VOLUMEN 6 JULIO-SEPTIEMBRE 1953 NUM. 3

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL JARDIN BOTANICO DE MADRID.—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

CONSEJO·SVPERIOR·DE·INVESTIGACIONES·CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA
ESPAÑOLA

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Obtención y estudio de las formas filtrables de Proteus vulgaris, por **Miguel Rubio Huertos** y **Rodrigo Moreno San Martín** 195

Algunos datos sobre Streptomyces productores de antibióticos, por **A. Sánchez-Marroquín** 205

Introducción de una modificación al método de Wickerham para determinación cuantitativa de la fermentación de la rafinosa por las levaduras, por **Carlos Ramírez**..... 227

Una nueva especie de Sporotrichum: el Sporotrichum sanguineum, por **Carlos Ramírez**... 231

Contribución a la tinción de ascosporas y clamidosporas de levaduras, por **Carlos Ramírez** 239

Estudio sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos, por **Carlos Ramírez** 249

Estudio de una nueva estirpe de Brassica virus L y sus inclusiones intracelulares, por **Miguel Rubio Huertos.** 255

INFORMACION

Actas de la Sociedad 261

BIBLIOGRAFIA

Indice de artículos de Revistas 263

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

TODA LA CORRESPONDENCIA DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 152 - MADRID - (ESPAÑA)

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

VOLUMEN 6 JULIO-SEPTIEMBRE 1953 NUM. 3

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

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

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

GRAFICAS TEJARIO, S. A. Plaza del Biombo, 4. Teléfono 22 12 88. MADRID

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

OBTENCION Y ESTUDIO DE LAS FORMAS FILTRABLES DE PROTEUS VULGARIS (*)

por

Miguel Rubio Huertos y Rodrigo Moreno San Martín

Primeramente intentaremos aclarar algunos conceptos fundamentales que constituyen la base de este trabajo.

PLEOMORFISMO BACTERIANO

En el estudio de los productos bacterianos se observan diferencias de forma que no pueden considerarse como tipos nuevos o variantes, y que han sido señalados desde antiguo. Así fueron observadas por Almquist (1911); Lohnis y Smith (1916); Hort (1917) y Mellon (1919), que resumía Henrici diciendo «que las bacterias en un cultivo puro muestran amplias variaciones en el tamaño, forma y estructura de sus células, pero la naturaleza y el significado de estas variaciones no son conocidas». Los trabajos fueron continuados por Kuhn y Sternberg en 1931 con cultivos que contenían cloruro de litio, encontrando formas monstruosas y gránulos pequeños, sin dar entonces una explicación apropiada.

Es decir, estas formas de involución pueden producirse por causas internas biológicas o por malas condiciones externas. Se produce, efectivamente, un pleomorfismo en las bacterias degeneradas existentes en medios viejos o sometidos a desinfectantes, etc., y otra que se presenta en cultivos jóvenes, de significación diferente, pues algunas bacterias pasan frecuentemente por un cambio de fases.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 8 de mayo de 1952.

FORMAS L

Estudiando Klieneberger en 1935 cultivos de Streptobacillus moniliformis constató la existencia de pequeñas colonias junto a las normales, y aisló un organismo semejante a los de la pleuroneumonía bovina, que difiere en muchos aspectos de las bacterias, creyendo entonces esta autora que constituían una simbiosis de organismos asociados con Streptobacillus. Dienes vió más tarde (1939) el desarrollo de colonias semejantes (designadas L_1 por Klienerberger en el Streptobacillus) en el Flavobacterium y Bacteroides, manteniendo éste y otros investigadores que eran una fase del bacilo, lo que después ha sido también aceptado por Klieneberger, que cree, no obstante, que las bacterias típicas y la forma L difieren fundamentalmente. Estas diferencias se establecen por el diferente grosor de la membrana celular, casi inexistente en las formas L, lo que hace a estas células plásticas y capaces de adoptar cualquier forma, por las estructuras cromatínicas, que no adoptan la disposición de cromosomas, sino que se presentan como grupos gruesos, partículas, micelios o redes y, por último, que los cuerpos L se reproducen por segmentación y eventualmente se rompen en pequeños gránulos, mientras que las bacterias lo hacen por fisión binaria.

La forma L revierte con gran facilidad a la forma bacilar, pero se pueden producir razas L y conservarlas de esta manera durante tiempo indefinido. La forma L es, pues, una entidad en sí y reproduce la propia especie por producción de pequeños gránulos que parecen unirse, reproduciendo la forma L. De esta manera el ciclo L puede considerarse como un proceso de regeneración equivalente a un proceso sexual de los organismos superiores, según cree Klineberger recientemente.

Algunas bacterias Gram negativas producen la forma L en condiciones ordinarias; otras lo hacen cuando están sometidas a condiciones adversas.

Refiriéndonos a la producción de formas L por el Proteus vulgaris, tenemos que éstas se producen fácilmente cuando hacemos descender la temperatura ambiente, por ejemplo, a 4° C. En la fase L del Proteus se producen en los bordes de las colonias (lo que se puede apreciar por diferentes métodos) gránulos a partir de cadenas bacilares, que luego se fusionan, se quedan libres o en conexión con los bacilos. Las cadenas bacilares también producen formas curvas y lazos con grá-

nulos incluídos. Otras veces, sometido más prolongadamente al frío, forman cuerpos enormes (large bodies), de donde les viene el nombre, que se segmentan en otros más pequeños.

Si sometemos al Proteus a 0,5° C. durante tres días y se incuban luego durante varias horas a 36° C., entonces los filamentos bacterianos dejan gránulos libres con una débil envoltura citoplasmática, no siempre demostrable, que son unidades celulares primarias que forman luego agrupaciones cromatínicas parecidas a micelios o mallas.

También se pueden producir estas formas transfiriendo los cultivos de Proteus a agua corriente o líquido ascítico, y principalmente con penicilina. Poniendo 10 unidades de penicilina por centímetro cúbico se inhibe el crecimiento de los bacilos, los cuales entonces se hinchan en grandes cuerpos, que permanecen vivos, pero no tienen un proceso reproductivo. Dienes llama a las colonias producidas por penicilina colonias 3B, y a las producidas por otros medios 3A. El bacilo normal reaparece fácil y regularmente en los cultivos L.

FORMAS FILTRABLES

En cultivos de bacterias se presentan formas capaces de atravesar filtros que retienen las formas normales y que resultan viables, es decir, que los cultivos que se obtienen con estas formas filtrables crecen en los medios apropiados o producen reacciones positivas en animales inyectados con ellos.

Empleando la técnica de filtración en la fase L del Streptobacillus monoliformis, realizada principalmente para saber el tamaño de los gránulos, se efectúa ésta precediéndola de centrifugaciones y al filtrar el producto centrifugado a través de membranas de gradocol, se vió que los gránulos que pasaron a través de membranas de 900 a 400 milimicras resultaron viables, pero no pasaron por las de 350, es decir, que los pequeños gránulos reproductores de la forma L tienen el tamaño aproximado de las partículas del virus de la Psittacosis y de las mínimas unidades reproductoras de la pleuroneumonía bovina.

Formas filtrables han sido señaladas también en Spirochetas, bacilos ácido-resistentes, bacilos tifoideos, etc.

En trabajos realizados por Hadley sobre Shigella, sembrando

filtrados sobre placas lactosa-agar-tornasolado y empleando las placas en las cuales no se apreciaban colonias en las primeras cuarenta y ocho horas al ser éstas observadas microscópicamente, lavaba las placas y el líquido lo transfería luego a nuevas placas durante varias veces, se producían así colonias sólo visibles al microscopio, designadas como colonias G. Estas colonias estaban formadas por gránulos de varios tamaños, formas cocoides, glóbulos y varillas hinchadas y deformadas. Transferidos estos cultivos, frecuentemente revierten en la forma celular. Estas colonias G parecen, pues, un estado intermedio entre la colonia bacilar y la colonia L. El cultivo G es una fase evolutiva hacia la forma reproductivamente madura.

COMPARACION ENTRE LAS FORMAS L Y FORMAS FILTRABLES

Vemos, pues, que existen grandes semejanzas entre la forma L y la forma filtrable. En primer lugar, los estímulos que llevan a las bacterias a disociarse son los mismos que los que producen las formas L.

Estas técnicas de disociación (añadir al cultivo productos metabólicos, cambios de temperatura, variaciones del estado físico del medio, variación del pH, sales, etc.) producen también la forma L, y el estado granular filtrable de Hartley es idéntico a los pequeños gránulos de la forma L. Además, la colonia G, como ya se ha dicho, está en íntima relación con la colonia L.

Basados en estos hechos, nosotros hemos podido aislar y cultivar formas filtrables del Proteus vulgaris y seguir su transformación a bacilos normales, encontrando una fase intermedia que por sus características se puede identificar con las formas L.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos.

Hemos empleado una estirpe del Proteus vulgaris obtenida en la Facultad de Farmacia de Madrid, Cátedra de Microbiología, y que presenta las características del Proteus vulgaris tipo, descritas en el «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», 6.ª ed., 1948.

Para provocar la aparición de formas filtrables abundantes, dejamos los cultivos en caldo común, después de veinticuatro-cuarenta y ocho horas a la estufa a 37°, durante un tiempo variable de ocho-doce días a temperatura ambiente.

Al cabo de este período de tiempo filtramos los cultivos por filtros Seizs de amianto, sin presión de vacío (40 c. c. tardan en filtrar unas siete-diez horas).

Hacemos siembras en caldo común, agar caldo inclinado y agar caldo en placa de Petri, para comprobar si ha pasado por el filtro algún elemento normal o existe alguna contaminación en el filtrado; se ponen en la estufa y se ve a las veinticuatro-cuarenta y ocho-setenta y dos horas si aparece alguna colonia, desechando en este caso los filtrados.

Una vez comprobado que el filtrado se halla libre de formas normales de P r o t e u s o contaminaciones, lo llevamos a la estufa a 37°, donde lo tenemos en incubación durante un período de quince-veinte días, a veces solamente ocho días; después se deja a temperatura ambiente.

De los filtrados ya incubados hicimos siembras en tubos y placas Petri de caldo agar, caldo agar lactosado tornasol y agua agar lactosado tornasol (según el método de Hauduroy).

Las siembras de estos medios las hacemos en los mismos medios, caldo común y agar caldo común.

Tinciones.

Hemos empleado tinciones simples con fuchsina, safranina, azul de metileno, Gram, Giemsa y el método de Wirtz para esporas.

Además de las observaciones con el microscopio corriente, hemos tenido ocasión de hacer alguna con microscopio de fases, prestado por el Prof. Socías, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, al que nos complace darle aquí las gracias.

RESULTADOS

Los filtrados, qeu hemos comprobado que no contienen formas normales ni contaminaciones, aparecen completamente transparentes, y no es hasta pasado el período de incubación a 37° que se observa en ellos un ligerísimo depósito, sólo visible al agitar bien el tubo.

De las siembras hechas con el filtrado en tubos inclinados con los medios indicados anteriormente, observamos al cabo de dos-tres días en estufa a 37º la aparición de pequeñísimas colonias, difíciles de ver a simple vista, y sólo distinguibles al hacer incidir lateralmente la luz sobre la superficie del medio, de forma redonda, lisas, y transparentes.

En las placas de Petri extendidas con los mismos medios no hemos podido observar crecimiento alguno ni al cabo de cinco meses de permanencia en la estufa a 37º.

De las colonias obtenidas en los tubos sembrados con el filtrado hacemos resiembras en los mismos medios y en tubos, encontrando que después de veinticuatro-cuarenta y ocho horas a 37º aparecen en algunos de los tubos colonias iguales a las anteriores, y en otros, colonias un poco mayores que confluyen, y al cabo de algún tiempo, veinticuatro-cuarenta y ocho horas más, adquieren la apariencia de las colonias del Proteus normal. Haciendo una tercera serie, tercera resiembra, vemos que aumenta el número de tubos donde aparecen las colonias normales.

Morfología de los elementos encontrados en los filtrados y colonias.

Hacemos tinciones de filtrados recientemente obtenidos y en ellas no se puede apreciar elemento alguno; seguimos haciendo preparaciones de los filtrados a intervalos de tiempo y vemos que en filtrados que presentan depósito tenue después de la incubación, y sobre todo en aquellos que después del período de incubación a 37º los hemos tenido bastante tiempo a temperatura ambiente (un mes o más), aparecen formas cocoides extremadamente pequeñas, gránulos, que, a veces, se reúnen formando ligerísimos filamentos.

En los filtrados no aparecen formas normales ni al cabo de cinco meses.

Formas encontradas en las colonias: En las colonias que aparecen en la primera siembra en tubo, encontramos toda una serie de formas que varían en porcentaje, según sea la edad de la colonia; así, junto a bacilos cortos y otros largos, todos ellos llenos de granulaciones, encontramos formas globosas que, a veces, tienen forma de anillo y son generalmente grandes, del diámetro de la longitud de un bacilo normal y de aspecto estromatoso o vacuolado; en los cultivos jóvenes predomina esta forma sobre las demás y en los viejos aparecen ya mayor

número de formas bacilares. Hemos podido observar en el microscopio de fases algunas de estas formas globoides y en anillos, y responden bien a la imagen que describimos en las preparaciones fijadas y teñidas por los métodos corrientes; sólo en las formas en anillo que fijas y teñidas con azul de metileno son anillos perfectos, encontramos que en realidad tienen forma de disco, con el centro deprimido por ambas caras.

Hemos podido ver también formas que parecen intermedias entre las bacilares y globosas, como son las de forma de herradura y cayado, y otras en las que se observa una prolongación en forma bacilar, saliendo de una forma globosa muy parecida a la formación de esporas terminales.

Fig. 1

Como decimos antes, algunos de los cultivos en las 2.ª, 3.ª y sucesivas resiembras empiezan con el tipo de colonia de formas filtrables, que rápidamente pasan a convertirse en colonias normales, y examinando éstas encontramos en ellas bacilos de morfología normal y ninguna de las formas anormales antes descritas.

DISCUSION

Primero hemos de hacer un resumen de los hechos hallados experimentalmente para ver, con ayuda de comparaciones con las formas L, si podemos encontrar alguna significación a las formas anormales observadas. Los hechos son:

1.º De un filtrado sin elementos normales resembrado en medios apropiados, la aparición de colonias diferentes de las normales, con características muy parecidas a las aisladas de forma L, y que, como ellas, pueden ser resembradas sin variación, o bien pueden dar lugar a colonias corrientes.

