de color negro-grisáceo, más intenso en la parte central y apenas perceptible en la periferia (figura 4).

La intensidad con que los *Azotobacter* reducen el telurito, y sobre todo la manera de disponerse el precipitado de telurio en las colonias es, como hemos visto, muy típica y diferente para cada una de las especies del género, por lo que dicho fenómeno puede ser utilizado como un criterio de diferenciación seguro y fácil entre las cuatro especies de *Azotobacter* estudiadas.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto producido por el telurito potásico sobre el desarrollo en medios sólidos, de 5 razas de *A. chroococcum*, 5 de *A. vinelandii*, 3 de *A. agilis* y 5 de *A. beijerinckii*.

Se ha comprobado que el telurito potásico es capaz de inhibir el desarrollo de todas las razas de *Azotobacter* ensayadas y muy especialmente el de las de *A. vinelandii*. Las concentraciones máximas de telurito (p/v) que permiten el crecimiento de los gérmenes estudiados son las siguientes: 1/5.000 - 1/7.000 para las razas de *A. chroococcum*, 1/175.000 - 1/200.000 para las de *A. vinelandii*, 1/11.000 - 1/12.000 para las de *A. beijerinckii*.

De otra parte, se ha encontrado que los *Azotobacter* tienen la propiedad de reducir el telurito potásico a telurio metálico, que en forma de un precipitado negro queda englobado en las colonias. Según se trate de *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. agilis* o *A. beijerinckii* el precipitado de telurio se distribuye en las colonias de manera diferente, pero típica y constante en cada caso.

Ambos fenómenos pueden ser aprovechados para una fácil y rápida diferenciación de las especies del género *Azotobacter*.

SUMMARY

It has been studied the effects produced by the Potassium Tellurite on the growth, in solid culture media, of 5 strains of *A. chroococcum*, 5 of *A. vinelandii*, 3 of *A. agilis* and 5 of *A. beijerinckii*.

It has been verified that the Potassium Tellurite has a strong bacteriostatic power about the assaied *Azotobacter*'s strains. The greatest concentrations of Potassium Tellurite which permit the growth of the *Azotobacter* are the following (w/v): 1/5,000 - 1/7,000 for the *A. chroococcum*'s strains, 1/175,000 - 1/200,000 for the *A. vinelandii*'s strains 1/11,000 - 1/12,000 for the *A. agilis*'s strains and 1/15,000 - 1/25,000 for the *A. beijerinckii*'s strains.

At the same time, the *Azotobacter* showed the property of reducing the Potassium Tellurite to metallic Tellurium, which was enclosed into the colonies such as a black precipitate. The distribution of the precipitated Tellurium into the colonies was different for every one of the four *Azotobacter*'s species.

Both effects could be used for a easy and rapid differentiation of the *Azotobacter*'s species.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, O. N. 1951. Experiments in soil bacteriology. Burgess Publishing Co., Minnesota.
2. CALLAO, V., y MONTOYA, E. 1960. Dyes for speciation of *Azotobacter*. J. Gen. Microbiol., 22, 657.
3. JENSEN, H. L. 1954. The *Azotobacteriaceae*. Bact. Rev., 18, 195.
4. JENSEN, V., y PETERSEN, E. J. 1955. Taxonomic studies on *Azotobacter chroococcum* Beij. and *Azotobacter beijerinckii* Lip. Roy. Vet. and Agr. Coll., Copenhagen, Yearbook.

TERMORRESISTENCIA Y ACTIVACION DEL VIRUS VACUNAL

POR

ANGEL P. GARCIA-GANCEDO y CARMEN GIL

Desde hace bastantes años se han realizado experimentos para determinar la sensibilidad del virus vacunal frente al calor.

Ya en 1923 Levaditi y Nicolau (9) observaron que haciendo emulsiones homogéneas de los virus de la dermovacuna y de la neurovacuna y calentándolas a 55° C. durante una hora e inoculando después sobre lomo de conejo, resultaba que el calor había destruído la virulencia del virus de la neurovacuna, mientras que había respetado la del virus de la dermovacuna. Achacaban este resultado a la adaptación del virus vacunal al neuroeje, lo cual le hacía más sensible al calor.

Según Nakagawa (12), la linfa vacunal calentada a 100° C. durante cuarenta minutos conserva todavía cierto poder inmunizante, aunque para demostrarlo deben emplearse grandes dosis.

Gordon (5) observó que el calor disminuye en gran parte el poder antigénico del virus vacunal. Para obtener el mismo grado de protección conferido por el virus vacunal normal hay que emplear aproximadamente unas 20 veces más virus, calentado a 55° C. durante treinta minutos. La linfovacuna calentada a 65° C. sólo posee la centésima parte del poder inmunizante que tiene la calentada a 55° C.; y la vacuna calentada a 100 ó 120° C. no ejerce prácticamente efecto inmunizante alguno.

Nye y Parker (13) escriben que el virus vacunal es rápidamente destruído por el calor, cuando se calienta en solución de Locke a 55° C. durante veinte minutos, o a 37,5° C. durante veinticuatro horas.

Armstrong (1) inyectó intratesticularmente virus vacunal dérmico.

Después de cada inoculación el virus recogido fué calentado a 37,5 C°. Por selección y propagación continuada obtuvo una cepa de virus que presentaba un gran aumento de su resistencia al calor.

Silber y Wostrouchowa (14) encuentran que el virus vacunal en suspensión en una solución tampon especial, retiene su infectividad durante sesenta y seis días, estando sometido a la temperatura de 37° C.

Levaditi y Lepine (10), en su obra "Los ultravirus", dicen lo siguiente: "Si el frío permite el mantenimiento durante varios meses de la actividad patógena de los ultravirus, por el contrario, a partir de una cierta elevación de la temperatura (en general hacia los 56-60° C.) esta actividad se atenúa, al punto de desaparecer completamente. El punto crítico varía de un germen a otro y está en función de la cantidad de agua que posee el ultravirus, o el medio que lo engloba. La vacuna nos da el ejemplo más típico. Al estado seco, la vacuna conserva su actividad durante noventa y dos días a 37° C., y durante cinco a diez minutos a 100° C. (Casini, Tomarkin y Subrenicoff). Por el contrario, al estado húmedo, la linfa vacunal es rápidamente esterilizada a 56 ó 60° C. (Camus, Groth, Casini, Tedeski, Lentz y Gins)" Más recientemente, en 1934, Sander ha sometido la cuestión a un estudio sistemático y llega a la conclusión de que el virus vacunal (testivacuna) desecado mantiene íntegramente su virulencia después de estar sometido veinte minutos a 90° C., y parcialmente después de haber estado sometido durante el mismo tiempo a 100° C. El mismo virus húmedo pierde su poder patógeno a 55° C., aunque puede conservar sus propiedades antigénicas.

Fenner (3) encuentra que calentando a 55° C. durante cuarenta minutos hay una reducción del título para MCA (*) de una unidad logarítmica. Esto es variable, según las cepas.

Kaplan (8) escribe que las curvas de inactivación obtenidas entre 50 y 60° C. indican que el virus es heterogéneo en su sensibilidad al calor. La proporción de partículas termorresistentes varía inversamente al tiempo de exposición a la temperatura. La inactivación del virus termosensible es dependiente de la temperatura y parece ser una reacción primaria, mientras la fracción termorresistente es inactivada lenta y constantemente en forma no relacionada con la temperatura, lo cual prolonga la curva de inactivación, produciéndose una marcada inflexión de ésta. El virus termosensible se inactiva, por el contrario, rápidamente. Los

(*) Membrana corioalantoidea.

dos procesos de inactivación, rápida del virus termosensible y lenta del termorresistente, pueden empezar simultáneamente. Utiliza una cepa de virus vacunal adaptada a embrión de pollo y otra de neurovacuna de ratón. Para ambas son semejantes los resultados obtenidos. Sugiere que las cepas del virus vacunal contienen partículas con dos o tres sensibilidades distintas al calor, pero que la mayoría de las partículas se inactivan rápidamente por la acción de aquél. Durante una hora a 50° C. decrece el título para MCA hasta un 10 por 100, y a 60° C., a menos de 0,000001 por 100. Se ha demostrado por otros autores que las poblaciones de virus son heterogéneas en varios aspectos en los virus de la gripe, poliomielitis, mosaico del tabaco y otros. Es interesante anotar algunos detalles de las técnicas que utiliza, como son: que inactiva el virus y lo guarda a 4° C. durante algunas horas o dos a tres días y después lo titula en MCA; como diluyente del virus usa la solución tampón de Mc Ilvaine, a pH 7,2.

Hanafusa y colaboradores (7) indican que el virus vacunal cultivado sobre células *L*, produce la aparición de células gigantes polinucleares y cuerpos de inclusión citoplasmáticos. El líquido obtenido del cultivo infectado conteniendo virus se calienta a 56° C. durante tres horas, no siendo entonces infectivo para los cultivos de tejido ni para la piel de conejo. Tampoco se recupera virus de las células procedentes del cultivo infectado rotas mediante congelación y descongelación rápidas. Concluyen diciendo que parece cierto que un período de tres horas a 56° C. es suficiente para la inactivación completa del virus.

Cuando teníamos casi terminado en su parte experimental este trabajo, apareció el de Woodrooffe (16). En éste se lee lo siguiente: "Suspensiones de virus vacunal recientemente preparadas se inactivan por completo en dos horas y media a 55° C., o en quince minutos a 60° C.". A veces, sin embargo, se obtienen resultados semejantes a los obtenidos por Kaplan. De estos resultados anómalos deduce que la prolongación de la curva de inactivación y su inflexión ocurre únicamente con las suspensiones de virus que han sido guardadas en el frigorífico durante algún tiempo. Realiza experimentos de los cuales concluye que cuando el virus se calienta inmediatamente de su obtención se inactiva, según una reacción primaria, igual que ocurre cuando se guarda a -60° C.

Si se guarda a 4° C. durante algunos días, se produce el alargamiento de la curva observado por Kaplan (el cual utilizaba virus guardado a

4° C.); el virus termorresistente está presente ya al primer día de almacenamiento en frigorífico a 4° C. y alcanza un nivel constante al segundo día; durante la conservación de las suspensiones del virus en estado líquido a esta temperatura, ocurre algún cambio físico o químico que aumenta grandemente la termoestabilidad de una pequeña proporción de partículas víricas; la suspensión de virus recientemente preparada se inactiva completamente sometiéndola durante quince minutos a 50° C., mientras que si se ha conservado a 4° C. queda virus activo después de treinta horas a 50° C. Diluyendo 100 veces este material, se hace más susceptible a la inactivación por el calor, lo que indica que las impurezas confieren una considerable protección.

MATERIAL Y TECNICAS

Virus

Procede de pulpa vacunal dérmica de ternera, filtrada por bujía Mandler, de poro regular, para librarla de gérmenes contaminantes. Después se ha adaptado al cultivo sobre capas monocelulares de células HeLa, habiéndose realizado así 28 pases.

Células

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

Medio de cultivo

Solución de Gey	70 %
Lactoalbúmina hidrolizada diluída al 5 por 100.	10 %
Suero humano	5 %
Suero de caballo	15 %

Se añade 1 por 100 de rojo fenol diluido al 0,2 por 100; 100 U. I. de penicilina; 100 γ de estreptomina; 500 U. I. de nistatina, y bicarbonato sódico diluido al 8,4 por 100 en cantidad suficiente para ajustar el pH a 7,4.

Cultivo de las células

Véase Gil y colaboradores (4). Para la multiplicación y obtención de las células se usan frascos Roux; para los experimentos, frascos hexagonales de caras planas y tubos de ensayo, todo ello de vidrio Pyrex. Para obtener preparaciones, tubos con tapón. El virus se siembra cuando se ha conseguido una capa monocelular continua.

Inactivación del virus

La suspensión del virus liberado al medio se coloca en frascos de 100 cm³ con tapón de rosca que cierra herméticamente, poniendo en cada uno 10 cm³ de suspensión. También se ha realizado colocando 2 cm³ de la suspensión en tubos Pyrex, tapados herméticamente con tapón de goma. Se ha comprobado que la temperatura del líquido es igual a la del baño durante el período de inactivación y que esta temperatura se alcanza en menos de cinco minutos. Los tubos y los frascos se sumergen en un baño maría regulado a 56° C., de forma que el nivel del líquido contenido en aquellos quede por debajo del nivel del agua del baño. La temperatura se vigila continuamente durante el período de inactivación. Se han realizado inactivaciones a 56° C. durante seis horas, doce horas y veinticuatro horas.