2.º La aparición en el filtrado, tras un período de incubación, de formas granulares, y, a veces, formando tenues filamentos.

3.º La aparición en las colonias pequeñas, obtenidas sembrando el filtrado, de elementos anormales diversos, que van desde formas en anillo a formas globulares, en herradura y de aspecto de espora terminal.

4.º El paso de estas colonias y formas anormales a formas normales, o bien a nuevas formas filtrables.

Como vemos por los resultados que hemos obtenido, las formas L y las filtrables tienen algunos puntos en común. 1.º El producirse por las mismas causas (frío, vejez, etc.); 2.º la formación de colonias de aspecto y propiedades parecidas; 3.º aparición de formas muy pequeñas cocoides, que dice Dienes se producen dentro de los «L. bodies», o por su fragmentación y con las formas G, obtenido en Shigella por Hudley filtrando, y las formas globoides, grandes, semejantes a los «L. bodies».

Al comprobar una casi identidad con las formas L y con los resultados obtenidos por Hadley sobre Shigella (formas G), se podría aplicar a nuestros resultados las consideraciones teóricas expuestas en la introducción para aquellas formas.

Nosotros preferimos atenernos simplemente a los hechos expuestos, aunque sí creemos firmemente que las formas filtrables no son más que una fase de la bacteria y que posiblemente estas formas filtrables se unan en un proceso sexual para formar los cuerpos globoides de los que puedan salir bacilos o bien de nuevo pequeñas formas granulares.

De todas las maneras creemos que las experiencias con una sola especie bacteriana, o bien dos, si contamos con los experimentos de Hartley, son pocos para generalizar, y esperamos en un futuro trabajo con otras especies de bacterias conseguir un poco más de claridad en un terreno tan interesante y lleno de posibilidades.

RESUMEN

Se exponen las condiciones y método empleado para obtener formas filtrables de Proteus vulgaris; su cultivo formando microcolonias y un estudio del pleomorfismo de los elementos filtrables en distintos períodos de incubación y resiembra en diferentes medios. Se hace resaltar la aparición de formas en anillo que parecen ser unas de las

de paso intermedio entre la forma filtrable granular y la bacilar normal, y que se pueden identificar con las formas L o «Large bodies» de Kliener-berger.

BIBLIOGRAFIA

BERGEY'S.—1948. Manual of determinative Bacteriology, 6.ª ed., Baltimore.

DIENES (L.).—1952. The significance of the large bodies and the development of L type of colonies in bacterial cultives. **J. Bact.** 44: 37-74.

——— 1946. Complex reproductive processes in bacteria. **Cold. Spring Harbor Sympos Quant. Biol.** 11: 51-59.

——— y **WIENBERGER (H. S.).**—1951. The L forms of bacteria. **Bact. Rev.** 15: 245.

HAUDUROY (P.).—1929. Les ultravirus et les formes filtrantes des Microbes. Paris. Masson.

KLIENERBERGER (N. E.).—1949. Origin, development and significance of L form in bacterial cultures. **Jour. S. Gen. Microbiol.** 3: 334.

——— 1951. Filtrable forms of bacteria. **Bact. Rev.** 15: 77.

STEMPEN (H.) y **HUTCHINSON (W. G.).**—1951. The formation and development of large bodies in Proteus vulgaris OX-19. 1. Bright phase contrast of living bacteria. **J. Bact.** 61: 321.

———y **HUTCHINSON (W. G.).**—1951. Comparative citology of bacilli and large bodies. **J. Bact.** 61: 337.

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL
ESC. NAL. DE C. BIOLOGICAS (I. N. P.). MEXICO, D. F.

ALGUNOS DATOS SOBRE STREPTOMYCES PRODUCTORES DE ANTIBIOTICOS (*)

por

A. Sánchez-Marroquín.

Desde 1947 iniciamos el estudio de diversos microorganismos del suelo como posible fuente de agentes antibióticos, y habiéndonos ocupado ya del género Bacillus (5), presentamos ahora un breve resumen de los estudios realizados hasta la fecha respecto a representantes diversos del género Streptomyces (4).

Es nuestro propósito referirnos exclusivamente a los procedimientos que actualmente seguimos para la selección de antagonistas y las principales observaciones derivadas del estudio de un número ya considerable de cepas, sin pretender describir en forma completa y definitiva la naturaleza de los agentes obtenidos ni los métodos seguidos para su aislamiento.

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Para el aislamiento de Streptomyces se estudiaron diversas muestras de suelos procedentes de diferentes sitios del Distrito Federal y de los Estados de Sinaloa, Veracruz, México, San Luis, Potosí, Chiapas, Morelos, Oaxaca y Tamaulipas, así como varias muestras procedentes de Recife, del Estado de Pernambuco, Brasil.

El procedimiento general seguido para su estudio, expuesto en forma abreviada, fué el siguiente:

A) La muestra, diluída convenientemente, se sembró en placas de

---

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 10 de noviembre de 1952.

TABLA I

INCIDENCIA DE 365 CEPAS DE ACTINOMICETOS ANTAGONISTAS CONTRA SEIS ESPECIES BACTERIANAS

Mm. de inhibición.	*K. pneumoniae.*		*B. subtilis.*		*Staph. aureus.*		*S. lutea.*		*E. coli.*		*B. C. G.*	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Menos de 10... ...	65	17,8	145	39,7	39	10,6	128	35,0	94	25,7	8	2,0
10 a 30	42	11,5	89	24,3	225	61,6	99	27,1	42	11,5	2	0,5
Más de 30	0	0	12	3,2	101	27,6	9	2,4	12	3,2	0	0
Total	107	29.2	246	67,3	365	100	236	64,6	148	40,5	10	27,3

los medios adecuados y se aislaron por los métodos más usuales las colonias con desarrollo típico de Streptomyces, que luego se pasaron a tubos con el medio de conservación. El total de cepas aisladas fué de 3.284.

B) Todas estas cepas se probaron por medio de la estría en placas de agar respecto a su actividad antagónica contra las siguientes bacterias, para una primera selección: Staph. aureus, S. lutea, B. subtilis, E. coli, K. pneumoniae, P. vulgaris y B. C. G. (esta última en el medio de Dubos-Davis). Posteriormente se seleccionaron las cepas que resultaron más activas, por lo menos contra dos de los gérmenes probados, incluyendo a algún Gram negativo, y obtuvimos así 365 cepas activas (tabla I), o sea, el 11,1 por 100, que se sometieron a una segunda selección.

C) Esta segunda selección consistió en probar las 365 cepas contra tres estirpes de Escherichia coli: E. coli, cepa Crookes No. 8,739, E. coli estreptomicin-sensible y E. coli estreptomicin-resistente, con el objeto de separar, en primer lugar, las que actuaran más intensamente contra esta especie, y, en segundo, descartar las que no actuaran sobre las cepas etreptomicin-resistentes. De esta manera se obtuvieron 178, de las cuales se seleccionaron 23 por haber presentado una inhibición por lo menos de 100 mm. contra dicha bacteria estreptomicin-resistente, es decir, seleccionamos las más activas desde este punto de vista.

D) Con estas 23 cepas se obtuvieron cinco subcepas de cada una por selección al azar entre las colonias desarrolladas en placas de Czapeck al sembrar la cepa original en estría de aislamiento, con el objeto de investigar si diferían en actividad respecto a sus propiedades antagonistas y seleccionar las más activas.

E) Las mismas 23 cepas (tomando solamente la subcepa más activa) se estudiaron luego en diferentes medios líquidos y se las determinó su espectro antimicrobiano sobre los 72 microorganismos que más adelante se indican, para constituir esto una tercera y rigurosa selección. Mediante este procedimiento se obtuvieron 16 cepas muy interesantes por su amplio espectro, por su actividad y por difundir fácilmente su principio activo en los medios líquidos en las condiciones estudiadas.

F) Por último, se sometieron estas 16 cepas a un estudio grosero de su toxicidad (4.ª selección), inoculando intraperitonealmente ratones de

TABLA II

ESPECTRO ANTIBACTERIANO CUANTITATIVO DE LOS CINCO ANTIBIÓTICOS SEMIPURIFICADOS. (CANT. MÍNIMA EN MICROGR. POR ML. QUE INHIBE A LAS BACTERIAS DE PRUEBA.)

Antibiótico.	*S. aureus.*	*E. coli.*	*B. subtilis.*	*S. typhosa.*	*Sh. paradysenteriae.*	*S. schottmüllerii.*	*Ps. aerugisa.*
X-1	6,0	1,5	0,4	8,0	11,0	5,0	6,0
97-x	13,0	2,0	1,5	6,0	9,0	5,0	3,0
M-5	5,0	15,0	2,0	0	6,0	9,0	3,0
88-a-4...	3-10	5,0	3,0	20,0	0	6,0	8,0
S-3	10-12	—	0,5	50,0	—	30,0	20

— : no inhibición con dos miligramos de substancia.

20 g. con 2 ml. del cultivo líquido debidamente esterilizado a través de filtro Seitz de jeringa. Las cepas que desarrollaron algún signo de intolerancia en los ratones (escalofrío, pirexia, anorexia, etc.) se descartaron por el momento, resultando así solamente cinco cepas cuyo principio activo no era aparentemente tóxico según este criterio.

G) Una vez seleccionadas estas cinco cepas, se pasó al estudio de la producción del antibiótico en siete medios líquidos diferentes y de la esporulación de las cepas en cuatro medios sólidos. Asimismo se estudiaron las características morfológicas, bioquímicas y de cultivo, así como, nuevamente, el espectro antimicrobiano.

H) En cuanto se hubo estudiado el medio de elección, se procedió al ensayo de métodos de aislamiento, concentración y purificación del principio antibiótico, y luego se investigaron algunas de las propiedades químicas y físicas de las substancias obtenidas, así como, una vez más, su espectro antimicrobiano en forma cuantitativa, comparándolo con el de otros antibióticos de características semejantes. (Tablas II y III.)

I) Finalmente, los cinco antibióticos, más o menos purificados, se probaron desde el punto de vista de su toxicidad a los ratones y de su actividad *in vivo*, contra el neumococo tipo III.

Los 72 diversos microorganismos sobre los cuales se probaron las 23 cepas seleccionadas son los que se anotan a continuación:

1. *Stap. aureus*, cepa Heatley ATCC 9.144 (*Microc. pyogenes* var. *aureus*).
2. *S. lutea* ATCC 9.341.
3. *B. subtilis* ATCC 6.633.
4. *K. pneumoniae* ATCC 9.997.
5. *M. tuberculosis* var. *hominis* ATCC 9.360 H37-RV.
6. *M. tuberculosis* var. *hominis* H37-RVR estreptomicin-resistente. Rutgers Univ. S. A. Waksman.
7. *M. tuberculosis* var. *hominis* estreptomicin-sensible. Rugers Univ. S. A. Waksman.
8. *M. phlei* ATCC 10.142.
9. *M. smegmatis* ATCC 10.143.
10. B. C. G. Inst. Salub. y Enf. Trop. (México).
11. *E. coli* ATCC 9.637.
12. *E. coli* R. Rutgers Univ. S. A. Waksman.
13. *E. coli* S. Rutgers Univ. S. A. Waksman.

TABLA III

PROPIEDADES PRINCIPALES DE LOS CINCO ANTIBIÓTICOS SEMIPURIFICADOS

Antibiótico.	Color.	Solubilidad.	Actividad. A ph 1.0 y pH 10.0.	Actividad a 115° C.	Insoluble en:	Obtención y purificación.	Comparación con otros antibióticos (caract. y espectro.	Naturaleza
X-1	Amarillento.	Agua, etanol.	No los resiste.	Estable.	Eter, cloroformo, acetona.	Acido pícrico.	Semejante a la estreptomicina.	Básica.
97-x-1...	Incoloro.	Agua, metanol caliente, HCl diluído.	No los resiste.	Estable.	Eter, cloroformo, acetona.	Acido pícrico; anaranjado de metilo.	Semejante al grupo de la estreptotricina.	Básica.
M-5	Incoloro.	Agua, metanol y HCl diluído.	Resiste pH 1,0. Se inactiva a pH 10,0.	Estable.	Eter, cloroformo y éter de petróleo.	Acetato de amilo; Picrato; Cromatografía.	Grupo de la estreptotricina.	Básica.
88-a-4...	Blanquecino.	Agua (ligte), cloroformo, acetona, éter (ligte), benceno.	No los resiste.	Se inactiva.	HCl dil.; éter de petróleo. Soluciones alc. dil.	Acetato de amilo; Eter.	Proactinomicina.	Básica.
S-3	Amarillo - grasoso a rojizo.	Eter, acetona, benceno metanol, cloroformo.	Resiste ambos.	Estable.	Agua (ligte) y éter de petróleo.	Acetato de amilo; Cromatografía.	Actinomicina.	Base débil.

14. Proteus vulgaris ATCC 9.484, cepa X-19.
15. Br. melitensis ATCC 8.360, cepa Huddleson 2.461.
16. Br. abortus ATCC 4.315, cepa Huddleson (humana).
17. Br. suis ATCC 4.312, cepa Huddleson 2.012 (porcina).
18. S. typhosa. Inst. Salub. y Enf. Trop. (México). J. Olarte.
19. S. paratyphi A. Inst. Salub. y Enf. Trop. (México). G. Varela.
20. S. schottmuellerii. Inst. Salub. y Enf. Trop. (México). G. Varela.
21. Sh. paradysenteriae. Inst. Salub. y Enf. Trop. (México). J. Olarte.
22. Past. avicida (Past. multocida ATCC 10.544).
23. Past. suiseptica (Past. multocida ATCC 7.773).
24. Past. boviseptica (Past. multocida ATCC 6.587.)
25. Coryneb. diphteriae ATCC 9456, cepa Coffey.
26. Coryneb. equi ATCC 10.146, cepa Mauer.
27. Coryneb. pyogenes ATCC 10.138, cepa Mauer, equina.
28. Hem. pertussis ATCC 9.340, cepa Kendrick 17.921.
29. Cl. tetani ATCC 9.155.
30. Cl. chauvei ATCC 10.092.
31. Cl. welchii ATCC 10.250.
32. Cl. novyi ATCC 9.076.
33. Cl. hemolyticum ATCC 9.652.
34. Cl. histolyticum ATCC 8.034.
35. Erw. phytophtora (Cornell University). E. C. Burkholder.
36. Erw. carotovora (Cornell University). E. C. Burkholder.
37. Erw. aroideae (Cornell University). E. C. Burkholder.
38. Erw. amylovora (Cornell University). E. C. Burkholder.
39. Erwinia E. C. I. (Cornell University). E. C. Burkholder.
40. Erwinia E. N. I. (Cornell University). E. C. Burkholder.
41. Erwinia sp. R. 24. E. N. C. B. (México). A. Sánchez-Marroquín.
42. Erwinia sp. R-S-4. E. N. C. B. (México). A. Sánchez-Marroquín.
43. Alternaria solani, ATCC 6.662.
44. Fusarium avenaceum ATCC 8.150, cepa Robbins.
45. Fusarium sp. F-1 S. Agr. y Gan. (México), Ma. A. Melèndez.
46. Fusarium sp. F-11 S. Agr. y Gan. (México), Ma. A. Meléndez.
47. Diplodia zeae ATCC 10.235.