Se ha observado que durante la inactivación el medio de cultivo que está neutro o ligeramente ácido a causa del metabolismo de las células, tiende a alcalinizarse.

Titulación del virus en MCA

Se realiza sobre MCA de embrión de pollo de doce días de incubación a 39° C. Se inocular siguiendo la técnica de Nadaje y colaboradores (11), modificada por Stoker y Ross (15). La lectura de las lesiones se hace cuarenta y ocho horas después de la inoculación. Para cada suspensión de virus se inoculan 5 embriones, y hallamos la media de todos ellos.

Titulación en conejo

Se hacen punturas intradérmicas en conejos de piel blanca, con 0,20 cm³ de la suspensión de virus, según la técnica de Groth (6). La lectura se hace cuando las lesiones alcanzan su mayor diámetro, que

puede ser a los cinco días de la inoculación. No obstante, en muchos casos hemos hecho lecturas todos los días a partir de las veinticuatro horas de la inoculación.

Titulación en células

Se toman tubos con capa monocelular de células HeLa. Se tira el medio de cultivo, se lava tres veces con la solución PBS (*), se añade 0,20 cm³ de la suspensión de virus, de forma que ésta cubra las células; se deja tres horas en estufa a 37° C. para que el virus se adsorba por las células. Se vuelve a lavar tres veces con PBS, añadiéndose medio nuevo, colocándose ya en la estufa a 37° C. Cada partícula infectiva del virus produce una placa microscópica que evoluciona haciéndose macroscópica en el caso de no haber muchas partículas en la suspensión, porque si hay muchas es general la destrucción del cultivo. La lectura se hace a partir de los dos días de la infección. Para cada suspensión de virus se inoculan 5 tubos y hallamos la media de todos.

Reacciones de fijación de complemento

Sueros

Proceden de los conejos inoculados intradérmicamente con varias punturas con las diversas suspensiones de virus ensayadas. Se obtienen sangrando por punción en corazón, quince días después de la inoculación; la sangre extraída se mantiene a temperatura ambiente durante una hora, se despega el coágulo y se coloca durante veinticuatro horas a 4° C. A las veinticuatro horas se separa el suero y se centrifuga durante diez minutos a 1.000 r. p. m. en centrífuga refrigerada a 4° C. Se recoge el sobrenadante y se conserva congelado a — 20° C.

Antígeno

Se obtiene a partir de alantoides infectados según la técnica de Zuzo (17), y se conserva liofilizado a — 20° C.

(*) Solución salina tamponada exenta de calcio y magnesio (Solución A de Dulbecco y Vogt (2).

Reacción propiamente dicha

Previamente se titulan el antígeno, el complemento, la hemolisina, y el complemento en presencia del antígeno para determinar si éste posee poder anticomplementario. Se hacen diluciones dobles del suero en solución salina estéril y se colocan en la cantidad de 0,20 cm³ en tubos de hemólisis. Se añade 0,20 cm³ de complemento diluido de forma que haya dos unidades hemolíticas, y luego agregamos 0,20 cm³ de antígeno titulado. Agitamos bien y se pone en frigorífico a 4° C. durante dieciocho horas. Añadimos 0,40 cm³/tubo,, de mezcla hemolítica, y se coloca en baño maría a 37° C. durante media hora. Hacemos la lectura, correspondiendo el título a la dilución del suero que presenta una fijación de grado 2 (50 por 100) o más.

La mezcla hemolítica está constituida por hemolisina anticarnero diluida de forma que en 0,20 cm³ haya dos unidades hemolíticas mezcladas, a volúmenes iguales, con una suspensión al 2 por 100 en solución salina estéril, de hematíes de carnero lavados.

Se colocan testigos para determinar si el suero posee poder anticomplementario, testigo antígeno-complemento, testigo complemento-mezcla hemolítica y testigo mezcla hemolítica. También suero anti-HeLa, obtenido inoculando en conejo en la misma forma, medio de cultivo de las células HeLa.

RESULTADOS

Según la técnica descrita anteriormente, inoculamos 4 grupos de tubos con capa monocelular, con suspensión de virus calentada a 56° C. durante seis horas, doce horas, veinticuatro horas y con suspensión de virus sin calentar. A las veinticuatro horas se observa que los cinco tubos inoculados con la suspensión que no ha sido sometida a la acción del calor, presentan los síntomas característicos de la infección por el virus vacunal, todas las células están redondeadas, muchas de ellas son células gigantes. A las cuarenta y ocho horas, los tubos infectados con la suspensión no calentada presentan bastante destrucción del cultivo celular (figura 1). Por otra parte, en los restantes tubos se pueden observar placas microscópicas (figura 2). En el grupo de tubos infectados con el líquido procedente del frasco sometido a la temperatura de 56° C. du-

rante seis horas, encontramos una media de 10,2 placas/tubo. En el grupo correspondiente a doce horas a 56° C., una media de una placa/tubo. Y en el grupo correspondiente a veinticuatro horas a 56° C., una media algo inferior a una placa/tubo.

A los cuatro días de la inoculación, los tubos infectados con la suspensión de virus sin calentar presentan una destrucción total del cultivo. Los demás grupos presentan placas microscópicas formadas por células infectadas, de bordes más refringentes, redondeadas y en general de mayor tamaño que las normales (gigantes) (figura 2). Estas células según avanza la infección mueren, desprendiéndose de la pared del frasco (figura 3), dando lugar a placas macroscópicas (figura 4). El grupo correspondiente a seis horas de calentamiento, da una media de 17,4 placas/tubo; el de doce horas, una media de 2,2 placas, y el de veinticuatro horas, 1,2 placas. Únicamente el virus calentado da lugar a placas macroscópicas.

Cuadro 1. Titulación de las suspensiones, en células HeLa

Sin calentar	Vacuna			Líquido HeLa	U. F. P./cm ³
	Calentada a 56° C. durante				
	6 h.	12 h.	24 h.		
Destrucción del cultivo	8,7 × 10 ¹	1,1 × 10 ¹	6,0 × 10 ⁰	0	

U. F. P. = Unidades víricas formadoras de placas.

Hemos recogido el medio de los tubos a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas, y a los cuatro y seis días de la inoculación, sustituyendo con medio nuevo. Estas tomas se han titulado en piel de conejo. Para cada grupo de tubos se ha inoculado un conejo con una puntura por cada toma, con el fin de observar la marcha de la multiplicación de las diferentes suspensiones del virus sobre el cultivo celular.

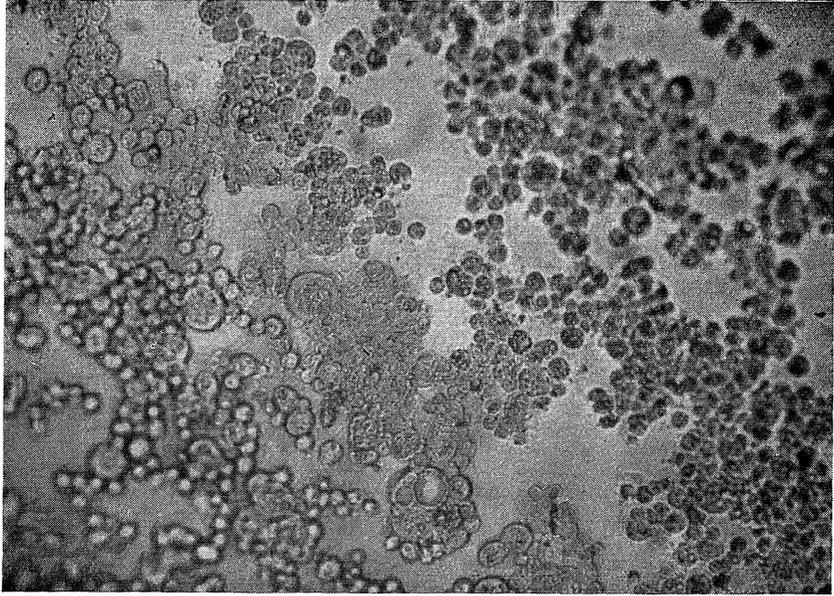


Figura 1. Efectos citopatogénicos del virus vacunal sobre las células Hela, a las cuarenta y ocho horas después de la infección. $\times 132$ (aproximadamente)

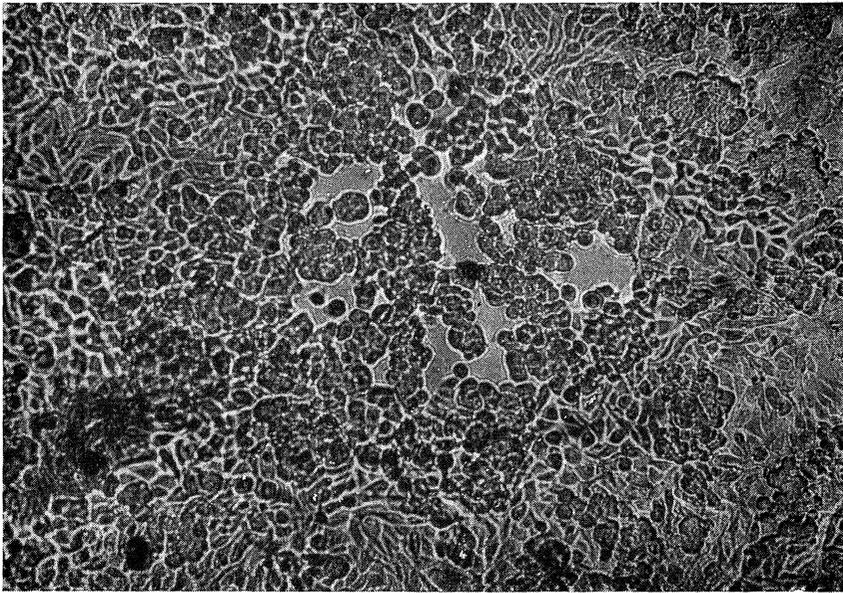


Figura 2. Placa microscópica producida por el virus vacunal calentado veinticuatro horas a 56° C.; a las cuarenta y ocho horas después de la infección. $\times 132$ (aproximadamente)

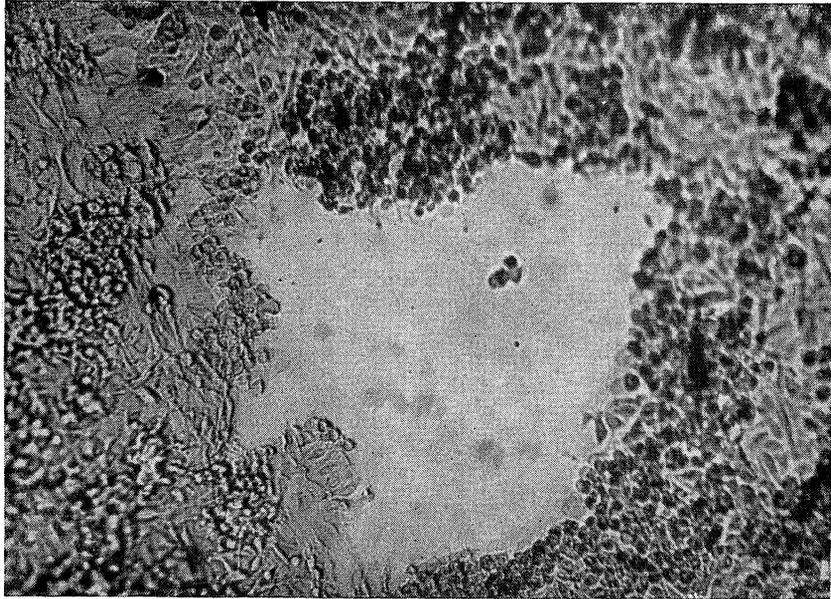


Figura 3. La misma placa a los cuatro días después de la infección. Las células muertas se han desprendido de la pared del tubo. $\times 132$ (aproximadamente).

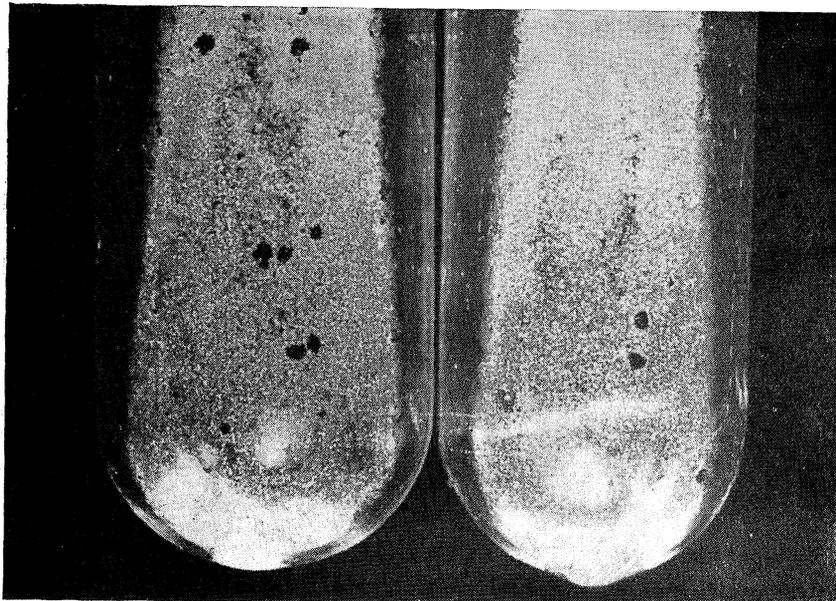


Figura 4. Placas macroscópicas producidas por el virus vacunal calentado seis horas (izquierda) y doce horas (derecha) a 56° C. Se observan a modo de orificios en las zonas infectadas, en las que se ha producido la degeneración del cultivo con desprendimiento de las células muertas. $\times 2,50$

Cuadro 2. Desarrollo del virus vacunal en células HeLa (titulación de las tomas de medio, en conejo)

Conejo	Inoculado con	Medio recogido a				Diámetro de la lesión, mm.
		las 24 h.	las 48 h.	los 4 d.	los 6 d.	
	Vacuna sin calentar	17	17	18		
	Vacuna calentada a 56° C. durante					
2	6 h.	±	19	25 N ⁺ ₊	28 N ⁺ ₊	
3	12 h.	0	±	12	18	
4	24 h.	0	0	±	24 N	
5	Líquido HeLa	0	0	0	0	

N = Necrosis. ± = Iniciación de lesión. + = Grado de necrosis.

Con las suspensiones primitivas, con las que inoculamos los grupos de tubos, hacemos también una titulación en piel de conejo.

Cuadro 3. Titulación de las suspensiones, en conejo

Diámetro de la lesión, mm.	Sin calentar	Vacuna			Líquido HeLa
		Calentada a 56° C. durante			
		6 h.	12 h.	24 h.	
28 N ⁺ ₊		12	10	0	0

También se hace titulación de dichas suspensiones en MCA.

Cuadro 4. Titulación de las suspensiones, en MCA

	Vacuna			Líquido HeLa	U. F. L./cm ³
	Sin calentar	Calentada a 56° C. durante			
		6 h.	12 h.		
Lesiones confluentes					
		$2,8 \times 10^1$	2×10^0	0	0

U. F. L. = Unidades víricas formadoras de lesiones.

Con el fin de observar si existen diferencias antigénicas entre las cepas sin calentar y calentadas, con los suero obtenidos de los conejos inoculados con ellas, se realizan fijaciones de complemento frente a un mismo antígeno, obteniéndose los resultados que se recogen en el cuadro 5.

Cuadro 5

Título	Vacuna			Testigo		
	Sin calentar	Calentada a 56° C. durante		Suero normal	Suero anti-HeLa	
		6 h.	12 h.			24 h.
	1/8	1/16	1/8	1/16	0	1/2

Para observar si se comportan de forma diferente al virus calentado a 56° C. durante seis horas y durante doce horas, hacemos el siguiente experimento:

A partir de las suspensiones calentadas durante seis y doce horas, inoculamos para cada una un frasco hexagonal de cara plana, con 5 cm³ de suspensión de virus por frasco. A los tres días se cambia el medio de cultivo, como asimismo a los cinco días. A los siete días ambos frascos presentan gran número de placas macroscópicas. A los ocho días el fras-

co inoculado con virus calentado seis horas presenta total destrucción del cultivo, mientras el de doce horas tarda otro día más. El aspecto de las células infectadas de ambos, es semejante. Con el medio obtenido el último día realizamos otro pase en otros dos frascos. A los tres días de la inoculación hay total destrucción del cultivo, habiendo evolucionado ambos frascos de la misma forma, coincidiendo con el modo en que lo hace el virus sin calentar.

Con estos pases obtenidos se calienta la mitad de la suspensión de cada uno a 56° C. durante seis horas, quedando la otra mitad sin calentar, y titulamos sobre piel de conejo, obteniéndose los resultados que muestra el cuadro 6.

Cuadro 6

Virus procedente de suspensión calentada a 56° C. durante				
6 h.		12 h.		
Pase II				
	Calefacción: 6 h.	Sin calentar	Calefacción: 6 h.	Sin calentar
Diametro de la lesión, mm.	9	22 N + +	10	22 N + +

Para observar la diferencia de comportamiento entre el virus guardado en frigorífico a 4° C. y el que no lo ha sido frente el calentamiento a 56° C., tomamos una suspensión de virus liberado al medio de cultivo; inmediatamente y sin guardar en frigorífico, se somete a 56° C. durante seis horas. Inoculamos a renglón seguido en frascos con capa monocelular de células HeLa. Aparecen numerosas placas microscópicas, que se hacen macroscópicas, destruyéndose posteriormente el cultivo. Por tanto, esto nos indica que aunque no se guarde la suspensión de virus a 4° C., éste no se inactiva totalmente a las seis horas de calentamiento a 56° C.

Influencia de la temperatura de 4° C. sobre el virus vacunal

Hemos realizado otra serie de experimentos para determinar la acción que ejerce la temperatura de 4° C. sobre las suspensiones de virus vacunal, tanto calentado a 56° C. durante seis horas, como sin calentar. Para ello, se han hecho pases de virus vacunal en cultivos de células HeLa, recogiendo el medio cuando los cultivos están totalmente destruidos. Se hacen cuatro partes de la suspensión de virus obtenida; de ellas, dos no se calientan a 56° C., pero una se titula inmediatamente de obtenida, colocándose la otra parte en frigorífico a 4° C. durante seis horas y titulándose también. Las otras dos partes se calientan a 56° C. durante seis horas, titulándose una parte inmediatamente; la parte restante, después de calentada, se tiene una noche en frigorífico a 4° C., titulándose después. Las titulaciones se han realizado sobre piel de conejo y MCA. Y se han utilizado pases diferentes del virus. En el cuadro 7 se indican las medias obtenidas de las diversas titulaciones realizadas.

Cuadro 7

Titulación en	Virus sin calentar (*)		Virus calentado		Diametro de la lesión, mm. U. F. I./cm ³
	Sin enfriar	Enfriado 6 h.	Sin enfriar	Enfriado 6 h.	
Piel de conejo	15	20	8	15	
MCA	$3,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	

(*) Se diluye el 1/100 para titular en MCA, porque si no las lesiones serían confluentes.

Se han realizado 8 titulaciones distintas, entre piel de conejo y MCA, obteniéndose resultados paralelos en todas.

DISCUSION

Haciendo una revisión de la bibliografía que hemos encontrado sobre el tema de la inactivación del virus vacunal mediante el calor, se observa una evidente disparidad en los resultados. Ello quizá sea debido a las naturales diferencias entre las cepas utilizadas, aunque creemos que lo que más ha influido, probablemente, sea la naturaleza de las suspensiones del virus y las técnicas de titulación empleadas.

Hay autores que encuentran que sometiendo el virus a la temperatura de 56° C. durante tres horas, aquél queda totalmente inactivado y en ello basan sus trabajos.

Con la cepa que nosotros hemos empleado queda demostrado que esto no es cierto, aunque a veces para poner de manifiesto partículas víricas haya que recurrir a determinada técnica de titulación, más sensible.

De nuestros experimentos podemos deducir que el virus vacunal *adaptado* al cultivo sobre células HeLa, conserva su poder infectivo para dicha cepa, aunque se caliente a 56° C. durante veinticuatro horas. Ahora bien, esto último sólo es demostrable mediante titulación sobre células HeLa y no mediante titulación sobre MCA y piel de conejo, que resultan negativas, siendo estas dos últimas técnicas las más utilizadas y casi las únicas antes de aparecer las recientes de cultivos celulares.

De lo que no queda duda es de que utilizando el material que nosotros empleamos, a las seis horas y aun a las doce horas de calentamiento del virus queda una proporción de partículas víricas muy estimable, demostrable por los tres métodos de titulación citados.

Estas suspensiones de virus se conservan en frigorífico a 4° C. durante cierto tiempo antes de su titulación y según Woodrooffe (16) esta temperatura modifica el comportamiento del virus, apareciendo una termorresistencia en cierto número de partículas víricas. Pero según el mismo autor, esto no ocurre si se titula el virus sin enfriar. Nuestros resultados indican que a las seis horas a 56° C. no se inactiva totalmente el virus tampoco, aunque no haya estado en frigorífico.

Teniendo en cuenta los resultados de los cuadros 1-4, podemos decir que el título del virus decrece considerablemente a medida que aumenta el tiempo de exposición a la temperatura de 56° C., hasta las veinticuatro horas, pero que no desaparece totalmente en el caso de haber

estado el virus en frigorífico. Y al menos hasta las seis horas, no habiendo estado en frigorífico.

Por otra parte, mediante la titulación en piel de conejo de las sucesivas tomas de medio infectado realizadas en los grupos diversos de tubos, según se indica en el cuadro 2, se observa que en el caso de la vacuna sin calentar, el título del virus liberado al medio es máximo ya a las veinticuatro horas de infección, debido a que se ha inoculado gran cantidad de virus. Sin embargo, en los demás grupos de tubos infectados con virus calentado va aumentando considerablemente a medida que transcurre el tiempo de cultivo. Para el virus calentado seis horas aparece un título sensible a las cuarenta y ocho horas; para el de doce horas de calentamiento aparece a los cuatro días, y para el de veinticuatro horas de calentamiento aparece a los seis días. Esto, como es natural, se debe a la menor cantidad de partículas infectivas que quedan según aumenta el tiempo de inactivación. Por ello, es importante hacer notar que para realizar cualquier clase de experimentos que se basen en la inactivación total del virus vacunal, es preciso cerciorarse con mucho detenimiento de que no quedan partículas infectivas, ya que aunque éstas sean muy escasas y muchas veces no detectables, en cultivo de células pueden alcanzarse rápidamente altos títulos de virus.

Como también se ha indicado, algunos autores han investigado las posibles diferencias que pudieran existir entre las partículas infectivas termorresistentes y las normales, y no las han encontrado, aparte de esta termorresistencia. Incluso han determinado que la cepa termorresistente no conserva esta característica para todas las partículas.

Nosotros, por medio de fijaciones del complemento con sueros procedentes de conejos inoculados con virus sin calentar, y calentado seis, doce y veinticuatro horas a 56° C., hemos determinado que todos los sueros reaccionan de forma semejante con respecto a la reacción de fijación del complemento frente al mismo antígeno y tienen aproximadamente el mismo título, lo que indica comportamiento semejante de todas las partículas víricas.

Además, partiendo de virus calentado seis horas y doce horas realizamos dos pases sobre células HeLa. Durante el primer pase la evolución del cultivo infectado es más rápida para el virus de seis horas, debido a que en éste había mayor cantidad de virus; pero en el segundo pase se iguala la evolución de ambos cultivos, presentando las mismas carac-

terísticas entre sí. Con estos dos pases obtenidos se hace una prueba de inactivación, como se indica en el cuadro 6, y se observa que se comportan perdiendo título, como lo hace el virus normal. Todo ello confirma que la termorresistencia no se transmite a todas las partículas víricas que proceden de las termorresistentes. La mayor termorresistencia encontrada por nosotros para este virus probablemente esté influenciada por la complejidad del medio de cultivo, el cual ejercería un efecto protector considerable.

Nuestra experiencia sobre el cultivo del virus vacunal en células HeLa nos había sugerido la existencia de un posible efecto del almacenamiento de las suspensiones de virus a 4° C. en frigorífico, sobre el ulterior comportamiento del virus. Posteriormente, Woodrooffe (16) sugiere que la temperatura de 4° C. provoca la aparición del virus termorresistente. Sin embargo, nosotros, utilizando métodos diferentes, encontramos otro fenómeno que creemos está originado por dicha temperatura de 4° C. Realizamos una serie de experimentos semejantes que consisten en titular suspensiones de virus del mismo origen, inoculando inmediatamente después de obtenido dicho virus y tras de haberlo sometido a la acción de la temperatura de 4° C. Esto se hace tanto para el virus normal como para el virus calentado seis horas a 56° C., es decir, el virus termorresistente. Y obtenemos (véase cuadro 7) que el título de las suspensiones sometidas a 4° C. es superior al de las que no lo han sido. Se repite varias veces el experimento, obteniéndose resultados paralelos, tanto sobre MCA como sobre piel de conejo. Por lo tanto, parece que la temperatura de 4° C. actúa sobre la suspensión de virus realizada en medio de cultivo de las células HeLa, activando partículas que en otro caso no serían infectivas.