48. Diplodia sp. M-1 Secr. Agr. y Gan. (México), Ma. A. Meléndez.

49. Diplodia sp. M-43 Secr. Agr. y Gan. (México), Ma. A. Meléndez.

50. Helmintosporium gramineum ATCC 10.381.

51. Claviceps purpurea ATCC 9.605.

52. Blastomyces dermatitidis. Duke Univ. N. F. Conant.

53. Candida albicans. Duke Univ. N. F. Conant.

54. Cryptococcus neoformans. Duke Univ. N. F. Conant.

55. Hystoplasma capsulatum. Duke Univ. N. F. Conant.

56. Coccidioides immitis. Duke Univ. N. F. Conant.

57. Trichophyton tonsurans. Duke Univ. N. F. Conant.

58. Trichophyton mentagrophytes. Duke Univ. N. F. Conant.

59. Trichophyton shoenleinii. Duke Univ. N. F. Conant.

60. Trichophyton rubrum. Duke Univ. N. F. Conant.

61. Epidermophyton floccosum. Duke Univ. N. F. Conant.

62. Microsporum audouini. Duke Univ. N. F. Conant.

63. Microsporum canis. Duke Univ. N. F. Conant.

64. Sporotrichum shoenckii. E. N. C. B. (México). A. Sánchez-Marroquín.

65. Nocardia asteroides. 18 Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

66. Nocardia asteroides 653. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

67. Nocardia pelletieri 293. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

68. Nocardia pelletieri 1.185. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

69. Nocardia madurae 412. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

70. Nocardia madurae 420. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

71. Nocardia mexicana 452. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

72. Nocardia mexicana 407. Inst. S. y Enf. Trop. (México). A. González Ochoa.

Métodos y medios.—Los métodos para llevar a cabo el estudio de la actividad en estas pruebas de selección fueron los siguientes (3):

1.º Método de la estría cruzada o anaxograma de Garré.

2.º Método de las diluciones en tubo, empleando el filtrado estéril de cultivos de los Actinomicetos en medios de Waksman (8, 9) o Bottcher-Conn (1).

3.º Método de los discos de papel, realizado con los mismos filtrados estériles.

Para practicar dichos métodos es necesario que en el medio en que se desarrollen los Actinomicetos crezcan también las bacterias.

Para tal objeto se emplearon los siguientes medios, adicionados o no de agar, según el caso: a) para Brucella, Salmonella, Proteus y Shigella, el medio con extracto de levaduras y triptosa; b) para todas las especies de Mycobacterium, incluyendo el B. C. G., el medio de Dubos-Davis modificado; c) para las diversas cepas de E. coli, K. pneumoniae, B. subtilis, S. lutea y las diferentes especies de Erwinia se utilizó gelosa simple; d) para las especies de Pasteurella y Corynebacterium, el de agar-triptosa; para Hemophilus pertussis, el de Bordet-Gengou, modificado por Kendrick; f) para los diversos hongos de importancia fitopatológica o médica se usaron los medios de Sabouraud y Czapeck, y, por último, g) para los anaerobios, el medio de Brewer con tioglicolato.

Características generales de las cinco cepas estudiadas.

Nos referiremos a los caracteres morfológicos, datos bioquímicos, otras características y extracción del principio antibiótico de cada una de esas cepas. En el curso de la extracción, las diferentes fracciones se probaron contra Staph. aureus H, expresando la actividad en mm. de inhibición.

Streptomyces sp X-1.

a) **Características morfológicas.** Micelio vegetativo no tabicado al principio y con ramificaciones monopódicas y septas después de cuatro días de cultivo; micelio reproductivo blanco inicialmente y gris claro después de los cuatro días en los medios de Bottcher-Conn y Sabouraud glucosado, y amarillento en gelatina, papa, asparagina y Czapeck. Algunas

subcepas no produjeron pigmento alguno en los medios indicados. Las hifas esporógenas son simples o ramificadas, y llevan conidios más o menos ovales y en cadenas rectas y largas (fig. 1), derivando varias de un mismo punto.

b) **Características bioquímicas.** La cepa da negativas las pruebas IMViC. Fermenta la sacarosa. No fermenta glucosa, levulosa, xilosa, lactosa, maltosa, manitol, dulcitol y celulosa. Produce un pequeño halo de hidrólisis en agar-almidón. Alcaliniza la leche tornasolada. Reduce los nitratos. Licúa la gelatina, desarrollando colonias blanco-grisáceas con pigmento amarillento que se difunde en el medio. En gelosa-sangre forma colonias blancas con zonas de hemólisis.

c) **Otras características.** No actúa sobre cepas estreptomicino-resistentes. Fué la única entre estas cinco que produjo inhibición fuerte del crecimiento de M. tuberculosis var. hominis, M. phlei y M. smegmatis en el medio de Dubos-Davis, por el método de la estría y en medios líquidos.

Sobre otros gérmenes Gram + y Gram — dió halos regulares de antibiosis en los medios de Waksman y melazas y pequeños en los de Bottcher-Conn. Esporuló bien en papa, Bottcher y Czapeck, pero en algunas subcepas la esporulación abundante apareció solamente después de diez días de incubación a 28° C. La mayor actividad se obtuvo a los nueve días en el medio de Waksman, dando, sin agitación, un halo de 20 milímetros sobre B. subtilis, que correspondió a 0,16 g. de estreptomicina por litro de medio.

d) **Extracción.** Se procedió de manera semejante a la técnica de extracción de la estreptomicina, según Kuehl (3). Para la purificación se disolvió en agua destilada el concentrado activo y se trató con una solución de ácido pícrico al 4 por 100, calentando ligeramente. Se dejó en reposo durante varias horas a 5° C., apareciendo entonces en la parte inferior del tubo unos cristales de color amarillo, los cuales se separaron por decantación y se disolvieron en metanol caliente, que contenía un exceso de HCl 2.5 N. Esta solución se vertió en 10 volúmenes de éter, precipitando un polvo blanco cristalino muy higroscópico correspondiente al cloruro del antibiótico X-1, el cual se disolvió en metanol y precipitó con éter. Luego se secó al vacío y se pesó. El rendimiento fué de 45 por 100. La substancia presentó características de estreptomicina (tablas 2 y 3), inactivándose con cisteína y reactivándose con yodo.

Streptomyces sp. 97 x-1.

a) **Características morfológicas.** Micelio aéreo muy ramificado, blanco al principio y después color violeta, con hifas finas. Micelio sumergido con pigmento difusible de color mostaza o amarillo limón, en medios con papa o almidón. Hifas esporógenas rectas o flexuosas, formando a veces ganchos o espirales leves con conidios elipsoidales u ovales (fig. 2).

b) **Características bioquímicas.** Dió negativas las pruebas IMViC. Fermenta sacarosa y levulosa; alcaliniza la leche tornasolada; no licúa la gelatina o muy tardíamente; reduce los nitratos; en la gelatina desarrolla colonias grisáceas con pigmento café difusible en el medio. En los medios de Sabouraud, Bottcher-Conn, asparagina y papa, el pigmento es ligeramente amarillento. En el medio de Czapeck no produce pigmento alguno. Las colonias son blanquecinas, excepto en los medios de Bottcher-Conn y papa, en donde presenta coloración rosácea y aun violeta intensa. En gelosa-sangre forma colonias blancas con hemólisis. No fermenta glucosa, xilosa, lactosa, maltosa, manitol, dulcitol y celulosa. Hidroliza muy ligeramente el almidón.

c) **Otras características.** Actúa sobre cepas estreptomicino-resistentes. No actúa sobre los hongos fitopatógenos estudiados. Esporula bien en medio de papa desde los cuatro días y en el medio de Bottcher-Conn. La mayor actividad se logró en el medio de Waksman a los diez días, en cultivos estáticos, dando una inhibición de 28 mm. sobre S. aureus y de 22 mm. sobre B. subtilis, lo que correspondió a 0,16 grs. de estreptomicina por litro de medio. Posteriormente se logró mayor actividad.

d) **Extracción.** Se procedió de igual manera que para la cepa anterior. La purificación se logró en un principio por el método del heliantato, disolviendo previamente el precipitado acetónico en metanol caliente. La recristalización se efectuó por disolución del heliantato en metanol acuoso al 33 por 100 y estandarización a 10° C. Se centrifugó nuevamente y se lavó, secándose al vacío con acetona y éter. El heliantato se convirtió después al cloruro correspondiente, se secó y pesó, dando un rendimiento de 37 por 100. En otros ensayos se logró también la purificación mediante el método del ácido pícrico, para lo cual la primera porción adsorbida con Norita se eluyó con alcohol metílico adicionado de 1,4 por 100 de HCl concentrado. El líquido resultante se neutralizó con bicarbonato sódico, y, una vez filtrado, se evaporó al vacío a 25° C. Precipitóse luego con abundante acetona, recogiéndose el precipitado

en poca agua. Las pruebas de inhibición para S. aureus resultaron positivas.

En estas condiciones se probó la fracción respecto a su precipitación con el anaranjado de metilo y con el ácido pícrico, lográndose un buen precipitado en ambos casos. Sin embargo, el halo obtenido con el picrato fué de mayor diámetro que el del heliantato. Seguimos el método del pícrico, consiguiendo finalmente precipitar cloruros, que mostraron actividad aun después de conservar en el refrigerador durante varios días. Después de una purificación más completa, la substancia presentó características de estreptotricina por su actividad contra hongos, espectro cuantitativo contra algunas bacterias (tabla 2) y su escasa actividad sobre B. mycoides (1.030 unidades de dilución por mg. de substancia activa) y S. marcescens (950 unidades). Además se obtuvo buena actividad contra las cepas estreptomicino-resistentes y la substancia prácticamente no se inhibió con cisteína.

Streptomyces sp. M-5.

a) **Características morfológicas.** Micelio aéreo muy ramificado, blanco, de hifas finas. Micelio sumergido con pigmento color uva, en medio de papa. Conidióforos como cadenas largas, flexuosas, no espiraladas, con esporas ovaladas o elipsoidales bien definidas (fig. 3).

b) **Propiedades bioquímicas.** Las características IMViC resultaron negativas. Fermenta sacarosa; alcaliniza la leche tornasolada; licúa la gelatina; no reduce los nitratos; no produce pigmentos en gelatina, papa, asparagina, Bottcher-Conn, Sabouraud y Czapeck. En gelosa-sangre desarrolla colonias blancas con hemólisis. No fermenta glucosa, levulosa, xilosa, lactosa, maltosa, manitol, dulcitol, almidón y celulosa. En los medios de papa presenta esporulación, y en Sabouraud las colonias son, al principio, blancas y después, generalmente, grises o pardas. Algunas veces produjo pigmento color uva o violáceo, y aun café, en el medio de papa para esporulación y en Bottcher-Conn.

c) **Otras características.** Actúa sobre cepas estreptomicino-resistentes. Da buenos rendimientos de substancia antibiótica en los medios con melazas, peptona y glucosa, así como en Waksman y Bottcher-Conn. La mayor actividad se logra a los seis-siete días en cultivos estáticos. Los filtrados de medios líquidos conservan su acción después de someterse a 120° a presión durante dos horas y a pH 1 después del mismo período de tiem-

po. Se inactivan a pH de 10, después de dos horas. La agitación brusca no produjo aumento apreciable en el rendimiento. La cepa esporula bien en los medios de papa y Bottcher-Conn a los cuatro días.

d) **Extracción.** El medio de cultivo se filtró por succión, usándose «Super-cell», y en seguida se acidificó con ácido fosfórico al 20 por 100, hasta un pH de 1.8 (timol azul). El líquido ácido fué agotado por extracción con acetato de amilo que quedó coloreado, y luego se trató con un pequeño volumen de agua que se alcalinizó gradualmente con agua de barita hasta pH 7.6, siempre en agitación. La solución acuosa salina no presentó actividad.

El líquido de cultivo original, ácido y agotado, se trató con bicarbonato sódico en polvo hasta pH de 7.2, y luego con NaOH al 20 por 100 hasta un pH de 8.2 a la fenolftaleína. El líquido alcalino se extrajo con acetato de amilo, presentándose este último bastante coloreado.

En seguida se trató con un pequeño volumen de agua y con ácido fosfórico al 10 por 100 hasta un pH de 2.0. Esta solución fué neutralizada con bicarbonato sódico hasta un pH de 6.8, observándose la formación de un precipitado pardo oscuro que aumentó al conservarlo en el refrigerador. El líquido centrifugado presentó bastante actividad, al igual que el polvo lavado. Tanto la solución límpida como la suspensión del precipitado presentaron coloración café con tinte violeta. En las pruebas de inhibición en placas con discos de papel se observó, además de que en los sitios donde se concentraba el tinte oscuro la zona de inhibición era más grande, también la difusión de un color violeta.

El líquido activo, límpido, de carácter acuoso, fué agitado nuevamente con acetato de amilo, al pH de la prueba microbiológica, obteniéndose una capa oscura en el solvente. Se añadieron entonces dos gotas de ácido fosfórico al 10 por 100 y se volvió a agitar. La fase acuosa fué separada y neutralizada, y se observó que no presentaba actividad. El líquido, constituído por acetato de amilo resultante de la extracción anterior, fué adicionado de agua y alcalinizado mediante dos gotas de hidróxido potásico al 10 por 100. La capa acuosa viró a violeta por agitación, y al ser neutralizada reveló gran actividad.