Sobre este fenómeno no hemos encontrado ninguna referencia. Nosotros pensamos que ha pasado inadvertido hasta ahora por la razón siguiente: el virus vacunal es muy estable a 4° C. Las personas que trabajan con él, normalmente, al obtenerlo, lo guardan en frigorífico y lo titulan inmediatamente, antes de hacer algún estudio con él. Si alguien lo utilizara inmediatamente de obtenerlo lo titularía entonces únicamente. Ahora bien, probablemente nadie ha necesitado titular el virus inmediatamente después de obtenerlo, guardarlo en frigorífico a 4° C. y titularlo varias horas o un día después. Si acaso, lo haría bastante más tarde, y la experiencia nos enseña que durante un período de conservación más

o menos largo del virus en frigorífico, hay una pérdida gradual más o menos lenta del título.

Para encontrar una explicación de lo que ocurre carecemos de base y serán necesarios otros estudios.

RESUMEN

El virus vacunal adaptado a las células HeLa conserva parcialmente su poder infectivo para dichas células después de haberse sometido a la temperatura de 56° C. durante veinticuatro horas. La cantidad de unidades infectivas termorresistentes disminuye a medida que aumenta el tiempo de exposición a dicha temperatura. Para piel de conejo y MCA se conserva el poder infectivo a las seis y doce horas de exposición a 56° C., pero a las veinticuatro horas ya no se detecta.

Calentando la suspensión de virus a 56° C. durante seis horas se conserva su infectividad parcialmente, tanto se haya conservado en frigorífico como si no lo ha sido.

Las partículas termorresistentes procedentes de las suspensiones de virus que han sufrido la acción de la temperatura de 56° C. durante seis y doce horas, cultivadas en pases sucesivos poseen características semejantes, no transmitiéndose la termorresistencia totalmente. Estas partículas termorresistentes tampoco poseen diferencias antigénicas entre sí en cuanto a la reacción de fijación del complemento, ni con el virus sin calentar.

Ocho experimentos realizados sobre MCA y piel de conejo indican que una suspensión del virus liberado al medio de cultivo de las células HeLa produce mayor número de lesiones en MCA y lesiones de mayor diámetro en piel de conejo cuando se somete dicha suspensión a la temperatura de 4° C., que las que produce cuando se inocular inmediatamente de obtenerse. Este fenómeno parece indicar que por la acción de la temperatura de 4° C. aumenta el número de partículas infectivas en las primeras horas mediante la activación de partículas víricas que no se encontraban en fase infectiva.

SUMMARY

The thermal inactivation of a dermal strain of vaccinia virus maintained by 28 passages in Hela cells has been studied.

After 6 and 12 hours at 56° C, the virus suspension shows still some infectivity for rabbit skin and choriollantoic membrane (CAM). After 24 hours at this temperature, however, the virus is only infective for Hela cells.

The heat-resistant survivors after 6 and 12 hours at 56° C show similar characteristics when cultured by several passages.

Like Kaplan (8) and Woodroffe (16) we failed to recover genetically heat-resistant variants from such temperature exposed preparations. Both, exposed and non-exposed viruses, also show the same behaviour on the complement fixation test.

Eight experiments have been done to study the influence of storage at 4° C. of both exposed and non-exposed viruses. The titration in both cases was done in rabbit skin and CAM. The titre is always higher when the virus is inoculated after storage than when inoculated either immediately after release from the cells or immediately after heating. This seems to be a phenomenon of reactivation of the virus which takes place during the first 24 hours of chilling at 4° C.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMSTRONG, C. 1929. *Publ. Hlth, Rep. Wash.*, 4, 1.183.
2. DULBECCO, R., y VOGT, M. 1954. *J. Exp. Med.*, 99, 167.
3. FENNER, F. 1958. *Virology*, 5, 502.
4. GIL, C.; GARCÍA GANCEDO, A. P.; ALONSO, M. L., y GALLARDO, E. 1959. *Microbiol. Españ.* 12, 401.
5. GORDON, M. H. 1925. *Med. Res. Counc. Spec. Rep.* n.º 98.
6. GROTH, A. 1929. *Engb. Hyg. Bakt.*, 10, 355.
7. HANAFUSA, T.; HANAFUSA, H., y KAMAHORA, J. 1959. *Virology*, 8, 525.
8. KAPLAN, C. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 58.
9. LEVADITI, C., y NICOLAU, S. 1923. *Ann. Inst. Pasteur*, 37, 1, 38.

10. LEVADITI, C., y LEPINE, P. 1937. Les ultravirus, 34.
11. NADAJE, J.; TAMM, J., y OVERMAN, J. R. 1955. J. Lab. Clin. Med., 46, 648
12. NAKAGAWA, S. 1924. Z. Immunforsch., 40, 278.
13. NYE, R. N., y PASKER, F. 1929. Amer. J. Path., 5, 147.
14. SILBER, A., y WOSTROUCHOWA, E. I. 1932. Z. Immunforsch., 76, 59.
15. STOKER, M. G. P., y ROSS, R. W. 1958. J. Gen. Microbiol., 19, 250.
16. WOODROOFE, G. M. 1960. Virology, 10, 379.
17. ZUAZO, M. R. 1958. Microbiol. Españ., 11, 149.

ESTUDIOS SOBRE LA DEBARIOCIDINA

II. Influencia de la relación superficie/volumen en la producción

POR

JULIO PEREZ-SILVA y ROSARIO GIL ALVAREZ

Uno de los factores que más suelen influir en la marcha de las fermentaciones es la relación entre la superficie libre y el volumen del medio de cultivo (1); ello nos ha movido al estudio de la influencia de dicho factor en la producción de la debariocidina.

MATERIAL Y METODOS

Para la producción del antibiótico utilizamos la estirpe R-XV de nuestra colección de *Bacillus subtilis* que inoculamos en un medio sintético integrado por glucosa, glutamato sódico y sales minerales.

Llevamos a cabo la fermentación en matraces Erlenmeyer Jena de 1 l. de capacidad en los que ponemos diferentes volúmenes (100, 300, 500, 700 y 900 cm³) de medio. Tenemos así cinco valores de s/v (cuadro 1).

Cuadro 1

Matraz	Volumen de medio, cm ³	Superficie libre, cm ²	S/V
1	100	124,6	1,24
2	300	132,6	0,44
3	500	109,3	0,22
4	700	81,6	0,11
5	900	55,4	0,06

El inóculo iniciador es una suspensión de células (9×10^7 bacterias vivas/cm³) de la estirpe R-XV, procedentes de un cultivo de veintitrés horas de incubación a 24° C.

Sembramos en cada matraz cantidades de inóculo proporcionales al volumen de medio (por cada 100 cm³ de medio, inoculamos 0,05 cm³ de la suspensión).

Incubamos a 24° C. en cultivo estacionario, excepto dos de los matraces que contienen 100 cm³ de medio, los cuales se incuban también a la misma temperatura, pero en cultivo sumergido en una cámara de agitación, cuyas bandejas tienen un movimiento de vaivén de 15 cm. de desplazamiento, con una frecuencia de 92 períodos/minuto.

Diariamente tomamos de cada uno de los matraces muestras de 2 cm³, que sustituimos por un volumen igual de pequeñas perlas de vidrio estériles.

Valoramos por el procedimiento ya descrito (4), la actividad de cada una de las muestras frente a *Debaryomyces hloeckeri* 537.

RESULTADOS

La relación superficie/volumen (s/v) tiene influencia sobre dos aspectos de la producción de debariocidina: a) actividad máxima alcanzada, y b) tiempo en que se alcanza la máxima actividad. Así:

La actividad alcanzada (figura 1) va siendo mayor a medida que se eleva el valor de s/v; cuando éste es de 1,24, se alcanza una actividad de 31 mm. (diámetro del halo de inhibición). Con el cultivo sumergido se consigue un aumento de sólo 1 mm. en la actividad; esta diferencia, dado el error que puede encerrar el método de valoración (4), no es de tomar en consideración.

En la gráfica de la figura 2 se adopta como criterio de comparación el tiempo en que se alcanza la máxima actividad. Por el examen de dicha gráfica se aprecia que, en general, este tiempo se va abreviando a medida que aumenta el valor de s/v. En este aspecto se consigue una considerable ventaja al pasar del cultivo estacionario óptimo al cultivo sumergido, ya que con ello se acorta en dos días el tiempo requerido para alcanzar el máximo en la actividad.

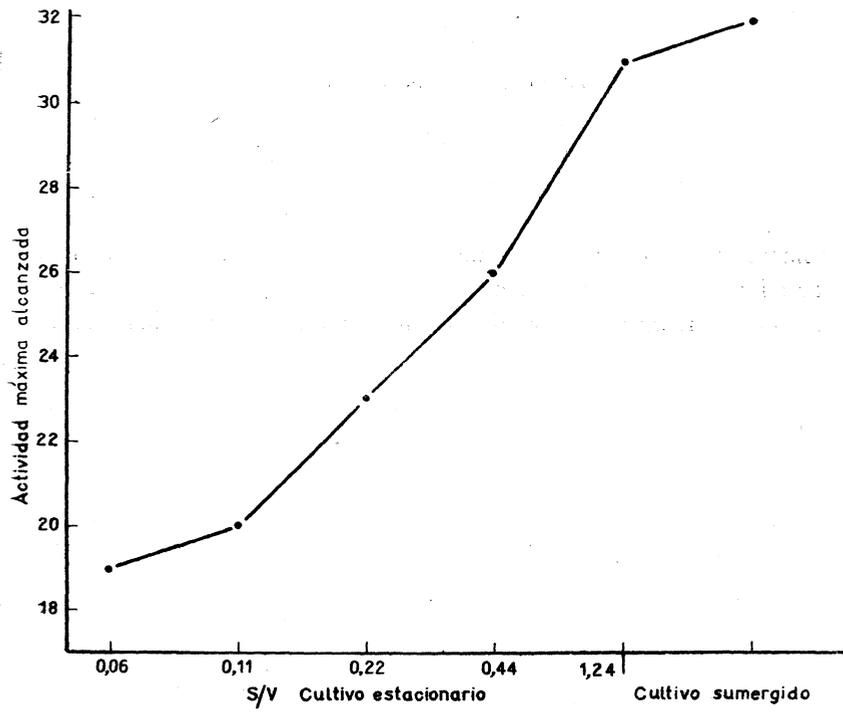


Figura 1. Influencia de la relación superficie/volumen en el rendimiento de debariocidina

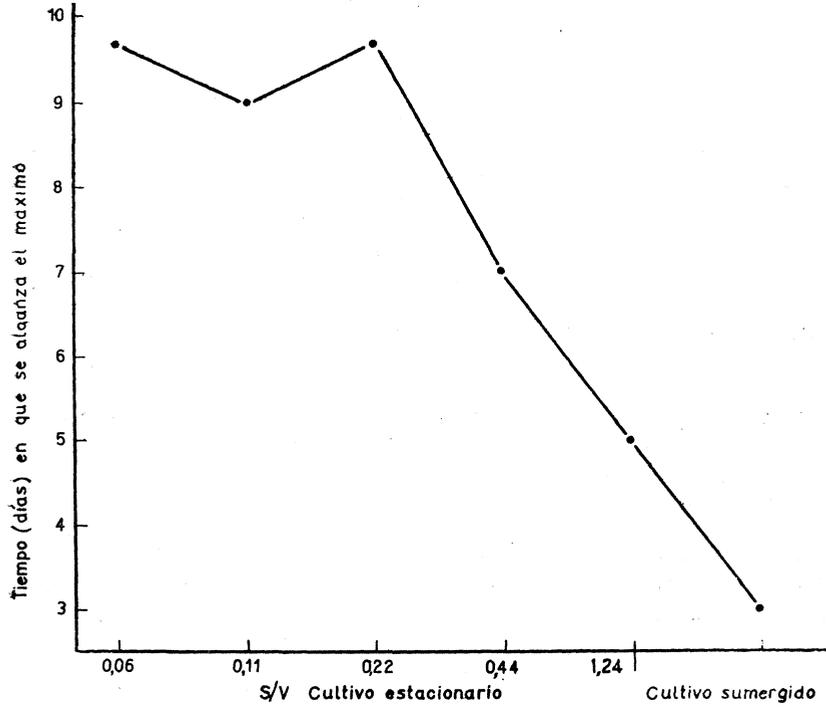


Figura 2. Influencia de la relación superficie/volumen en la velocidad de producción de debariocidina