Tratando las fracciones activas con alcohol metílico hasta disolución, y en seguida con éter (después de acidificar con ácido clorhídrico), no se obtuvo precipitado. Purificando la substancia mediante pases por éter

y transformando en fosfato, se extrajeron 13,2 miligramos de antibiótico. Posteriormente se obtuvieron mayores cantidades.

Streptomyces sp. 88-a-4.

a) **Características morfológicas.** Micelio aéreo de hifas finas, muy ramificados, blanco, que cambia luego a grisáceo o negruzco. Micelio sumergido con pigmento difusible de color café en papa y a veces gris oscuro en Czapeck. Conidios en cadenas largas y abundantes espirales, cortas y compactas. Esporas ovaladas o elipsoidales (fig. 4).

b) **Características bioquímicas.** Dió negativas las pruebas IMViC. Fermenta sacarosa; no produce cambios en la leche tornasolada; licúa la gelatina sin producir pigmento; reduce los nitratos. En gelosa-sangre desarrolla colonias blancas, con hemolisis. No fermenta glucosa, levulosa, xilosa, lactosa, maltosa, manitol, dulcitol, almidón y celulosa. Las colonias son de color gris oscuro en los medios de Czapeck, Sabouraud, Bottcher-Conn, asparagina y papa. El pigmento del micelio vegetativo es gris en los dos últimos y en Sabouraud, y negruzco en Bottcher-Conn. En el medio de Czapeck no aparece ningún pigmento.

c) **Otas características.** Actúa sobre cepas estreptomicino-resistentes. Da buen rendimiento en los medios de melazas y Waksman, a los diez días, en cultivos estáticos. Esporula bien en el medio de papa y en Bottcher-Conn desde los cuatro días. Algunas subcepas no produjeron el pigmento gris oscuro, y esto coincidió siempre con la pérdida completa de actividad. Otras dieron un pigmento más o menos café en algunos medios.

d) **Extracción.** Se repitió el método del acetato de amilo seguido para la cepa M-5 y se logró localizar la substancia activa en la misma fracción alcalina. Además, se observó que se trata de una fracción absolutamente incolora.

El halo de inhibición en la prueba de los discos presentaba cierta irregularidad, con aparición de pequeñas colonias resistentes, próximas al círculo de inhibición. El halo de la fracción alcalina también se mostró bastante irregular, siendo, sin embargo, amplio. Se ensayaron las pruebas anteriores a un pH más cercano a la neutralidad, obteniéndose resultados positivos.

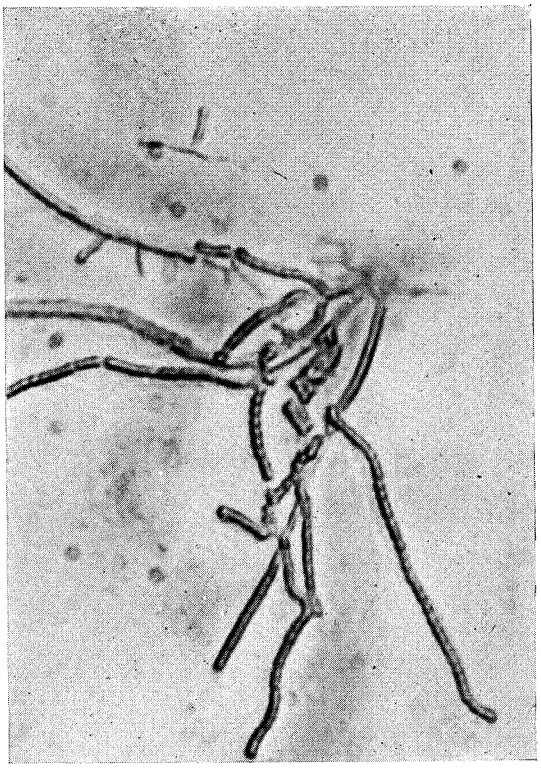


Fig. 1.—Streptomyces *sp. X-1.*

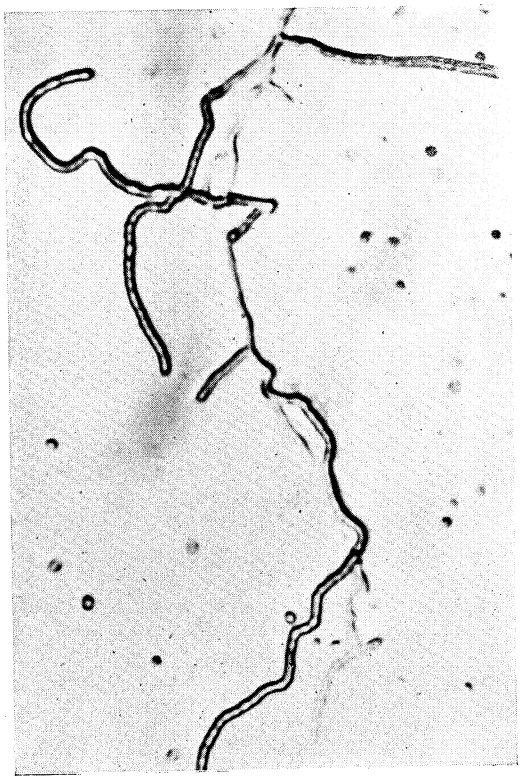


Fig. 2.—Streptomyces *sp. 97 X-1.*

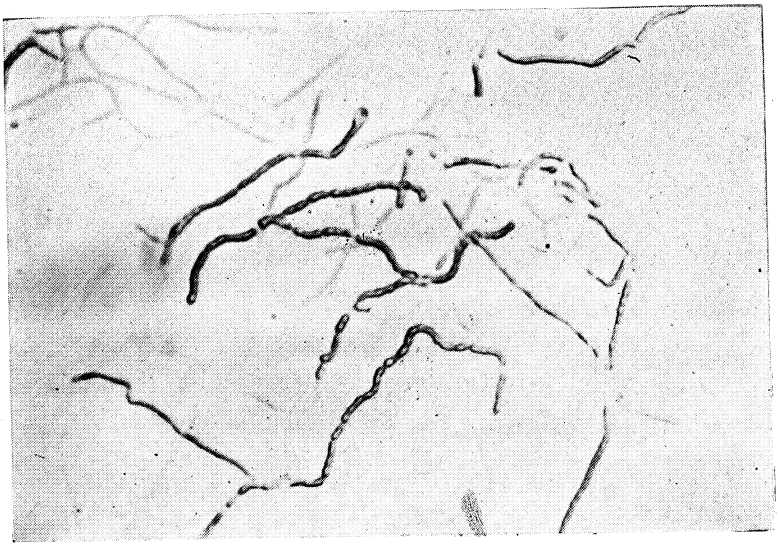


Fig. 3.—Streptomyces *sp. M-5.*

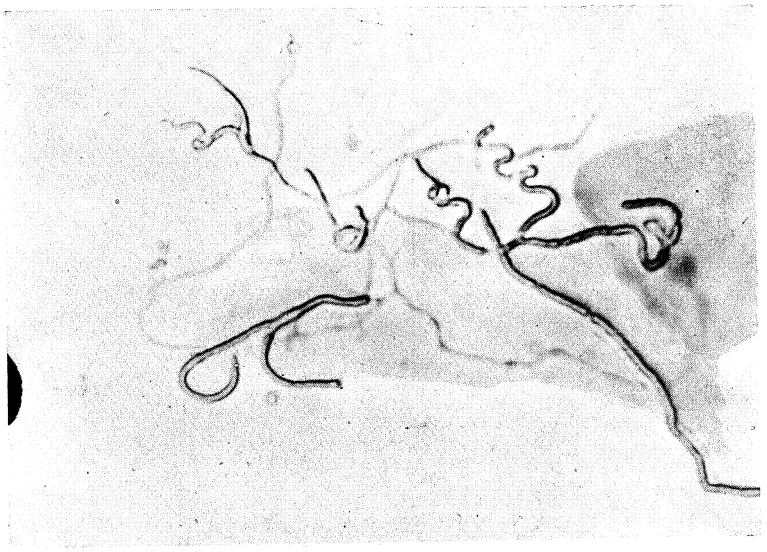


Fig. 4.—Streptomyces *sp. 88-A-4.*

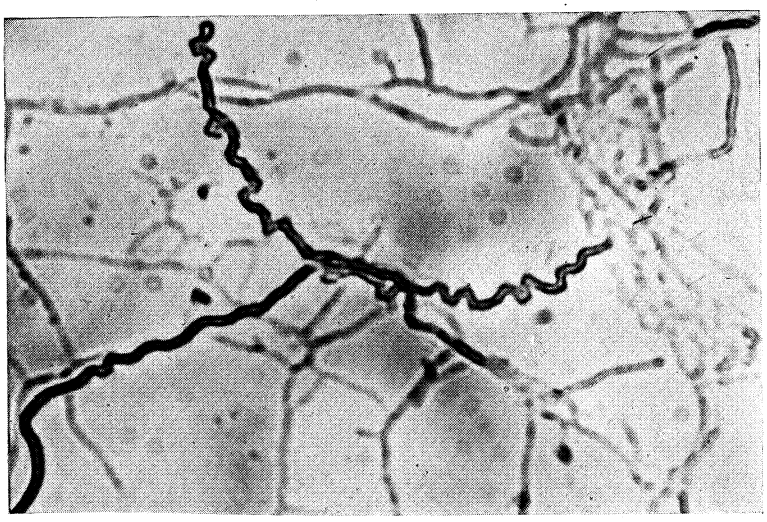


Fig. 5.—Streptomyces *sp. S-3.*

Streptomyces sp. S-3.

a) **Características morfológicas.** Micelio aéreo, muy ramificado, blanco, de hifas finas. Micelio sumergido con pigmento café en medio de papa. Conidios en cadenas más o menos flexuosas, elipsoidales u ovalados (fig. 5).

b) **Características bioquímicas.** Dió negativas las pruebas IMViC. Fermenta sacarosa; alcaliniza la leche tornasolada; licúa la gelatina; reduce los nitratos; produce pigmento café en papa y gelatina, y amarillento en los medios de Czapeck, Sabouraud y Bottcher-Conn, difundiéndolo en el medio. En gelosa-sangre desarrolla colonias blancas con hemólisis. No fermenta glucosa, levulosa, xilosa, lactosa, maltosa, manitol, dulcitol, almidón y celulosa.

c) **Otras características.** Actúa sobre cepas estreptomicino-resistentes. Da buenos rendimientos de substancia antibiótica en los medios con melazas. En medio de Waksman da rendimientos satisfactorios a los sietenueve días en cultivo estático. Conserva su acción después de someterse a 120° C. a presión durante dos horas. Resiste pH 1.0 dos horas y pH 10.0 el mismo tiempo. La agitación brusca no aumentó el rendimiento. La cepa esporula bien en medio de papa, a los cuatro días, así como en Bottcher-Conn y Czapeck. Se disocia fácilmente en dos variedades: una con pigmento café intenso, que designamos S-3-P, y otra que no desarrolla pigmento alguno y denominamos S-3-N. La primera fué la que mostró mayor actividad.

d) **Extracción.** En resumen, el método empleado para la extracción del antibiótico S-3 fué el siguiente: extracción con acetato de amilo; cromatografía del acetato en columna chica con mezcla de supercell y óxido de aluminio, pasando benceno y recogiendo por percolación la banda amarilla desarrollada; evaporación al vacío a 50° C. y tratamiento del residuo con metanol. Por último, pasar nuevamente la parte soluble por la columna embebida en benceno, desarrollando con metanol. El percolado, o sea, la parte soluble en éste, se evapora y es la substancia activa.

Posteriormente se obtuvo el antibiótico mediante una técnica diferente, que describimos en otro trabajo ya publicado en esta misma Revista (*).

(*) Vol. 6, núm. 2.

DISCUSION

Al comparar los distintos métodos empleados para el aislamiento de las 3.284 cepas de Actinomicetos, estudiadas desde el punto de vista de su acción antimicrobiana, encontramos que el más satisfactorio es el de las diluciones de suelo en medio de Czapeck, por la sencillez de su ejecución y por la constancia de resultados positivos que mostró en todos los casos. Al mismo tiempo se observó que el procedimiento de selección de cepas aquí empleado condujo a resultados también alentadores, a pesar de que, por ejemplo, el criterio seguido para la selección, según la toxicidad, no sea muy estricto o riguroso, pues algunos de los antibióticos que parecían inocuos según este criterio, resultaron a la postre tóxicos, cuando se les probó en estado semipuro.

Por otra parte, el empleo de cepas resistentes en la selección de antagonistas y diferenciación de antibióticos es de gran utilidad, y a este respecto Eisman (2) y Stansly (7) se han referido ampliamente al asunto recomendando métodos especiales, y Waksman y colaboradores (9) se han ocupado en particular de la resistencia de las bacterias a la estreptomicina y su aplicación en casos como el nuestro.

En nuestra opinión, el presente trabajo hubiera sido más efectivo si, además de las cepas estreptomicino-resistentes, hubiésemos dispuesto de otras resistentes a diversos antibióticos. No obstante, esa simple selección nos permitió eliminar un gran número de cepas que, indudablemente, hubiesen sido del grupo productor de estreptomicina, como lo comprobó el hecho de que la única cepa seleccionada que no actuó sobre E. coli estreptomicin-resistente, dió precisamente un antibiótico del «complejo estreptomicina» (antibiótico X-1).

Al efectuar las primeras pruebas de selección contra un grupo representativo de bacterias, pudimos comprobar que la especie más sensible fué S. aureus, siguiéndole luego en sensibilidad B. subtilis y S. lutea. Las menos sensibles de todas, en cambio, fueron el B. C. G. y K. pneumoniae, quedando E. coli en la categoría intermedia. De esta manera, ese grupo de bacterias permitió una selección bastante adecuada, ya que teníamos en prueba bacterias diferentes entre sí en cuanto a sensibilidad, reacción al Gram, patogenicidad y otros caracteres importantes.

Por último, el criterio de selección, según que el principio activo se difundiera o no en medios líquidos de cultivo, es también importante, puesto que industrialmente sólo interesa ese tipo de substancias. Por la misma razón, los medios utilizados para el estudio de la producción del antibiótico procuraron ajustarse a los requisitos y condiciones industriales, respecto a su sencillez, costo, facilidad de adquisición, etc.