DISCUSION

Es importante el determinar el momento en que se alcanza el máximo en la actividad, ya que, según hemos observado en todos nuestros experimentos (3), el máximo va seguido de una caída en la actividad. Ade-

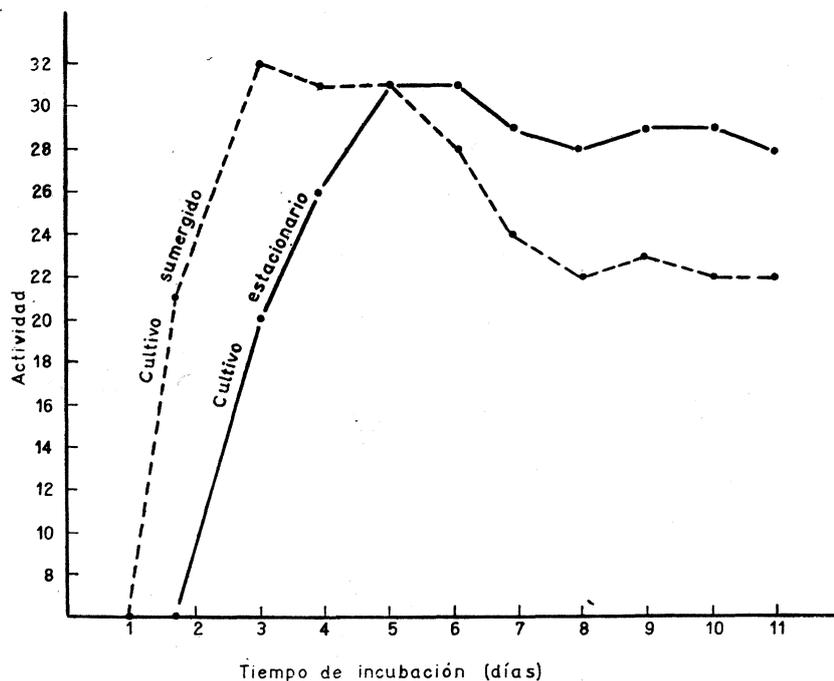


Figura 3. Producción de debariocidina en cultivo sumergido y en cultivo estacionario

más del interés práctico que esta observación encierra, creemos ver en ella un hecho que está de acuerdo con nuestra idea (2) de que la debariocidina es un producto de síntesis que, después que ha sido vertido al medio, puede ser utilizado por el propio *Bacillus subtilis*. En efecto, si comparamos (figura 3) la curva de producción en cultivo estacionario con la que se obtiene en cultivo sumergido, veremos que en este último el descenso en la actividad es más acusado que en el primero; relacionando este hecho con la observación de que cuando la fermentación se realiza en cultivo sumergido hay una lisis parcial (a veces total) del cultivo, des-

pués de la fase logarítmica, podemos interpretar este mayor descenso en la actividad suponiendo que, como consecuencia de la lisis, quedarían en libertad sustancias (¿enzimas?) intracelulares que, actuando sobre el antibiótico, le restan actividad.

RESUMEN

Se compara la producción de debariocidina a diferentes valores de s/v y se llega al conocimiento de que, a medida que ésta aumenta, la producción de antibiótico es mayor y más rápida.

En cultivo sumergido se adelanta el momento de máxima producción, pero este máximo no se eleva con respecto al cultivo estacionario.

SUMMARY

From the comparative studies on debariocidin production at different s/v relations we conclude that the production is higher and quicker when the s/v relation increases.

In submerged culture the highest production is obtained earlier but the peak is not higher than the stationary culture.

BIBLIOGRAFIA

1. FOSTER, J. W. 1949. Chemical activities of fungi. Academic Press Inc., Publishers, Nueva York.
2. PÉREZ SILVA, J. 1960. Influencia de la temperatura en la producción e inactivación de la debariocidina. (Inédito.)
3. PÉREZ SILVA, J. 1959. Un nuevo antibiótico: condiciones de producción, aislamiento, purificación y estudio. (Memoria presentada a la Fundación "Juan March".)
4. PÉREZ SILVA, J., y LAHOZ, R. 1958. Nota previa acerca de un nuevo antibiótico. Microbiol. Españ., 11, 255-263.

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

THE GROWTH OF *NOCARDIA* V. ON VARIOUS AROMATIC COMPOUNDS

BY
JULIO RODRIGUEZ-VILLANUEVA (*)

Since some species of the genus *Nocardia* have been reported Bergey (1), Moore (2), Cain (3) to utilise various aromatic compounds for growth it was of interest to determine whether the organism used in the present studies would be able to utilise such compounds for the synthesis of cellular mater. Consequently a study has been carried out of the ability of *Nocardia* V. to utilise various aromatic compounds for growth and the results are reported in the following sections.

MATERIALS AND METHODS

Growth media

Ammonium sulphate medium (4) was used in all cases with the omission of either glucose or both glucose and ammonium salt, and the aromatic compound add to the basal medium at the concentration indicated in Table I.

Growth conditions

Experiments were carried out in 25 ml. Erlenmeyer flasks containing 10 ml. of medium. The aromatic compounds were sterilised by the use of Seitz filters and added at the appropriate concentrations to the basal

(*) I wish to thank to the Ramsay Memorial Fellowship Trust of London, for a grant during the tenure of which this work was carried out.

system after autoclaving. Each flask was inoculated with 0.1 ml. of a 22 hr. culture grown in ammonium sulphate medium in test tubes. Incubation was carried out with shaking at 30° C. for 16 days growth being estimated visually by following the increase in turbidity.

Table 1. Aromatic compounds able to act as carbon source for growth of *Nocardia V.*

Compound added	Concentration (percent w/v)	Growth
o-, m- and p-nitrophenols	0.025	±
o-, m- and p-aminophenols	0.025	—
2:4-dinitrophenol	0.025	—
2-amino-4-nitrophenol	0.025	—
2-nitro-4-aminophenol	0.025	±
o-nitrobenzoic acid	0.050	+
m-nitrobenzoic acid	0.050	+
p-nitrobenzoic acid	0.050	+++
o-, m- and p-aminobenzoic acids	0.050	—
p-hydroxylaminobenzoic acid	0.050	+++
benzoic acid	0.050	+++
p-hydroxybenzoic acid	0.050	+++
phenol	0.025	++
catechol	0.025	—
resorcinol	0.025	—
protocatechuic acid	0.050	++
2:5- and 3:5-dihydroxybenzoic acids	0.050	±
o-, m- and p-dinitrobenzenes	0.025	—
o-, m- and p-nitroanilines	0.025	—
p-nitrotoluene	0.025	—
o-, m- and p-diaminobenzenes	0.025	—
p-nitrosalicylic acid	0.050	±
p-aminosalicylic acid	0.050	—
1:3:5-trinitrobenzene	0.025	—
picric acid	0.050	—
picramic acid	0.050	—

RESULTS AND DISCUSSION

Ability of various aromatic compounds to act as sole carbon source for the growth of the organism

For this purpose an experiment (as described above) was performed in which various aromatic compounds were added one at a time at the indicated concentration to the basal system from which the glucose had been omitted.

As seen in Table I, only a few aromatic compounds are able to act as sole carbon source for growth. Of the series of nitro compounds and their derivatives studied, only the isomers of the nitrobenzoic acid and their hydroxylamine derivatives gave rise to significant growth of *Nocardia V.* although slight growth was observed on some others. These results are in accord with those reported by Cain (3) for certain species of *Nocardia*.

Nitro compounds able to act as nitrogen source for the growth of Nocardia V.

A further study was undertaken to test the ability of various aromatic nitro compounds to support growth of the organism in the absence of the nitrogen sources. The nitro compounds or their derivatives were added, at the concentration indicated, to the basal system from which the ammonium salt was omitted. Only p-nitrobenzoic acid and its p-hydroxylamine derivative promoted full growth of *Nocardia V.*, growth on the p-hydroxylaminobenzoic acid occurring after a lag of four days.

An apparent anomaly arises in the case of p-aminobenzoic acid, which did not support growth but which might be formed by the metabolism of p-nitrobenzoic acid which does support growth. It seemed possible that the concentration of p-aminobenzoic acid was so high as to be inhibitory for the growth of the organism. However, this possibility was discarded after repetition of the experiment using concentrations of p-aminobenzoic acid as low as 0.001 per cent (w/v) when again no growth was observed, or adding the higher concentration (0.5 per cent) to a flask containing 0.05 per cent p-nitrobenzoic acid, in which case

growth occurred as in a control without p-aminobenzoic acid. The possibility that prior adaptation was necessary for the utilization of the amino compound was investigated; cells were grown in the presence of p-nitrobenzoic acid and then transferred to the medium containing the amino derivative; no growth was detected. It is concluded that p-aminobenzoic acid is not utilised for growth of *Nocardia V.*

Although the organism under investigation can utilise certain aromatic (nitro) compounds as the sole carbon and nitrogen source for growth, no systematic studies on the metabolism of these substances have been carried out here, research on the intermediate metabolic products being left for later investigation.

SUMMARY

A study was performed in which was tested the ability of *Nocardia V.* to utilise a large serie of aromatic compounds, acting as sole carbon and nitrogen sources for growth. Only benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, phenol, protocatechuic acid, the isomers of the nitrobenzoic acid and their hydroxylamine derivatives produced significant growth of the organism when those acted as only carbon sources. However, the only compounds able to act as sole nitrogen source were p-nitrobenzoic acid and its p-hydroxylamine derivative. p-Aminobenzoic acid, in marked contrast, was not utilised for growth of *Nocardia V.*, the reasons of this apparent anomaly being discussed.

RESUMEN

Se efectuó un estudio en el que se ensayó la facultad de ser utilizados por el actinomiceto *Nocardia V.* una larga serie de compuestos aromáticos como única fuente de carbono y nitrógeno. De todos ellos, sólo el ácido benzoico, ácido p-hidroxibenzoico, fenol, ácido protocatéuico, isómeros del ácido nitrobenzoico y sus derivados hidroxilamínicos, son utilizados cuando se emplean como única fuente de carbono en el medio de cultivo. En un estudio paralelo, pero bajo el aspecto de utilización del compuesto aromático como única fuente de nitrógeno, sólo eran utilizados el ácido p-nitrobenzoico y su derivado, el p-hidroxilaminoben-

zoico. A la vista de estos últimos resultados y en señalado contraste, se destaca el hecho de que no pueda utilizar el ácido p-aminobenzoico, discutiéndose las razones de tal anomalía.

REFERENCES

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1948. 6th Ed. Edited by Breed, E. S., Murray, E. G. D., and Hitchens, A. P. Pub. Bailliere, Tindall & Cox, London.
2. MOORE, F. W. 1949. J. Gen Microbiol., 3, 143.
3. CAIN, R. B. 1948 J. Gen Microbiol., 19, 1.
4. VILLANUEVA, J. R. 1960. Microbiol. Españ., 13, 169.

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

DESARROLLO DE LA RESISTENCIA A PENICILINA,
ESTREPTOMICINA Y AUREOMICINA EN
MYCOBACTERIUM PHLEI Y *ESCHERICHIA COLI*

POR
GENOVEVA TEJERINA (*)

La relación entre bacteria y antibiótico ofrece interés, tanto desde el punto de vista terapéutico como de pura investigación. Se ha señalado a cada substancia antibiótica un determinado espectro bacteriano y simultáneamente cada una de las bacterias ha sido caracterizada por su comportamiento específico frente a diversas concentraciones de antibióticos. Estas relaciones han ido perdiendo el carácter estático que se les atribuyó en un principio, y hoy hemos llegado a concebir el proceso de acción antibiótica con tal complejidad, que hace sumamente difícil la interpretación en cualquiera de sus aspectos; ya que las irregularidades que cada día se observan, obligan a admitir de forma nada despreciable, una serie de factores que forzosamente han de restar sencillez a toda interpretación.

En general, los antibióticos alcanzan su máxima eficacia cuando actúan en un medio donde las bacterias se desarrollan y multiplican activamente (1-3), lo que permite señalar que su acción ha de manifestarse interrumpiendo o modificando alguno de los procesos metabólicos habituales en la célula, provocando en ella respuestas bien acusadas.

Las formas resistentes difieren de las estirpes originarias sensibles, en muchas propiedades distintas a la resistencia a los antibióticos, que pueden afectar a la utilización de hidratos de carbono (4), utilización o síntesis de aminoácidos (5), o factores de desarrollo, sensibilidad a su fago (6), cambio de virulencia (7), morfología (8), etc., aunque no siem-

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

pre es fácil distinguir cuándo estas variaciones son debidas directamente al efecto del antibiótico y cuándo son ocasionadas de forma indirecta.

En cualquier caso no hay duda de que estos cambios asociados a la resistencia pueden ser indicadores de algunas transformaciones íntimas en la vida metabólica de la bacteria, que bien podrían ayudar a conocer el por qué de su respuesta al antibiótico. Precisamente, basándose en estas transformaciones intentaron ya en el año 1925, Morgenroth y Schnitzer (9), una clasificación de bacterias resistentes a las distintas drogas usadas en la época, clasificación que ha permanecido bastante desconocida hasta que el problema de resistencia bacteriana a antibióticos ha adquirido el interés actual.

El presente trabajo se refiere a dos bacterias, una muy utilizada en las experiencias de resistencia antibiótica (*E. coli*) y otra de la que es muy escaso el conocimiento que se tiene en este aspecto (*M. phlei*). Nuestro propósito es estudiar en ambas su comportamiento frente a diversos antibióticos, constancia del mismo y modificaciones que llegan a experimentar como consecuencia del tratamiento a que se les somete

MATERIAL Y METODOS

Los antibióticos empleados son penicilina, estreptomina y aureomicina, cuyas características y forma de empleo son las mismas que reseñamos en otra ocasión (10).

En las experiencias a desarrollar utilizamos el *Mycobacterium phlei*, perteneciente a la colección del Instituto Jaime Ferrán, de Microbiología, y *Escherichia coli*, de la misma colección.

El medio de cultivo es caldo común y agar caldo, preparados con extracto de carne Difco a pH 7,2.

Los métodos seguidos para lograr formas de resistencia son dos: de exposición gradual y exposición única, que practicamos siguiendo las indicaciones ya apuntadas (10). El inóculo empleado en las experiencias de exposición única es 6×10^8 microorganismo/cm³ para *M. phlei* y $0,16 \times 10^9$ para *E. coli*, y las concentraciones de antibióticos que empleamos son las mismas utilizadas en el método gradual para obtener formas resistentes de una manera lenta frente a dosis sucesivamente crecientes. Seguimos, asimismo, idéntica técnica que la entonces seña-

lada para la observación de cambios morfológicos, y las modificaciones en las respuestas bioquímicas de las formas resistentes se observan en medios de cultivo que revelan: utilización de urea, producción de SH_2 , reducción de nitratos, acción sobre leche tornasolada, utilización de proteína, formación de indol, prueba del rojo de metilo, utilización de citrato, producción de acetilmetilcarbinol, fluidificación de gelatina y utilización de diferentes compuestos carbonados.

RESULTADOS

El *M. phlei* nos revela su notable sensibilidad a todos los antibióticos ensayados, ya que su desarrollo queda claramente inhibido por las siguientes concentraciones mínimas: 3 U. I. de penicilina, 3 γ de estreptomycinina y 1 γ de aureomicina/cm³. Siguiendo el método de exposición gra-

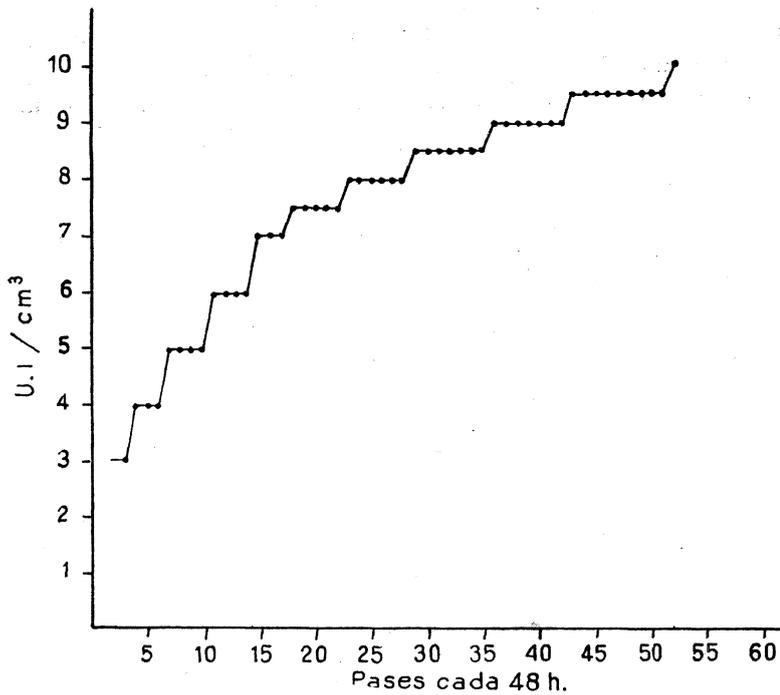


Figura 1. *M. phlei*. Resistencia a penicilina

dual, se consiguen formas resistentes con bastante dificultad en el caso de la penicilina, como indica la figura 1, así como frente a aureomicina (figura 2), mientras que la resistencia evoluciona con mayor facilidad cuando se trata de estreptomina, lográndose resistencia a $100.000\gamma/\text{cm}^3$ de la forma que indica la figura 3. Las primeras colonias resistentes aparecen distribuidas irregularmente sobre la zona con antibiótico, y su tamaño y desarrollo suelen ser inferiores a los característicos de la forma normal; tan sólo después de varios pases continuados, tienden a igualarse. En el caso concreto de que la concentración de estreptomina sea de $1.000\gamma/\text{cm}^3$, se manifiesta una marcada dependencia del *M. phlei*, que crece solamente sobre el antibiótico y no se desarrolla en el área no alcanzada por éste (figura 6). Cuando el método seguido es de exposición única no hemos podido señalar la presencia de formas resistentes, a pesar de utilizar las mismas concentraciones de antibióticos que en el método anterior.

Quando se trata de *E. coli*, los ensayos de prueba lo revelan sensible a 100 U. I. de penicilina, 3 γ de estreptomina y 10 γ de aureomicina/ cm^3 . Su comportamiento frente al primero de estos antibióticos es muy inconstante, especialmente durante las etapas iniciales efectuadas según

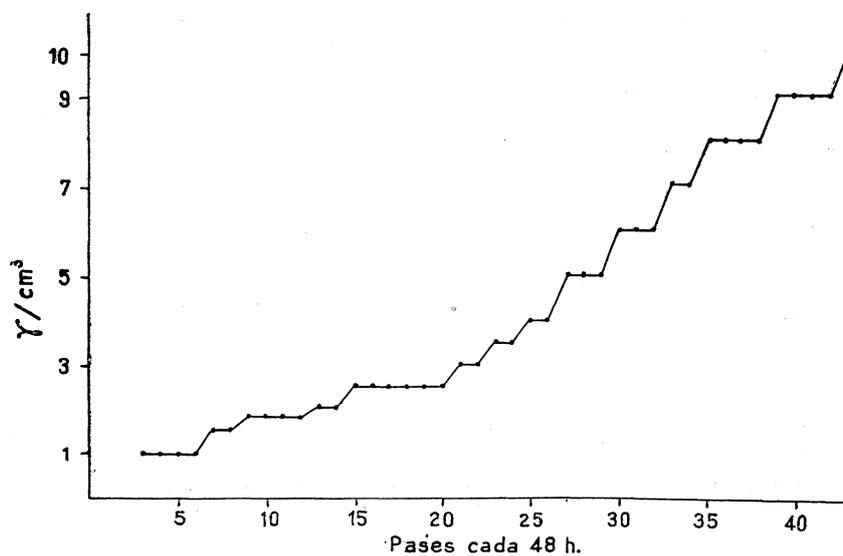


Figura 2. *M. phlei*. Resistencia a aureomicina

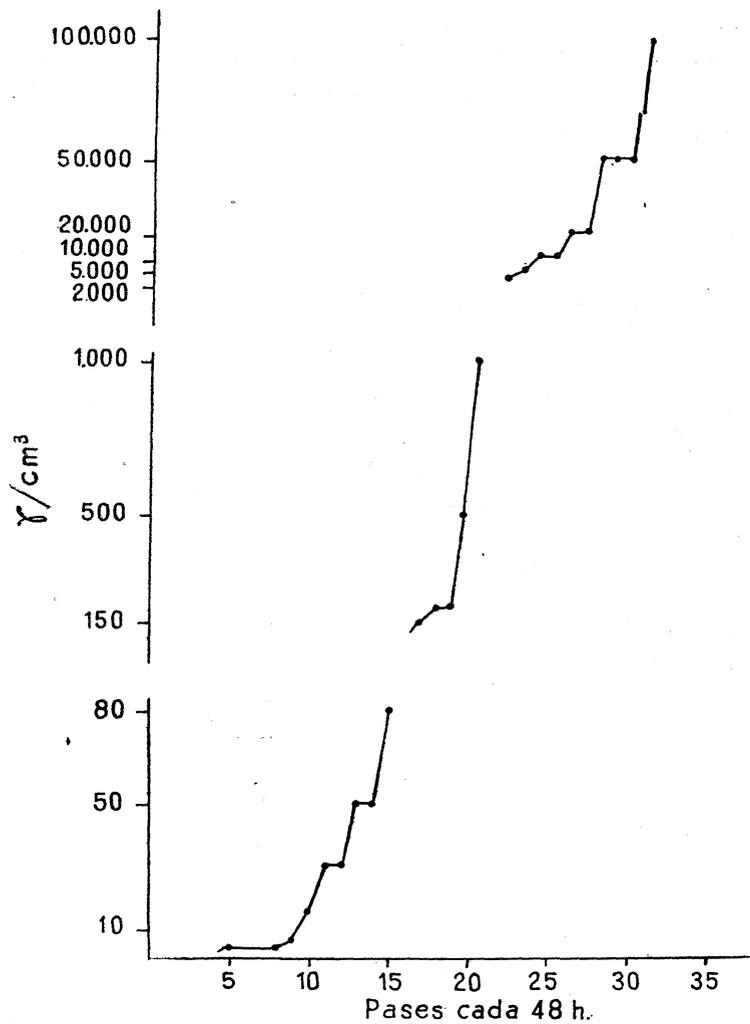


Figura 3. *M. phlei*. Resistencia a estreptomina

la técnica de exposición gradual. Las formas de máxima resistencia que obtenemos se desarrollan perfectamente a 1.000 U. I. de penicilina/cm³, sin que ello suponga que mantienen de manera constante su carácter resistente a concentraciones inferiores. Menos acusado se presenta este carácter irregular cuando se trata de resistencia a otros antibióticos:

estreptomicina y aureomicina. En el caso concreto de la estreptomicina, la resistencia de *E. coli* hasta 200.000 γ se logra, según indica la figura 4, con la particularidad de acusar una definida dependencia a la concentración de 40.000 γ/cm^3 , como se observa en la figura 7. Cuando se trata de

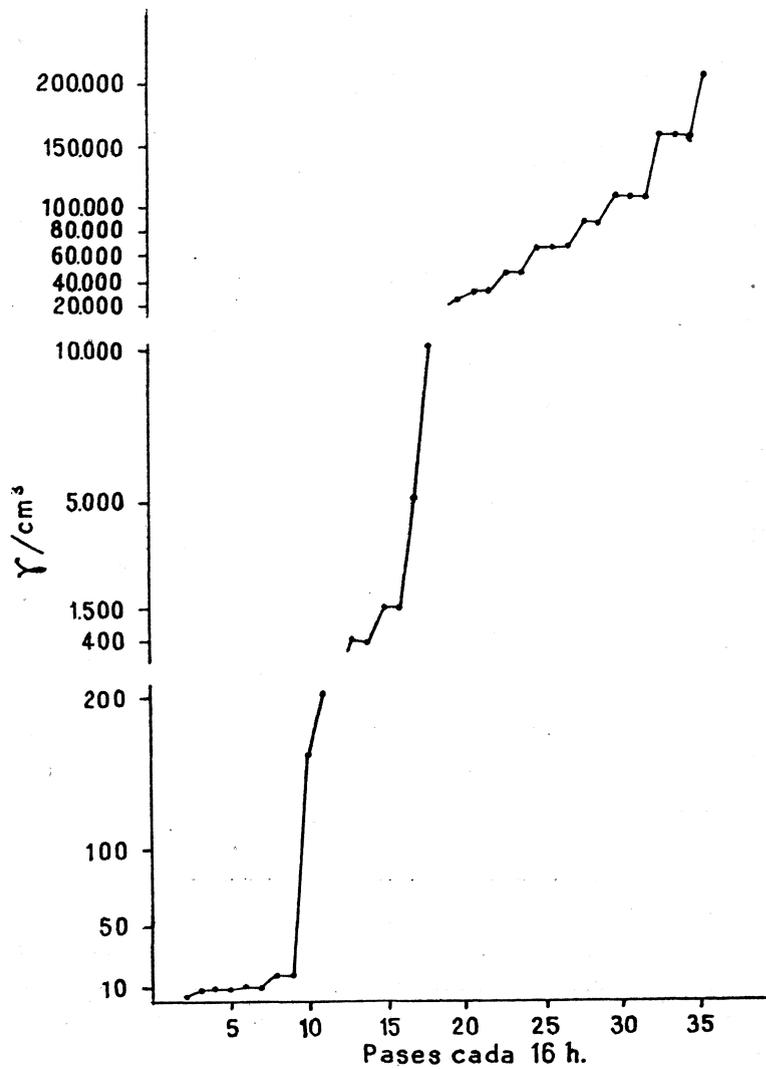


Figura 4. *E. coli*. Resistencia a estreptomicina

aureomicina no aparece ninguna dependencia y el desarrollo de resistencia hasta $500\gamma/\text{cm}^3$ transcurre como en la figura 5.