La selección, entonces, se efectuó de manera rigurosa, pues hasta la actividad de las cepas según la intensidad de la inhibición causada sobre los microorganismos de prueba, se tomó en consideración. No se siguió un solo criterio, sino un conjunto de condiciones que garantizaran una selección estricta. Esto nos permitió apreciar, en primer lugar, la gran dificultad que existe para el aislamiento de cepas prometedoras desde el punto de vista de su acción antagonista, ya que entre más de 3.000 sólo 24 llegaron a interesarnos, y de éstas, solamente cinco llevamos hasta las pruebas finales, encontrando que sus principios activos correspondían en realidad a antibióticos ya descritos (tabla III). En segundo lugar pudimos comprobar que las cepas productoras de estreptomicina son frecuentes en los suelos, por lo que resulta de gran utilidad el empleo de cepas resistentes a esa droga para reducir el trabajo de selección.

Por lo que respecta a la actividad misma de las cepas antagonistas seleccionadas, es necesario insistir en la extrema variación presentada y en la facilidad con que ocurre, hechos que ya han sido discutidos por diversos investigadores. En nuestro caso pudimos observar que ciertas cepas, como la S-3 y la 88-a-4, mostraron variaciones en las que aparecía ligada la pigmentación con la actividad, en tanto que otras, sin cambio aparente en su aspecto y características generales, perdían repentinamente la actividad, como sucedió con muchas subcepas de la «M», por ejemplo, que fué la más difícil en ese sentido. Muchos lotes sembrados con cepas que habían dado actividad intensa por el método de la estría, mostraban, no obstante, una pérdida absoluta de actividad antimicrobiana, en tanto que al pasar por segunda o tercera vez estas mismas cepas inactivas a los mismos medios y en igualdad de condiciones, recuperaban sus propiedades inhibidoras. Otras veces sólo las recobraban al resembrarse en suelo estéril.

Por último, se pudo apreciar que los espectros antimicrobianos de las cinco cepas seleccionadas fueron diferentes entre sí, al igual que sus características morfológicas, bioquímicas y de cultivo.

Al comparar las características morfológicas y bioquímicas de los Streptomyces seleccionados, se llegó a la conclusión de que pertenecen a especies diferentes entre sí, pero al seguir la clave de Waksman y Henrici en el «Manual Bergey» sólo fué posible clasificar, de manera más o menos definitiva, dos de las cepas: a) Cepa X-1, perteneciente al grupo S. griseus; y b) Cepa 97-x-1, que pertenece al grupo de S. lavendulae, del que sólo difiere por no formar espirales apretadas y no licuar la gelatina.

Conforme a los datos contenidos en la referida clave, resulta extremadamente difícil la clasificación de las especies de Streptomyces. Por esta razón, indudablemente, la mayoría de los investigadores de antibióticos no intentan siquiera la identificación de las cepas por ellos estudiadas. Es, pues, urgente, ahora que el grupo de los Actinomicetos ha adquirido tanta importancia, intentar nuevas clasificaciones o modificar las que existen en la actualidad.

Las cinco cepas de Streptomyces seleccionadas resultaron de una actividad bastante aceptable, pues la presentaron a diluciones más o menos altas para algunas bacterias importantes y dieron en medios líquidos inhibición satisfactoria cuando expresada en unidades de dilución.

Respecto a la actividad in vivo, contra el neumococo tipo III, los antibióticos x-1 y 97-x-1 se comportaron como la estreptomicina y la estreptotricina, respectivamente; el S-3 no protegió al ratón contra 1.000 D. M. M. de dicho germen. Los otros dos antibióticos (M-5 y 88-a-4) no se estudiaron desde ese punto de vista. Es de advertir que el último resultó extremadamente tóxico.

En resumen, los cinco antibióticos aislados correspondieron a los siguientes, ya conocidos: estreptomicina, estreptotricina (dos veces), proactinomicina y actinomicina. Las especies productoras fueron: S. griseus; una variedad de S. lavendulae y tres especies no identificadas de Streptomyces.

* * *

Agradecemos al señor Dr. Oswaldo Gonçalves Lima, de la Universidad de Recife, Brasil, su valiosa ayuda técnica para la obtención de los antibióticos M-5 y S-3, en su calidad de investigador huésped del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS

(1) **BOTTCHER, E. J.** y **CONN, J.** 1942. A medium for the rapid cultivation of soil Actinomycetes. **Jour. Bact.,** 44 (1): 137.

(2) **EISMAN, P. C., MARCK, W. S.** y **MAYER, R. L.** Differenciation of antibiotics by resistant strains. **Science,** 103: 673-674.

(3) **FLOREY, H. W. et. al.** 1949. Antibiotics. Oxford Univ. Press.

(4) **SANCHEZ-MARROQUIN, A.** 1951. Antagonismo microbiológico de algunas especies de Streptomyces aisladas del suelo. Esc. de Graduados. Universidad Nacional de México.

(5) ——— **SALGADO, F** y **OVIEDO, G.** 1947. Observaciones sobre algunos Bacillus antagonistas. **Ciencia** (México), 8 (3): 60-66.

(6) **SCHATZ, A., BUGIE, E.** y **WAKSMAN, S. A.** 1944. Streptomicyn, a substance exhibiting antibiotic against Gram positive and Gram negarive bacteria. **Proc. Soc. Expt. Biol. Med.,** 55: 66-69.

(7) **STANSLY, P. G.** 1948. The identification of antibiotics by means of resistant strains of bacteria. **Jour. Bact.,** 55 (5): 721-726.

(8) **WAKSMAN, S. A.** 1950. The Actinomycetes. Chron. Bot. Co., Waltham Mass.

(9) ——— **REILLY, C. H.** y **SCHATZ, A.** 1945. Strain specificity and production of antibiotic substances. V.—Strain resistance of bacteria to antibiotic substances especially to streptomycin. **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.,** 31: 157-164.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

INTRODUCCION DE UNA MODIFICACION AL METODO DE WICKERHAM PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA FERMENTACION DE LA RAFINOSA POR LAS LEVADURAS (*)

por

Carlos Ramírez.

El método de Wickerham para determinar el poder fermentativo de la rafinosa por las levaduras utiliza la propiedad que posee el Saccharomyces carlsbergensis de fermentar la melibiosa.

La composición de la molécula de rafinosa es la siguiente:

Rafinosa . . . . . { Fructosa. / Melibiosa . . . . . { Glucosa. / Galactosa.

Como la molécula de melibiosa consta de una molécula de glucosa y otra de galactosa, únicamente las levaduras que posean melibiosa podrán desdoblar los azúcares componentes de la molécula de melibiosa, pudiendo fermentarla parcial o completamente, según puedan fermentar la glucosa sólo o también la galactosa, respectivamente.

El método de Wickerham arriba mencionado consiste en sembrar la levadura problema en un medio de agua de levadura con 2 por 100 de rafinosa.

Cuando la fermentación ha terminado, se siembra en el mismo tubo una suspensión de Saccharomyces carlsbergensis de cuarenta y ocho horas de edad. Puede ocurrir:

(*) **Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 23 de marzo de 1953.**

1) No se produce nueva fermentación.

2) Se produce nueva fermentación.

En el primer caso es indicio de que la molécula de rafinosa había sido totalmente fermentada, y en el segundo, sólo parcialmente.

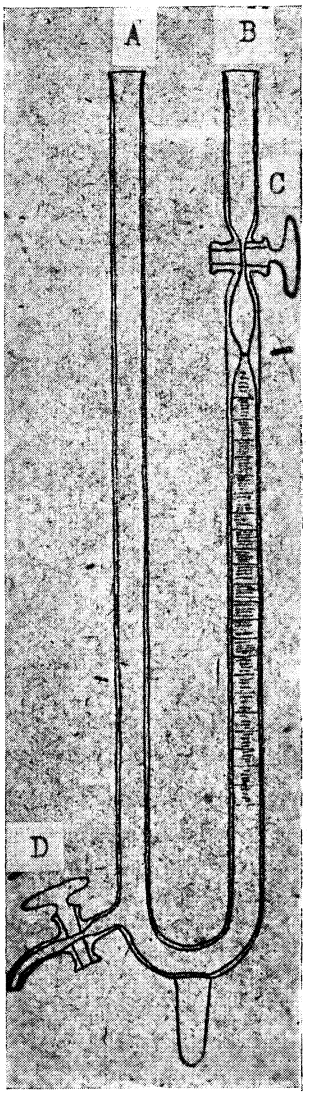


Fig. 1.

Hasta aquí llega el método de Wickerham, pero, como se puede juzgar, este método no aprecia cuál de los tres azúcares de la molécula de rafinosa es fermentado.

Con el fin de salvar este inconveniente y evitar el tener que emplear el aparato de Van Iterson Kluyver, de manejo bastante engorroso, he introducido algunas modificaciones al método de Wickerham.

El aparato de Van Iterson Kluyver viene a ser un manómetro, que mide el volumen de CO_2 desprendido en la fermentación (figura 1). Brevemente describiré su empleo.

Se esteriliza el aparato, así como el mercurio que se ha de emplear. Para las llaves se emplea una grasa especial, que puede esterilizarse.

Una vez estéril el aparato, se cierra la llave D y se abre la C. Después, se echa el mercurio por A, hasta que el nivel pase por encima de la llave C. Por B se echa una suspensión de la levadura problema en agua de levadura con 4 por 100 de rafinosa, estéril por filtración. Se abre la llave D para que salga el mercurio, hasta que el líquido con la suspensión llegue a enrasar con el cero de la escala graduada, por debajo de la llave C. Se cierra la llave C y la D. Se incuba a 25° C.

Después de tres semanas se hace la observación. Se empieza por echar mercurio por A, hasta enrasar los dos niveles, y se lee la columna de CO_2. Se hacen las correcciones de presión y temperatura, y por el volumen de CO_2 se calcula la cantidad de rafinosa fermentada.

Las modificaciones introducidas al método de Wickerham son las siguientes:

a) Se siembra la levadura problema en tubos de Durham de fermentación.

Puede ocurrir:

1) Que no se produzca fermentación.

2) Que se produzca fermentación.

En el primer caso se anota (—) para la fermentación de la rafinosa.

En el segundo caso, se pasa a la operación siguiente.

b) Terminada la fermentación de la levadura problema, se siembra en el mismo tubo una suspensión de Saccharomyces cerevisiae de veinticuatro-cuarenta y ocho horas de edad. Este tiene la propiedad de fermentar sólo la fructosa de la molécula de rafinosa, por tanto, 1/3 de ella.

Puede ocurrir:

1) Que se produzca nueva fermentación.

2) Que no se produzca nueva fermentación.

En el primer caso es señal de que la fructosa no había sido totalmente fermentada por la levadura problema. Se anota entonces (menor de 1/3).

En el segundo caso, se prosigue el ensayo siguiendo dos caminos diferentes, según que la levadura problema fermente o no la galactosa.

Primer caso.—La galactosa es fermentada. Se siembra en el mismo tubo una suspensión de Saccharomyces carlsbergensis.

Puede ocurrir:

a) Que se produzca fermentación.

b) Que no se produzca fermentación.

En el primer caso indica que la rafinosa había sido fermentada en 1/3 solamente.

En el segundo caso la rafinosa había sido totalmente fermentada por la levadura problema.

Segundo caso.—La galactosa no es fermentada. Se siembra entonces en el mismo tubo una suspensión de Sacharomyces pastorianus, que tiene la propiedad de fermentar sólo 2/3 de la molécula de rafinosa.

Puede ocurrir:

a) Que se produzca fermentación.

b) Que no se produzca fermentación.

En el primer caso indica que la levadura problema había fermentado 1/3 de la molécula de la rafinosa, o sea, la fructosa.

En el segundo caso la levadura problema había fermentado 2/3 de la molécula rafinosa, o sea, la fructosa y glucosa.

Este estudio ha sido efectuado en el «Laboratorium voor Microbiology» de Delft (Holanda), bajo la dirección del Profesor J. A. Kluyver (año 1952).

BIBLIOGRAFIA

WICKERHAM, L. J.—1946. A simple technique for detection of melibiose-fermenting yeasts. **Journal Bact.,** 46, 501-505.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

UNA NUEVA ESPECIE DE SPOROTRICHUM: EL SPOROTRICHUM SANGUINEUM (*)

por
Carlos Ramírez.

Durante los trabajos efectuados en el «Laboratorium voor Microbiology» de Delft, bajo la dirección del Profesor J. A. Kluyver, recibí diez cepas de levaduras aisladas por J. Boidin, de la Universidad de Lyon, de líquidos empleados para curtición de cueros, a base de corteza de encina y castaña, principalmente.

Los cueros son sumergidos sucesivamente en baños cada vez más ricos en taninos, y cada vez más ácidos, para obtener una buena penetración de los cuerpos. Generalmente se emplean cuatro a seis baños de concentración creciente, cuyo contenido en tanino se expresa en grados Baumé.

Los baños más viejos se enriquecen notablemente en materias proteicas procedentes de los cueros que han pasado por ellos.

Entre las levaduras aisladas de estos líquidos por J. Boidin había una cepa macroscópicamente semejante a un cultivo de levadura, pero cuyos caracteres microscópicos diferían notablemente de este grupo de hongos.

La presente nota tiene por objeto describir, bajo el punto de vista micológico, el hongo aislado por J. Boidin de líquido curtiente de 7º Baumé, en la Escuela de Curtidores de Francia, de Lyon, el 5 de mayo de 1947.

Por sus caracteres macroscópicos y microscópicos se podría situar este hongo en el género Sporotrichum Link, considerándolo, por sus caracteres, como una nueva especie, para la que propondría el nombre de Sporotrichum sanguineum.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 23 de marzo de 1953.

ASPECTO MACROSCOPICO DE LAS COLONIAS

Las colonias sobre agar-malta tienen un aspecto absolutamente diferente del de los mohos, pues no son aterciopeladas ni lanosas. Se presentan como plaquitas redondas, de color blanco de porcelana a rosa salmón, lisas y húmedas, semejantes a colonias de levaduras. Con la edad, se arrugan, volviéndose de color naranja e incluso rojo sangre (Klincksieck, núms. 33-35). El pigmento producido por el hongo se difunde por todo el medio, coloreándolo de un hermoso color rojo sangre oscuro. Dicho pigmento se produce únicamente en presencia de glucosa.