Carácter propio de *E. coli* resistente a penicilina es la morfología de sus colonias, que presentan aspecto distinto al de la estirpe sensible:

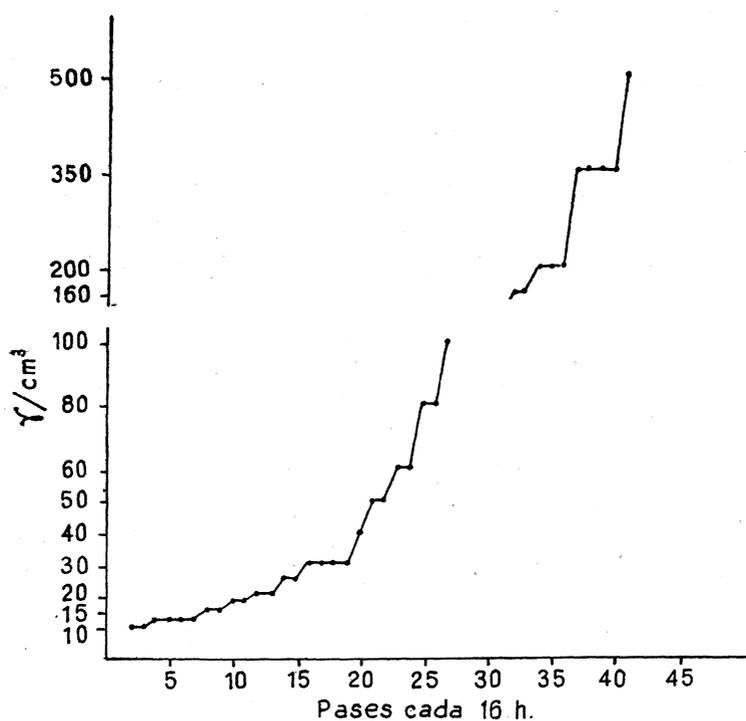


Figura 5. *E. coli*. Resistencia a aureomicina

son de más lenta evolución y su tamaño no alcanza el que corresponde a la forma originaria, sino que se mantiene dentro de límites siempre inferiores (figura 8).

Las experiencias por exposición única se practican con una población de *E. coli* de $0,16 \times 10^9/\text{cm}^3$ frente a las concentraciones de antibiótico para las que se obtuvieron formas resistentes por el método anterior. En ninguno de los casos hemos podido observar colonias resistentes. La figura 9 corresponde a la prueba con estreptomina.

Durante todos estos ensayos hemos comprobado la acción constante

de los antibióticos en la morfología de los microorganismos sobre los que actúan. Aparte del aspecto de las colonias, se puede observar cómo las formas normales que se hacen resistentes evolucionan, adoptando distinta configuración, característica en cada caso. Cuando se trata de *M. phlei*, aparecen, tanto en preparaciones teñidas como en fase, formas bandeadas más largas que el bacilo normal y simultáneamente se observan pequeñas deformaciones que van creciendo en tamaño hasta formar grandes abultamientos, de aspecto más o menos ovalado en un principio y con tendencia a redondearse posteriormente. Estas variaciones se pueden observar en las figuras 10 y 11. En el caso de *E. coli* observamos cómo algunos bacilos evolucionan hacia formas irregulares y heterogéneas de gran volumen y transparencia, que se desintegran y desaparecen, quedando tan sólo sus residuos en el medio. Simultáneamente a esta transformación, podemos señalar en otros bacilos de la misma población una serie de cambios morfológicos que se suceden con gran regularidad, de los cuales la primera fase está representada en la figura 12, y da lugar posteriormente a formaciones esféricas de gran tamaño (figura 13), que se identifican con formas *L* en su fase grande, según el ciclo establecido por Rubio (11). Cuando estas formas revierten a la forma bacilar normal, sus propiedades habituales se ven incrementadas por un grado de resistencia al antibiótico inductor, que en alguna ocasión coincide con la concentración antibiótica utilizada, aunque con gran frecuencia pueden presentar valores inferiores o, por el contrario, mostrar una resistencia a concentraciones más elevadas que aquella que se empleó.

Teniendo en cuenta que la resistencia de los microorganismos inicialmente sensibles a un antibiótico puede relacionarse con alguna de sus funciones metabólicas, observamos estos cambios en los medios de cultivo ya indicados, además de los que revelan la utilización de arabinosa, ramnosa, xilosa, glucosa, levulosa, galactosa, manosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, melibiosa, celobiosa, rafinosa, melecitosa, almidón, dextrina, glicerina, eritrita, adonita, manita, sorbita, dulcita, salicina, inosita y α -metilglucósido. En los cuadros 1 y 2 indicamos exclusivamente aquellos resultados que revelan algunas diferencias.

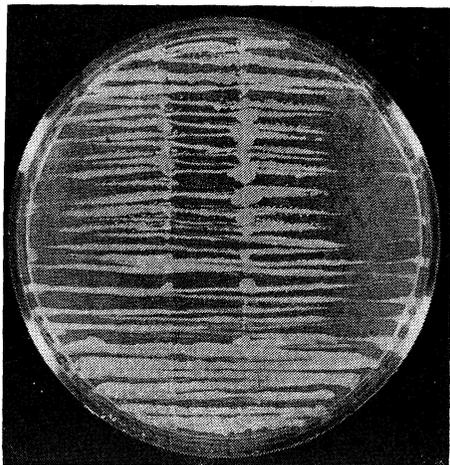


Figura 6

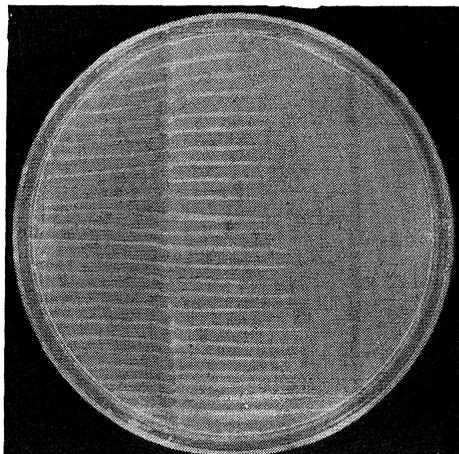


Figura 7

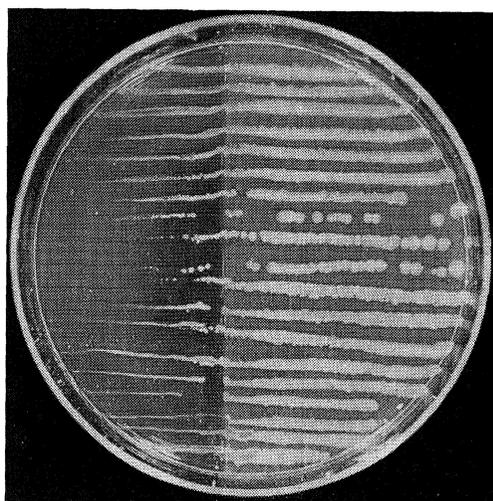


Figura 8

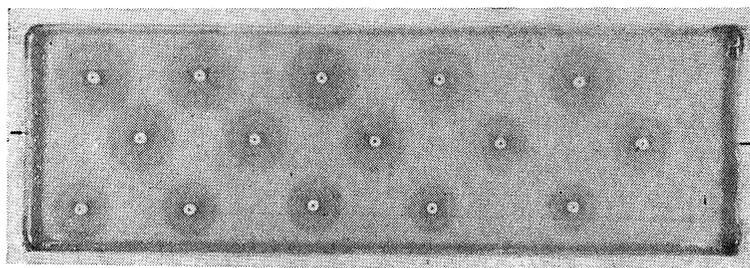


Figura 9



Figura 10

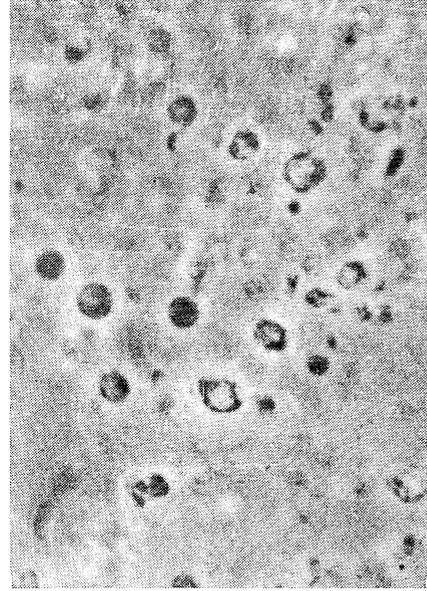


Figura 13

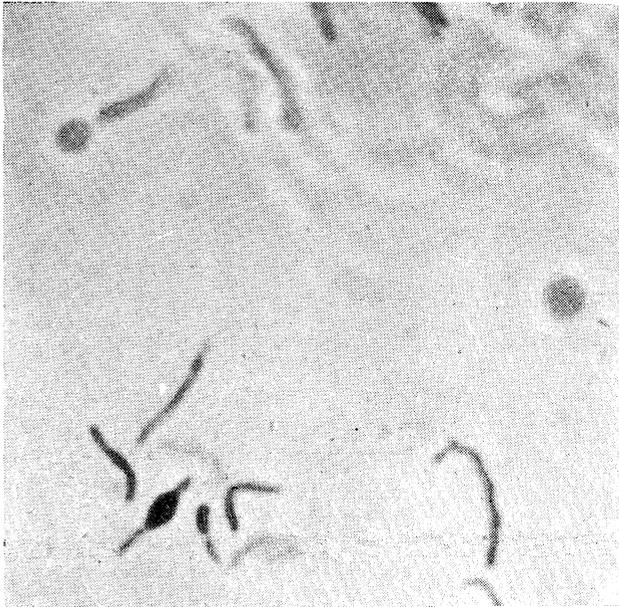


Figura 11



Figura 12

Cuadro 1. Modificaciones en las propiedades bioquímicas del *Mycobacterium phlei* resistente, en distintos grados, a penicilina, estreptomina y aureomicina

Antibiótico	Título de resistencia	Ram-nosa	Galac-tosa	Manosa	Lactosa	Saca-rosa	Maltosa	Dex-trina	Adonita	Sorbita	Dulcita
Penicilina U. I./cm ³	Sensible	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—
	2,0		+	—		—	+			—	
	3,0		—	+		+	+			+	
	4,0		—	+		+	+			—	
	5,0		+	+		—	—			+	
	7,0		+	—		+	+			+	
	7,5		—	+		—	—			+	
	8,0		—	—		+	—			+	
	8,5		—	+		+	—			+	
	9,0		—	+		—	—			+	
	9,5		—	+		+	—			+	
10,0		—	+		+	—			+		
Estreptomi-cina, γ /cm ³	3		+			+	+	+		—	
	50		+			—	+	—		—	
	200		+			—	+	—		+	
	1.000		—			+	—	+		+	
	5.000		—			+	—	+		—	
	10.000		+			—	+	—		+	
	20.000		—			+	—	+		+	
	50.000		+			+	—	—		+	
100.000		—			+	—	+		+		
Aureomicina, γ /cm ³	1	—		+	+	+			—	+	—
	2	+		+	+	+			+	+	+
	3	+		+	+	+			+	+	+
	4	+		+	+	+			+	+	+
	5	+		+	+	+			+	+	+
	6	+		+	+	+			+	+	+
	7	+		+	+	+			+	+	+
	9	+		+	+	+			+	+	+
	10	+		+	+	+			+	+	+

Desarrollo de resistencia a antibióticos en *M. phlei* y *E. coli* 403

Cuadro 2. Modificaciones en las propiedades bioquímicas del *Escherichia coli* resistente, en distintos grados, a penicilina, estreptomina y aureomicina

Antibiótico	Título de resistencia	Celobiosa	Rafinosa	Inosita	Salicina	Esculina
	Sensible	+	+	-	+	+
Penicilina U. I./cm ³	100	+	-	-	+	+
	300	+	-	-	+	+
	500	+	-	-	+	-
	700	-	-	-	+	-
	1.000	-	-	-	-	-
Estreptomina, γ/cm ³	3	+	+	+	-	-
	16	+	-	+	-	-
	200	-	-	+	-	-
	1.500	+	-	+	-	-
	20.000	+	-	+	-	-
	60.000	-	-	+	-	-
	100.000	-	-	+	-	-
200.000	-	-	+	-	-	
Aureomicina, γ/cm ³	10	-	+	-	-	-
	15	-	+	-	-	-
	30	-	+	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
	100	-	+	-	-	-
	160	-	-	-	-	-
	300	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	

CONSIDERACIONES

El método seguido para conseguir formas bacterianas resistentes a antibióticos ofrece un destacado interés respecto a la interpretación del mecanismo de resistencia. Cuando la técnica seguida es de exposición gradual frente a dosis paulatinamente crecientes de antibiótico, hemos conseguido poblaciones resistentes a cada una de ellas, capaces a su vez de presentar mayor grado de resistencia por contacto con concentraciones cada vez más elevadas del antibiótico. Por el contrario, cuando el método es de exposición única, pese a trabajar con abundantes concentraciones de microorganismos (superiores a $1 \times 10^8/\text{cm}^3$), no observamos aparición de formas resistentes para las mismas dosis de antibióticos empleadas con éxito en el método anterior. La manera lenta y suave con que vemos se presenta la resistencia sugiere una posible sustitución en el desarrollo bacteriano, de pasos metabólicos afectados más o menos intensamente por el antibiótico.

La respuesta que en las características morfológicas hemos observado no siempre es idéntica para todos los individuos de una misma población. Esto podría justificarse considerando que no todos son sorprendidos por el antibiótico en idéntica fase de evolución, lo que no hay duda puede conferir a la bacteria ventaja o desventaja en su ulterior comportamiento. Esta misma razón justificaría las modificaciones arbitrarias que señalamos en su comportamiento bioquímico, sin que sea posible relacionarlas causalmente con la manifestación de una determinada resistencia.

Si, además, tenemos en cuenta que algunas de las formas resistentes, en especial las obtenidas a través del ciclo *L*, no ofrecen constancia respecto a la intensidad de su resistencia, podemos concluir por todos los resultados obtenidos, que el mecanismo por el cual aparecen microorganismos resistentes a los antibióticos probados (penicilina, estreptomina y aureomicina) está relacionado íntimamente con un proceso de adaptación experimentado durante su contacto con la sustancia antibiótica.

RESUMEN

Estudiamos la manera de obtener formas resistentes de *M. phlei* y *E. coli* frente a diversos antibióticos y las características peculiares impuestas por la técnica empleada.

Se observa que los microorganismos empleados muestran resistencia a estreptomycin con más rapidez que en el caso de aureomicina y penicilina. Todos acusan modificaciones en su morfología típica, con aparición de formas pertenecientes al ciclo *L* en el caso de *E. coli*, si bien el grado de resistencia que estas presentan no siempre guarda relación con la concentración del antibiótico que las indujo.

El efecto de los distintos antibióticos se manifiesta también en modificación de las funciones bioquímicas, sin que en este punto sea posible establecer una relación directa a causa de la inconstancia que acusan tales cambios.

Los resultados obtenidos hablan en favor de un proceso de adaptación, responsable de la resistencia.

SUMMARY

Technics used —and their characteristics— to obtain resistant strains of *Mycobacterium phlei* and *Escherichia coli* to antibiotics are studied. It is also considered the process of resistance according to the nature of the antibiotic under work (penicillin, streptomycin and aureomycin).

Morphological and biochemical changes can be found according to the state of resistance. The development of *L*. cycle during the process of resistance appear to be a response of *E. coli*.

Results seem to agree in favour of mechanisms of adaptation responsible for resistance.

BIBLIOGRAFIA

1. SACKS, L. E. 1952. Antibiotics and Chemotherapy, 2, 411.
2. HAIGHT, T. H., y FINLAND, M. 1952. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 81, 188.
3. CREMA, A., y BAROLI, F. 1953. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 29, 299.

4. KLIMEK, J. W.; CAVALLITO, C. J., y BAILEY, J. H. 1948. J. Bacteriol., 68, 617.
5. BONDI, A.; KORNBLUM, J., y DE ST. PHALLE, M. 1954. J. Bacteriol., 68, 617.
6. WALLMARK, G. 1954. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 34, 191.
7. GARBER, E. B.; NOBLE, K., y CAROUSO, N. 1953. J. Bacteriol., 65, 485.
8. WRIGHT, S. S., y FINLAND, M. 1954. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 85, 40.
9. MORGENROTH, J., y SCHNITZER, R. 1925. Deut. Med. Wochschr., 51, 675.
10. TEJERINA-DOMÍNGUEZ, G. 1959. Microbiol. Españ., 12, 383.
11. RUBIO-HUERTOS, M. 1957. Microbiol. Españ., 10, 361.

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

UN METODO RAPIDO Y SENCILLO PARA EL AISLAMIENTO DE NUEVOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIOTICOS

POR

EMILIO MUÑOZ RUIZ y JULIO RODRIGUEZ-VILLANUEVA

Numerosos laboratorios desarrollan extensos programas de investigación de nuevos antibióticos, especialmente de aquellos producidos por especies de *Streptomyces*, lo que ha dado lugar al hallazgo de una gran variedad de agentes para el control de infecciones. Es evidente el valor de métodos sencillos de aislamiento de organismos productores de tales antibióticos, para evitar esfuerzos innecesarios. Varias técnicas microbiológicas han sido utilizadas rutinariamente. En este trabajo se describe un técnica rápida para el aislamiento de organismos productores de tales sustancias, capaces de actuar sobre una serie tipo de bacterias u otros organismos, que ofrece considerables ventajas sobre otros métodos normalmente utilizados.

MATERIAL Y METODO

Aislamiento del organismo productor de antibióticos

Los organismos posibles productores de antibióticos, se aíslan de muestras de suelo u otro determinado origen, por los métodos clásicos de obtención de cultivos puros.

Medios de cultivo

Se deben utilizar medios de cultivo apropiados para el desarrollo de los organismos en estudio, solidificados por adición de un 2 por 100 de agar.

Descripción del "sello" utilizado para la siembra en placa

El "sello", principal motivo de esta publicación, se puede hacer de un trozo de madera en el que se cortan una serie de canales angulares, de forma que resulten en los bordes una serie de aristas agudas en un mismo plano (figura 1). Este "sello" se esteriliza en el autoclave, una vez envuelto en papel. La madera de que se hace el instrumento ha de ser de fuerte consistencia para facilitar su duración a través de las esterilizaciones a que se ha de someter cada vez que se emplee.

Preparación de las placas "tampón"

Para la preparación de las placas "tampón" se toma con el asa de siembra muestra de los diferentes microorganismos, cuya sensibilidad a las posibles sustancias antibióticas se desea ensayar, y se pasa por cada una de las aristas del "sello", de forma que en cada arista se ponga una bacteria diferente. Entonces se imprime suavemente la "marca" del "sello" sobre la superficie del medio de cultivo de la placa y se incuba durante el tiempo preciso para que se observe un desarrollo bien manifiesto, y no excesivo, de cada uno de los organismos tipo. Esta placa servirá de "tampón" en donde se ha de "mojar" el "sello" estéril. Para esto se pone en contacto cada una de las aristas del "sello" con la colonia correspondiente de cada organismo (p. ej., bacterias) crecida en forma lineal. Una vez separado el "sello" se procede a la siembra de las placas en las que se ha desarrollado ya el organismo productor de antibiótico (p. ej., un *Streptomyces*) objeto de investigación. Cada vez que se "moja" el "sello" en las placas "tampón" se puede sembrar del orden de 6 a 8 placas con cierta garantía de un desarrollo uniforme.

Descripción del método a seguir para detectar la producción de antibióticos

El método consta esencialmente de las siguientes partes:

1. Preparación de una serie de placas de Petri conteniendo el medio de cultivo.

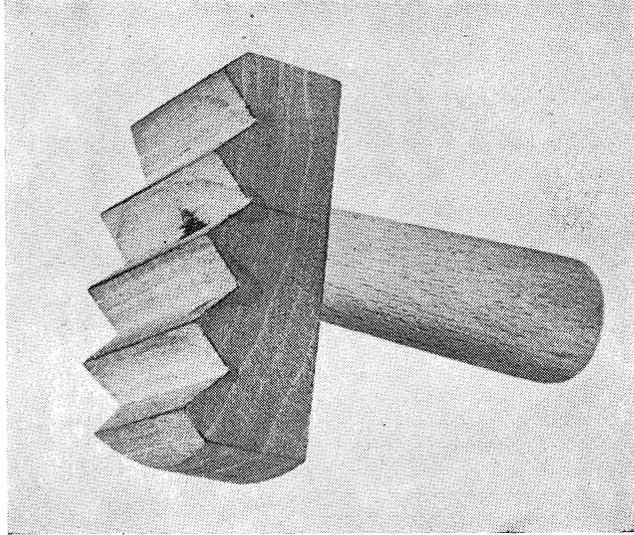


Figura 1. "Sello" utilizado para la siembra en placa

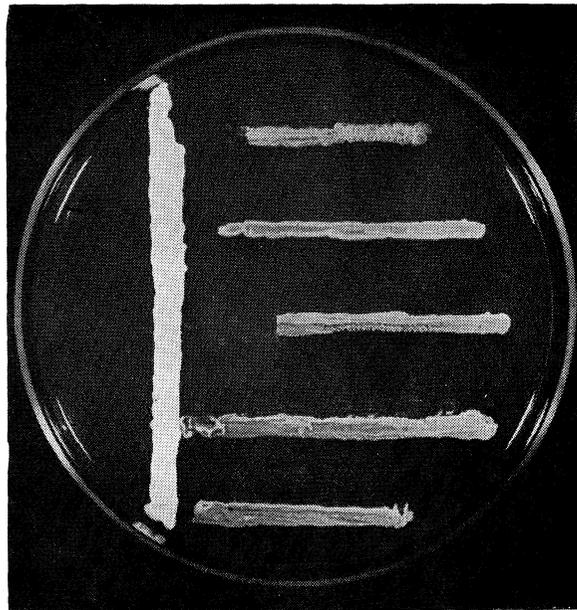


Figura 2. Placa sembrada por medio del "sello" en la que se observa la inhibición producida por un Streptomyces (sembrado en forma transversal) sobre varias especies de bacterias

2. Siembra del organismo que se desea ensayar como productor de antibiótico (p. ej., *Streptomyces*) en forma transversal, en un lado de la placa. Colóquese la placa en la estufa para incubar durante un tiempo apropiado con el fin de que se desarrolle el organismo (normalmente, con especies de *Streptomyces* se requieren de dos a cuatro días, según la especie). El desarrollo de la colonia no ha de ser excesivo, considerándose ideal un grosor de 5-10 mm. Durante este tiempo, y en los días sucesivos, el microorganismo producirá sustancias (antibióticas o no) que se difundirán por la placa a través del medio de cultivo.

3. Siembra de las placas anteriores por el método del "sello", según se ha descrito en el apartado anterior.

4. Incubación de las placas a una temperatura apropiada, debiéndose observar la posible inhibición de los organismos sembrados en segundo lugar (figura 2).

DISCUSION

El método descrito de investigación de organismos productores de antibióticos ofrece una serie de ventajas sobre los métodos normalmente utilizados de siembra individual por medio del asa, que se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Mayor rapidez en el trabajo, evitando considerable número de manipulaciones, con el consiguiente ahorro de tiempo.

2. Reduce la posibilidad de contaminaciones como consecuencia de la mencionada rapidez.

3. Se regula el método de ensayo, facilitando la interpretación de resultados.

RESUMEN

Se describe una técnica de investigación de nuevos microorganismos productores de antibióticos, que facilita enormemente estos trabajos, reduciéndose considerablemente el tiempo de manipulación y la predisposición a contaminaciones, así como facilitando la interpretación de resultados.

SUMMARY

A new method to investigate the isolation of new antibiotic producing microorganisms was described. This technique helps this kind of research, reducing notably the time of manipulation as well as predisposition to contaminations and also facilitate interpretation of results.