En malta forma anillo fino y a veces un velo tardío y abundante depósito.

ASPECTO MICROSCOPICO

La fase miceliar está formada por verdadero micelio tabicado, rastrero, de unas tres micras de diámetro por término medio, hialino y ramificado.

Los conidios, ovalados, esféricos, elípticos o piriformes, nacen sin orden a lo largo del micelio, sea aisladamente, sea en glomérulos o en racimo. En el punto de inserción con el micelio se observa siempre un dentículo bien manifiesto (carácter típico del género S p o r o t r i c h u m).

Las medidas de los conidios son las siguientes:

Conidios elípticos	(7-9) . (2-4)	micras
Conidios ovalados	(4-6) . (3-3,5)	»
Conidios esféricos	(7-9)	»

Algunos conidios pueden producir yemas y dar lugar a uno o varios conidios. Incluso en las colonias con micelio abundante, los conidios tienden a producir yemas en gran número, lo que explica la consistencia cremosa de las colonias, lo que les da el aspecto de levadura.

Además de los conidios, se observa la producción de clamidosporas en cadena, terminales o intercalares, en forma de limón, fáciles de reconocer gracias a su doble pared. Sus medidas son (6-10) . (4-5) micras.

Al germinar estas clamidosporas, pueden producir directamente cadenas de clamidosporas en cuyo extremo puede producirse micelio. En otros casos, la clamidospora emite uno o más tubos miceliares, de los que pueden producirse nuevas clamidosporas.

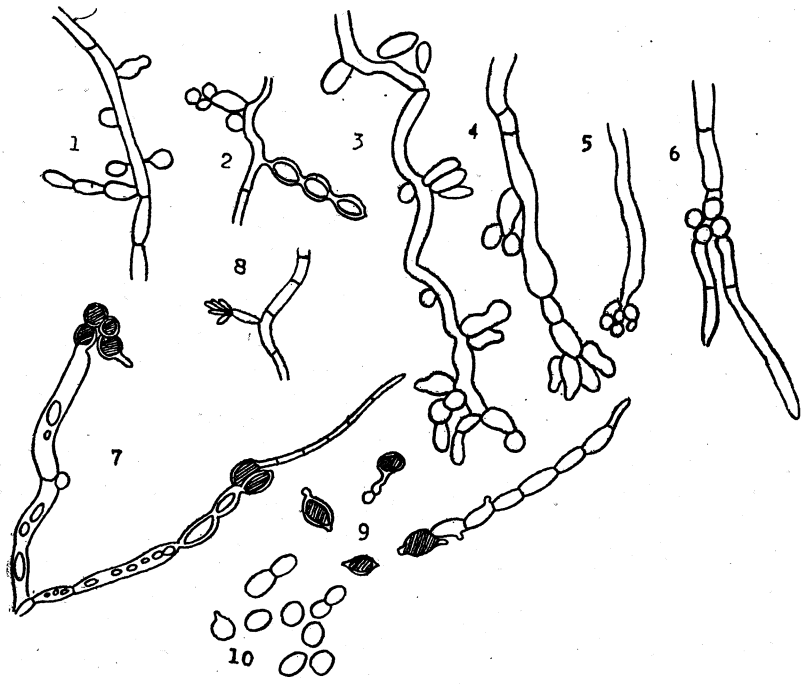


Fig. 1

Núms. 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 8. Distintas clases de conidios.—Núms. 2, 7 y 9. Clamidosporas germinadas y en germinación.—Núm. 10. Células de levadura en extracto de malta.

CARACTERES FISIOLOGICOS

Fermentación de azúcares:	Glucosa	—
	Galactosa	—
	Sacarosa	—
	Maltosa	—
	Lactosa	—
	Rafinosa	—
Asimilación de azúcares:	Glucosa	+
	Galactosa	+
	Sacarosa	+
	Maltosa	+
	Lactosa	—

Asimilación de fuentes de nitrógeno:

SO_4 $(NH_4)_2$	+
NO3K	+
Urea	+
Peptona	+
Asparagina	+

Hidrólisis de la arbutina: Positiva.

DIAGNOSIS LATINA

Mycelium hyalinum, septatum, repens (3-4), diam. Sporae ovoideae (4-6) . (3-3,5), globosae (7-9), ellipticae (7-9) . (2-4), vel pyriformis, singulae vel glomeratae, vel racemosae, in denticulo insertae. Chlamydosporae catenulatae, limoniformis.

In medio cum glucoso pigmentum rubrum sanguineum producetur.

Fermentatio nulla.

In medio minerali cum plucoso, galactoso, saccharo, maltoso crescit.

Nitras kalicus assimilatur.

Arbutinum finditur.

In agaro maltato cultura (post unum mensem, 17° C.) rubra sanguinis rugosa, glabra.

El método seguido para el estudio de estos caracteres fisiológicos es el empleado en el «Centraalbureau voor Schimmelcultures, Yeasts Division», de Delft (Holanda).

BIBLIOGRAFIA

AREA LEAO (A. E.).—1946. **O Hospital.**

ASCHIERI (E.).—1929. **Atti Ist. Pavia;** serie 4, vol. I.

BROOKS (F. T.), C. G. HAUSFORD.—1923. **Trans. Br. Myc. Soc.,** vol. 8, 113.

BRUMPT (E. M.), LANGERON.—1910. **Bull. Soc. Med. Hop.** Paris.

CASTELLANI (A.).—1937. **Journ. Trop Med.**

DOIDGE (E. M.), BUTLER (E. J.).—1924. **Trans. Br. Myc. Soc.,** vol. 10; 119.

GARMAN (H.).—1898. **Bull.** 74, Kentucky.

KIDD (M. N.), BEAUMONT (A.).—1924. **Trans. Br. Myc. Soc.,** vol. 10; 98.
KLINCKSIECK (P.) et VALETTE (Th.).—1908. **Code des couleurs.** Paris.
McCOLLOCH (L. P.).—1944. **Mycopatología,** vol. XXXVI, N.º 6.
PIJPER (A.).—1931. **Journ. Trop. Med.**
RUEHLE (G. D.).—1931. **Phytop,** 21: 1141.
TOCHINAI (Y.).—1950. **Hokaido.**
WAKSMANN (S. A.).—1916. **Soil Science,** vol 2; 126.
WEIDMAN (F.).—1933. **Arch. Path.** 16.

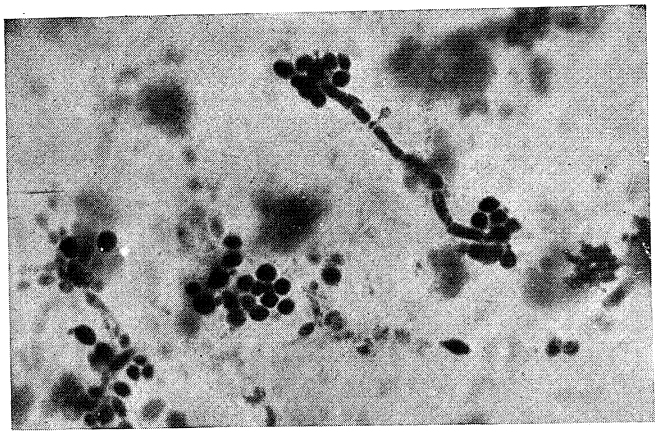


Fig. 2.

Micelio y glomérulos de conidios esféricos. En un conidio aislado en el micelio se observa claramente el dentículo característico que lo une al micelio. (1.000 ×.)

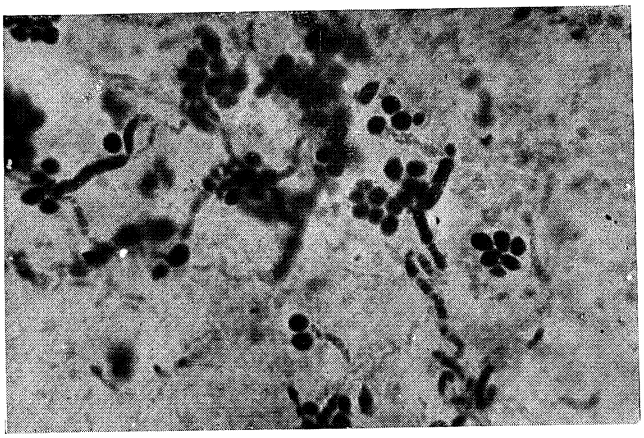


Fig. 3.

Conidios ovalados y esféricos, sueltos y en glomérulos. (1.000 ×.)

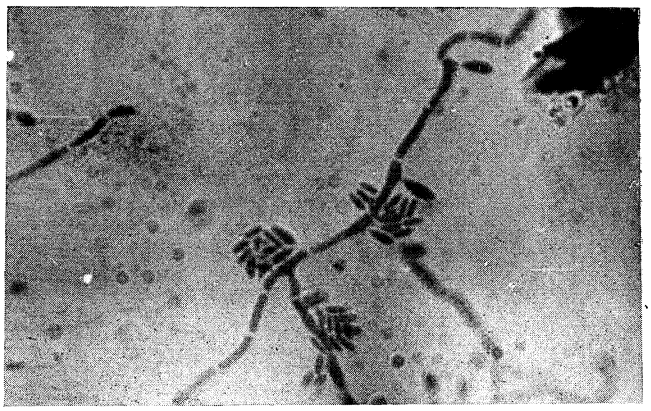


Fig. 4.

Conidios elípticos, insertos aislados o en grupos en el micelio por medio de un dentículo. (1.000 ×.)

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

CONTRIBUCION A LA TINCION DE ASCOSPORAS Y CLAMIDOSPORAS DE LEVADURAS (*)

por

Carlos Ramírez.

CONTRIBUCION A LA TINCION DE LEVADURAS

Hasta ahora, la mayoría de los métodos empleados en la tinción de levaduras y ascosporas de las mismas servían sólo para poner de manifiesto dichas ascosporas, sin permitir su estudio morfológico, pues quedaban más o menos deformadas por las manipulaciones de que eran objeto.

Interesado en hallar una solución a esto y en buscar un método que, al mismo tiempo, permitiera revelar la presencia de ascosporas, tiñéndolas sin deformarlas, emprendí una serie de investigaciones, tendiendo siempre a verificar las pruebas sobre material fresco, sin fijar. Estas investigaciones me han conducido a los resultados que expondré seguidamente.

Como técnica de cultivo para las levaduras estudiadas que producen seudomicelio, he empleado la de Rivalier y Seydel (1932), que tiene por objeto obtener cultivos muy delgados sobre portaobjetos, bañados en una delgada capa de agar patata, siendo directamente observables al microscopio y pudiéndolos teñir como si fueran preparaciones histológicas. Esta técnica es la siguiente:

Preparación de los portas con agar-medio nutritivo.

Los portas destinados a los cultivos han de estar muy limpios, ser nuevos, flameados y estar fríos antes del empleo. Se prepara de antemano

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 23 de marzo de 1953.

cierto número de portas estériles, que se guardarán en un recipiente estéril y cerrado.

I. Por otra parte, se preparan una serie de cajas de Petri estériles, conteniendo cada una una varilla en U, para servir de soporte a los portas.

II. Se prepara un medio débilmente agarizado (0,75 por 100 de agar), cuya composición variará según los fines a que se destine.

III. Se funde el medio estéril en un tubo de Borrel y se mantiene fundido a 60º al bañomaría. Con ayuda de unas pinzas flameadas se sumergen los portas, uno a uno, en el medio y se colocan de dos en dos sobre los soportes en U de las placas de Petri; la cara superior estará cubierta de una fina capa de medio.

Con una pipeta estéril se echa agua estéril en el fondo de las placas para conservar la humedad. A continuación se siembra la levadura en estría, cubriendo parte de ella con un cubre estéril.

Se incuba a 25º el tiempo necesario.

Una vez alcanzado el desarrollo necesario, se procede a la tinción.

Como los colorantes básicos empleados usualmente hasta ahora tiñen el agar, volviéndolo opaco, tuve que desistir de su empleo.

En cambio, los colorantes ácidos reúnen las ventajas siguientes: Las coloraciones se hacen con facilidad, en frío, sin fijación previa por el calor; el agar permanece transparente y el exceso de colorante que lo impregna puede ser eliminado por lavado con agua corriente, sin tener que emplear ácidos minerales. La coloración obtenida es transparente y no se modifica ni el aspecto ni el volumen de los organismos.

De los colorantes ácidos ensayados, los que mejores resultados han dado son el Verde luz y el Rosa Bengala.

Para la preparación de dichos colorantes he empleado las fórmulas de Maneval (1941).

Preparación de colorantes.

Solución A de Maneval.

Solución acuosa de ácido fénico al 5 por 100	30 c. c.
Solución acuosa de ácido acético al 20 por 100	10 »
Percloruro de hierro al 30 por 100	4 »

Verde luz.

Solución acuosa de ácido fénico al 5 por 100	30 c. c.
Solución acuosa de ácido acético al 20 por 100	10 »
Percloruro de hierro al 30 por 100	4 »
Solución acuosa de Verde luz al 1 por 100	8 »

Rosa Bengala.

Acido fénico	5 gr.
Rosa Bengala	1 »
Agua destilada	100 c. c.

(Se echan después, gota a gota, seis a ocho gotas de ácido acético al 20 por 100, hasta aparición de una nube; luego se añaden 20-50 c. c. de alcohol de 95°. Si la nube no desaparece, se añade una traza de amoníaco con una aguja de vidrio.)

Lista de otros colorantes ácidos ensayados.

Azul soluble (China Blue).—The British Drug House; Graham street 1, London.

Eritrosina.—Dr. Fraenkel y Dr. Landau; Berlín, Oberschöneweide.

Eosina.—Bacto-eosin Y (DE-5); Difco Laboratories, Detroit (Mich).

Verde sólido.—Gesellschaft für chemische Industrie in Basel.

La eosina y la eritrosina se preparan como el Rosa Bengala; el azul soluble y el verde sólido, como el Verde luz.

Método seguido en la tinción.

I. Los cultivos frescos, sin fijar, son bañados en la solución A arriba indicada durante quince minutos, escurridos.

II. Se deja actuar el Verde luz durante treinta-cuarenta minutos.

III. Se lavan los cultivos en agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante que impregna el agar, hasta que éste quede casi incoloro.

IV. Se deja actuar el Rosa Bengala treinta-cuarenta y cinco segundos.

V. Se lava de nuevo, pudiendo observarse seguidamente al microscopio. Las ascosporas se tiñen de verde y las células vegetativas de rojo.

En los casos en que la levadura no produce seudomicelio, se procede del modo siguiente:

Con un asa de platino se toma una porción de levadura de los tubos

donde haya esporulado y se hace una suspensión en agar líquido. A continuación se vierte el agar con la suspensión de levadura sobre un porta muy limpio y flameado, extendiéndolo en capa fina. Una vez solidificado, se procede a la tinción como en el caso anterior.

Si después de observadas en fresco se desea conservar las preparaciones, se sigue la técnica de Rivalier y Seydel, que es la siguiente:

I. Desecación. — Se delimita el cuadrado de agar que lleva el cultivo y se quita el resto. Entonces se deja la preparación durante veinticuatro horas en estufa a 37° C., con la cara hacia abajo, en un soporte, lo que asegura una desecación completa, sin depósito de polvo. Al cabo de ese tiempo se quitará con una aguja enmangada la parte central del cultivo, si sobresale demasiado, y se procede al colodionado.

II. Colodionado. — Se sumerge un momento el porta en un frasco conteniendo colodión diluído:

Colodión oficinal	1 parte
Alcohol absoluto	2 »
Eter sulfúrico	2 »

El colodión oficinal se prepara del modo siguiente:

Celulosa octonítrica	5 gr.
Etanol de 95°	20 »
Eter rectificado comercial	75 »

Se escurre el porta y se deja secar, con la cara hacia arriba, sobre un soporte horizontal. Con esta operación, la preparación queda pegada al porta.

Como es natural, la tinción que se ha hecho en fresco puede hacerse también después de desecación y colodionado del cultivo.

Una vez colodionadas y secas las preparaciones, pueden ser montadas en Bálsamo del Canadá, siguiendo la marcha siguiente:

a) Lavar con alcohol de 70°, que elimina el exceso de colorante, si lo hay.

b) Deshidratar durante algunos minutos (uno-dos) en alcohol de 95°.

c) Acabar de deshidratar con acetona anhidra.

d) Sumergir en una mezcla de acetona y xilol en partes iguales.

e) Xilol puro. La preparación ha de quedar transparente, sin nigún enturbiamiento.

f) Montar en Bálsamo.

Con el Saccharomycodes ludwigii y el Saccharomyces cerevisiae he empleado también, con buen resultado, la tinción siguiente:

1) Rosa Bengala: treinta minutos.
2) Lavar con agua corriente.
3) Azul soluble: cinco minutos.

Lavar con agua corriente.

Las esporas quedan teñidas de rojo y las células vegetativas en azul.

INVESTIGACION DE LA ACIDORRESISTENCIA DE LAS ASCOSPORAS DE LAS LEVADURAS Y TECNICA EMPLEADA

En los casos en que tuve que ensayar la acidorresistencia de las ascosporas maduras, como el colorante básico (fucsina fenicada) no podía ser empleado sobre agar, introduje la técnica siguiente:

He empleado el método de Moeller, algo modificado:

1. Las coloraciones las he verificado en un embudo con llave y a través de un papel de filtro que retiene la levadura y deja pasar los líquidos empleados en la tinción. El embudo está en comunicación con una trompa de vacío para acelerar la filtración.

Método.

1. Fijar durante diez minutos la suspensión de levadura del embudo con el siguiente fijador:

Alcohol de 70°	1	parte
Acido acético	1	»
Formol al 5 por 100	1	»

se mezclan los tres en el momento de emplearse.

2. Lavar con alcohol de 70°.
3. Alcohol de 95°: dos minutos.
4. Alcohol absoluto: dos minutos.
5. Cloroformo: dos minutos.
6. Lavar con alcohol absoluto.
7. Alcohol de 70°.

8. Acido crómico al 5 por 100: dos minutos.
9. Lavar con agua.
10. Fucsina de Ziehl-Neelsen: diez minutos.
11. Lavar con agua.
12. Decolorar con SO_4H_2 al 1 por 100.
13. Lavar en agua.
14. Contrastar con lugol diluído.

Las ascosporas acidorresistentes quedarán teñidas de rojo.

La técnica seguida para la coloración en fresco de las ascosporas de las levaduras ha sido también ensayada con las clamidosporas de Candida albicans, habiendo conseguido muy buen resultado.

Con el Verde luz-Rosa Bengala, las clamidosporas quedan teñidas en verde brillante, y las blastosporas y seudomicelio en diversos tonos de rojo.

ALGUNOS METODOS ANTIGUOS DE COLORACION DE ASCOSPORAS

Método de Kufferath (1929):

a) Fijación por el calor, a la temperatura de ebullición.
b) Coloración en caliente por la fucsina fenicada de Ziehl.
c) Diferenciación por alcohol clorhídrico al 1 por 100.
d) Coloración de contraste con clorhidrato de azul de Nilo al 1 por 100.
e) Lavar con agua y extender sobre la preparación seca una capa uniforme de tinta china diluída, que precisa el contorno de las ascas. Las ascosporas aparecen en rojo.

Método de P. H. Gray (1941):

Verde Malaquita	0,5 gr.
Fucsina básica	0,5 »
Agua destilada	100 c. c.

Las células vegetativas se tiñen de violeta; las ascosporas de azul verdoso.

Método de Mac Clung (1943):

Emplea por separado dos colorantes básicos:

A.—Verde Malaquita	1	gr.
Agua fenicada al 1 por 100 ...	100	c. c.

B.—Safranina ... ... 0,5 gr.
Agua destilada ... ... 100 c. c.

Fijar por el calor.

Teñir con la solución A dos minutos, calentando hasta producción de vapores.

Lavar un minuto con agua.

Teñir con la solución B treinta segundos, lavar y secar.

Las ascosporas se tiñen en verde sobre fondo rojo.

Como se puede ver, por estos métodos más antiguos las manipulaciones y la fijación de las levaduras por el calor dañaban a la morfología de las mismas.

El principio en que se basa el empleo de los colorantes ácidos para la coloración de las ascosporas es el siguiente:

Un colorante ácido, actuando sobre otro durante cierto tiempo, acaba por desalojarlo y sustituirlo.

Las ascosporas tienen la propiedad de teñirse con dificultad y de soltar los colorantes difícilmente una vez teñidas.

Teniendo en cuenta estas dos propiedades, se hace actuar uno de los colorantes ácidos mucho más tiempo que el otro, para que llegue a penetrar en las ascosporas.

Una vez penetrado se le desaloja de las células vegetativas con más rapidez que de las ascosporas, al actuar el segundo colorante.

Este trabajo ha sido efectuado en el «Laboratorium voor Microbiology» de Delft, Holanda, bajo la dirección del Profesor J. A. Kluyver (año 1952).

BIBLIOGRAFIA

CONN (H. J.).—1940. Biological stains. **Biotechn. Publication,** Geneva, **N. Y. U. S. A.**

GRAY (P. H. H.).—1941. **Canad. J. Res.** (C), XIX, 95-98.

KUFFERATH (H.).—1929. A propos des spores de Pseudosaccharomyces apiculatus (Rees-Hansen) Kloker. **Ann. Soc. zymologie,** Bruselles, 1, 214-218,

MAC CLUNG (L. S.).—1943. On the staining of yeasts spores. **Science,** XCVIII, 159-160.

MANEVAL (W. E.).—1941. Staining bacteria and yeasts with acid dyes. **Stain technology,** XVI, 13-19.

RIVALIER et **SEYDEL (S.).**—Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué â l'étude microscopique des champignons des teignes.

LANGERON (M.) et **LUTERAN (Ph.).**—1947. Emploi des colorants acides en Micologie et en Microbiologie générales. **Ann. de Parasitologie,** T. XXII, n.º 3-4; 254-275.

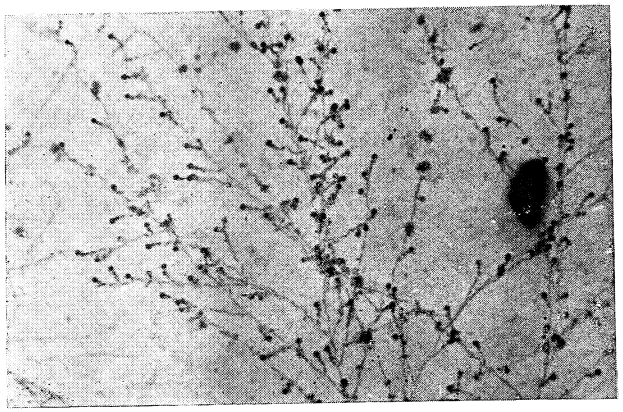


Fig. 1
Clamidosporas de Candida albicans *(100 ×) teñidas con Verde luz-Rosa Bengala.*

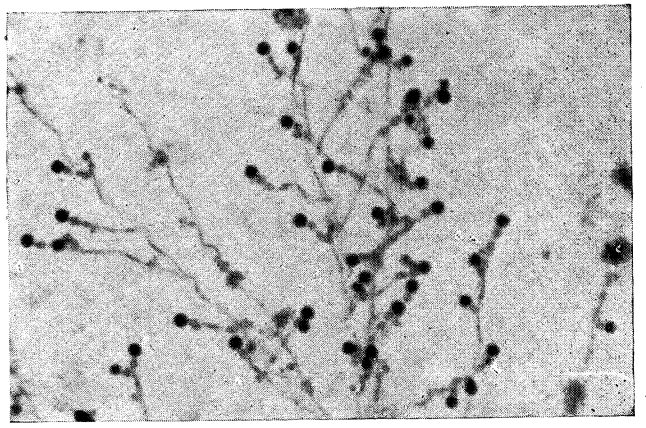


Fig. 2.
Las mismas, aumentadas 600 ×.

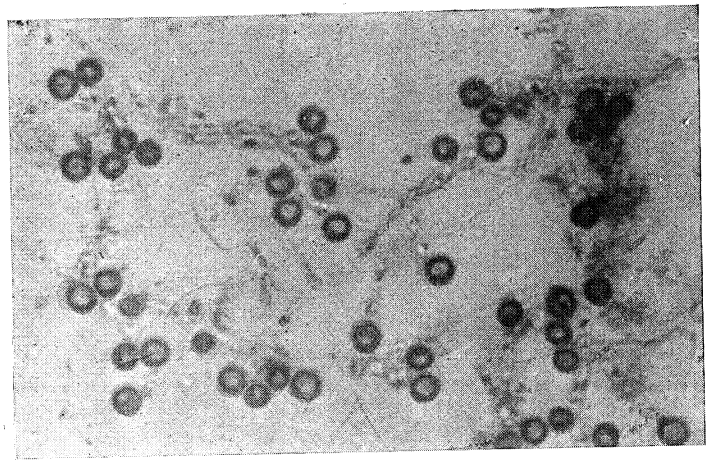


Fig. 3.
Clamidosporas de Candida albicans *(1.000 ×), en las que se puede observar la gruesa membrana de las mismas, teñida en verde, contrastando con el seudomicelio, teñido en rosa.*

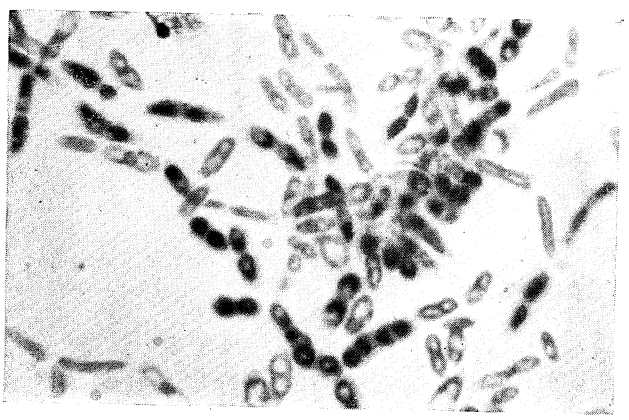


Fig. 4.

Ascosporas de Pichia farinosa *teñidas en azul, con Verde luz-Rosa Bengala. Se encuentran en grupos de dos en cada asca, generalmente. El hecho de teñirse en azul es un caso excepcional de esta especie, no habiendo encontrado, por ahora, otro caso. (1.000 ×.)*

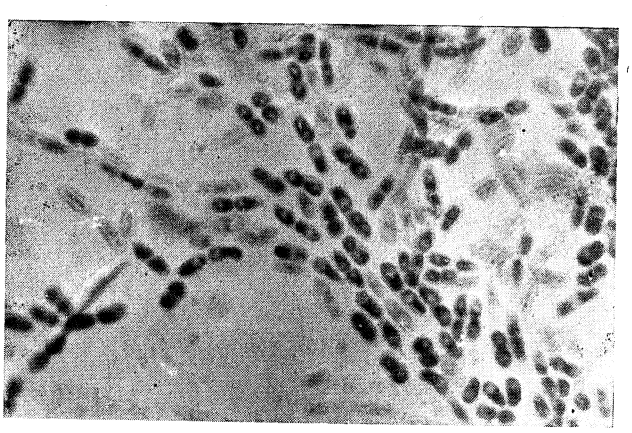


Fig. 5.

Ascosporas de Pichia membranaefaciens, *teñidas en verde, con el mismo método. (1 000 ×.)*

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO SOBRE NUEVAS ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS DE DIFERENTES SUSTRATOS (*)

por

Carlos Ramírez.

SACCHAROMYCES SOCIASI N. SP.

Esta levadura me fué enviada a Delft por el Prof. Socías, aislada de heces humanas, para su determinación, resultando ser una nueva especie de Saccharomyces, con la propiedad de fermentar la lactosa y de asimilarla, propiedad que, hasta ahora, sólo poseían el Saccharomyces fragilis y el Saccharomyces lactis.

Las diferencias de esta nueva especie con el Saccharomyces lactis es que no asimila la maltosa, no hidroliza la arbutina, no tiene seudomicelio y no asimila el alcohol.

Las diferencias con Saccharomyces fragilis son las de no poseer sendomicelio, tener esporas redondas y no arriñonadas, y no asimilar la inulina.

Descripción.

En malta, después de tres días a 25° C., las células son redondas a ovales (4-6) . (4-7) micras. Sólo forman depósito en el fondo del frasco.

Después de un mes forma abundante depósito y grueso anillo.

La estría en agar-malta, después de un mes, es de color crema, lisa, brillante, de borde ligeramente lobulado.

Cultivo sobre porta: No se observa seudomicelio.

Esporulación: Esporula muy bien sobre medio V 8 y de Adams, previa conjugación de ascas, generalmente isogámica, aunque

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 23 de marzo de 1953.

puede presentarse alguna vez heterogámica. Esporas en número de 1-3, redondas u ovales.

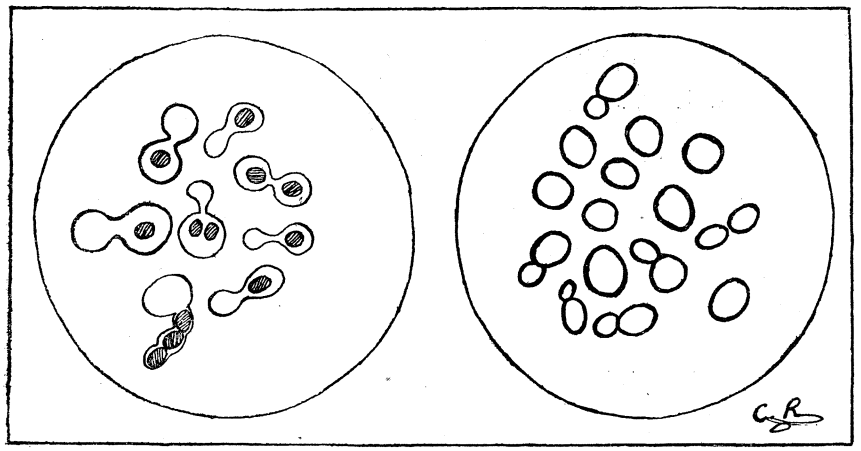


Fig. 1.—Saccharomyces sociasi *n. sp.*

Núm. 1. Ascosporas a los siete días en medio de Starkey.—Núm. 2. Células en extracto de malta a los tres días a 25° C.

Fermentación: Glucosa +
Galactosa +
Sacarosa +
Maltosa —
Lactosa +
Rafinosa + 1/3

Asimilación de azúcares: Glucosa +
Galactosa +
Sacarosa +
Maltosa —
Lactosa +
Inulina —

Asimilación de fuentes de nitrógeno:
Nitrato potásico —
Peptona +

Hidrólisis de la arbutina: Negativa.
Asimilación de alcohol: Negativa.

Diagnosis latina.

In musto maltato cellulae rotundae aut subovoideae, (4-6) . (4-7), singulae aut binae. Sedimentum anulusque formantur.

In agaro maltato cellulae rotundae aut subovoideae, singulae aut binae (3.5-5.5) . (3.5-6.5). Cultura (post unum mensem, 17° C.) flavalbida, glabra, margine undulato.

Pseudumycelium nullum.

Copulatio cellularum acquarum conformationi asci plerumque precedit, ascosporae satis magnae, rotundae aut ovoideae; 1-3 in asco.

Fermentatio:

Glucosi, galactosi, sacchari, lactosi et rafinosi pro tertia parte.

In medio minerali cum glucoso, galactoso, saccharo, lactoso crescit.

Nitras kalicus non assimilatur.

In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit.

Arbutinum non finditur.

CANDIDA BOIDINI N. SP.

Esta cepa fué aislada por J. Boidin, del laboratorio de Botánica de la Universidad de Lyon, de un baño curtiente a base de corteza de Quebracho, de Castaño y de Mirobolano, de 4.° Baumé. La especie más próxima a ella es la Candida krusei, de la que se diferencia por sus células mucho menores, por el seudomicelio y por asimilar la galactosa.

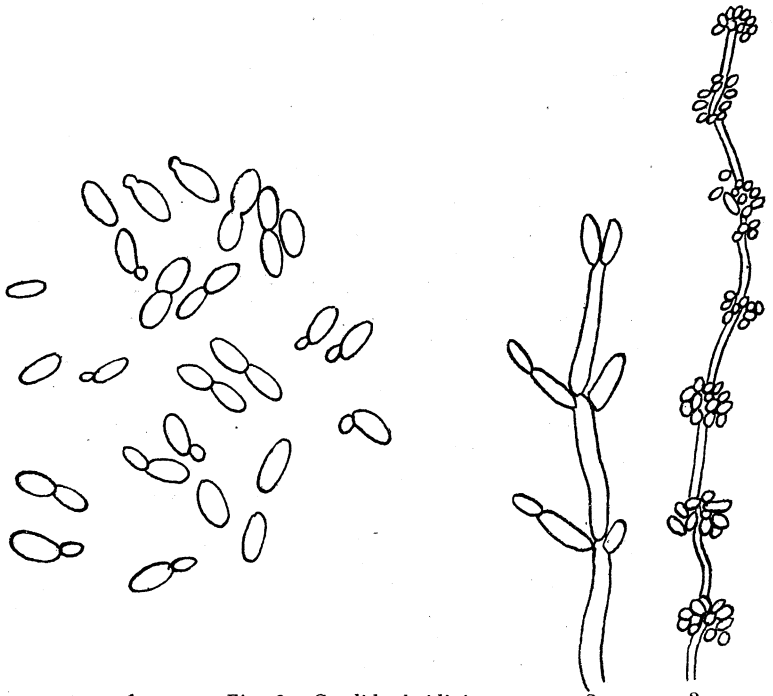
Descripción.

A los tres días, en malta a 25° C., células elípticas (2-3) . (5-10)μ, aisladas o de dos en dos. Forma velo fino, delicadamente rugoso, ascendente por las paredes del frasco.

La estría, en agar malta, después de un mes a 17° C., es de color crema parduzca, lisa, con franja de seudomicelio en el borde.

Cultivo sobre porta.—Forma seudomicelio del tipo «Mycotorula», con grupos de blastosporas en cada verticilio.

Fermentación:	Glucosa	+	Maltosa	—
	Galactosa	—	Lactosa	—
	Sacarosa	—	Rafinosa	—



1 *Fig. 2.*—Candida boidini *n. sp.* 2 3

Núm. 1. Células de levadura a las cuarenta y ocho horas en malta a 25º C.—Número 2. Seudomicelio sobre agar patata (1.000 ×).—Núm. 3. Seudomicelio sobre agar patata (450 ×).

Asimilación de azúcares:

Glucosa + Maltosa —
Galactosa + (débil) Lactosa —
Sacarosa —

Asimilación de etanol: Ligeramente positiva.

Asimilación de fuentes de nitrógeno: Peptona +
NO_3K —

Hidrólisis de la arbutina: Negativa.

Diagnosis latina.

In musto maltato cellulae ovoideae (2-3) . (5-10) μ, singulae aut binae. Post dies 3 pellicula tenuis, flavida, non-nitida, crispulata, sursum repens formatur. Sedimentum.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C.) flavalbida aut fusca, glabra, cum pseudomycelio in margine.

Pseudomycelium cum blastosporis abundat, tipo «Mycotorula».

Fermentatio glucosi.

In medio minerali cum glucoso, galactoso crescit.

Nitras kalicus non assimilatur.

In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit.

Arbutinum non finditur.

BIBLIOGRAFIA

LODDER, J., and **KREGER VAN RIJ, N. J. W.**—1952. The Yeasts. North Holland publisching Company, Amsterdam.

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

ESTUDIO DE UNA NUEVA ESTIRPE DE BRASSICA VIRUS L. Y SUS INCLUSIONES INTRACELULARES (*)

por

Miguel Rubio Huertos

INTRODUCCION

A finales de octubre de 1951 encontramos en un huerto particular, cercano a la Facultad de Farmacia de la Ciudad Universitaria (Madrid), una serie de coles (Brassica oleracea L.) infectadas, al parecer, con virus, y por los síntomas que presentaban se podía suponer que la mayor parte lo estaban con el mosaico de la coliflor (Cauliflower mosaic, Brassica virus 3), y algunas, que presentaban necrosis en forma de anillos en el envés de las hojas, parecían infectadas con el Anillo negro de la col (Cabbage black ring, Brassica virus L.), interesados en el estudio de este último virus, no descrito hasta ahora en España, y viendo que una de las plantas presentaba unas necrosis mucho más fuertes que las demás y al mismo tiempo achaparramiento y amarillez en las hojas, tomamos algunas de éstas para su estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Con las hojas antes citadas y con ayuda de carborúndum inoculamos las siguientes plantas:

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 23 de marzo de 1953.

Cuatro Brassica rapa (*).
Cuatro Brassica chinensis (*).
Tres Nicotiana tabacum (*).
Tres Nicotiana glutinosa (*).

A los siete días aparecen pequeñas lesiones necróticas en el envés de las hojas de tres Brassica rapa y dos Brassica chinensis, y solamente una de las tres de N. tabacum muestra 2-8 pequeñas lesiones necróticas en cada hoja inoculada; estas lesiones son más pequeñas que las típicas producidas por el virus tipo.

En Brassica rapa, además de las lesiones necróticas que se muestran en las hojas más viejas (a los seis-ocho días), aparece un fuerte mosaico en las hojas jóvenes, que es seguido por una necrosis de las venas y la muerte de estas hojas jóvenes en pocos días, lo que lleva a la muerte de la planta.

En Brassica chinensis no aparece dicho mosaico, sino una necrosis de las venas, que a veces sólo ataca una de las hojas jóvenes o medianas, produciendo su deformación.

Hemos repetido estas inoculaciones varias veces a series de plantas iguales a las anteriores: Brassica rapa y chinensis, y N. tabacum y glutinosa, obteniendo siempre resultados análogos, que resumimos a continuación:

Brassica rapa: lesiones necróticas, intervenales, rojas a veces, mosaico, necrosis generalizada.

Brassica chinensis: lesiones necróticas, necrosis de las venas.

Nicotiana tabacum: algunas pequeñas lesiones atípicas en las hojas inoculadas.

Nicotiana glutinosa: no aparece síntoma alguno de infección ni al cabo de dos meses de la inoculación.

Transmisión por insectos.

Empleamos el Mizus persicae Sultz y otro áfido no clasificado, hacemos inoculaciones a una serie de plantas de las mismas especies utilizadas para las inoculaciones con savia. Los resultados son los siguientes: obtenemos infección en los casos de las dos especies de Brassica y en N. tabacum algunas lesiones, pocas, pero algo mayores que

(*) Estirpes obtenidas en Inglaterra ("Rothamsted Exp. Station").

las obtenidas al inocular con savia. En N. glutinosa no obtenemos infección alguna.

Histopatología.

Hacemos algunos arrancamientos de las hojas que presentan necrosis de diferentes tipos y encontramos que en las células no necrosadas aparecen inclusiones intracitoplásmicas que se corresponden exactamente con las encontradas por nosotros estudiando el virus tipo, Anillo negro de la col (Rubio, 1950), o sea, inclusiones de tipo granular y que pasan a fibroso, viéndose que algunas de estas fibras tienen aspecto cristalino (cristales aciculares).

Es de notar la mayor abundancia de estos cristales aciculares en estas inclusiones ahora estudiadas, comparadas con las producidas por el virus tipo.

El tamaño de estas inclusiones llega a ser, a veces, como de 6-8 veces el tamaño del núcleo y, generalmente, rodean a éste hasta taparle completamente. En las inclusiones del virus tipo que pudimos estudiar al microscopio electrónico encontramos que las fibras estaban formadas por partículas de virus, agregadas unas a otras en formación compacta (1950). En este caso no hemos podido comprobarlo por no disponer del aparato de sombreado (Shadow-casting).

Las tinciones las hemos hecho con material fresco, sin fijar y tiñendo

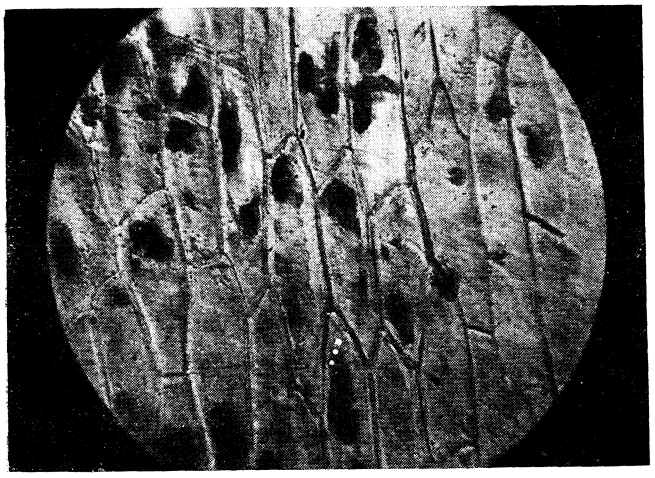


Fig. 1.

durante cinco minutos con floxina al 0,5 por 100. Hemos hecho tinciones iguales con planta sana, no encontrando en ella ningún elemento que se pueda relacionar con las inclusiones observadas en las células de las plantas enfermas (fig. 1).

DISCUSION

Vistas las características sintomatológicas del virus en estudio en estas cuatro especies de plantas empleadas, y comparándolas con la descripción del virus tipo (Tompkins, 1938) y Kenneth Smith en su libro «A textbook of plant virus diseases. London», así como algunos de los ocho virus descritos en Portugal por D'Oliveira y V. Borges, 1945 (1 y 2). Es de notar en este virus en estudio, primero: su incapacidad de infectar **N. glutinosa**, y segundo, los síntomas de una necrosis extremadamente fuerte en Br. rapa y Br. chinensis, así como las muy poco numerosas lesiones necróticas atípicas en N. tabacum, lo que nos haría pensar hasta en la presencia de un virus diferente del Anillo negro de la col, pero la producción de los típicos anillos necróticos en Brassica oleracea L. y sobre todo la formación de inclusiones intracitoplásmicas típicas de dichos virus, que son perfectamente diferenciables de las inclusiones producidas por otros virus de crucíferas en las células de sus huéspedes (Rubio Huertos, 1950), así como la abundancia de estirpes diferentes de un mismo virus que se presenta en la naturaleza tratándose de virus de vegetales; nos lleva a la conclusión de que se trata de una estirpe hasta ahora no descrita del virus del Anillo negro de la col («Cabbage Black ring», Brassica virus 1).

Es de resaltar la importancia y la sencillez para la clasificación genérica (en el caso de virus de crucíferas) del estudio de las inclusiones intracelulares, dato hasta ahora no tenido en cuenta por ningún autor y que creemos del mayor interés.

RESUMEN

Se estudia un virus aislado de Brassica oleracea L. que por su sintomatología sobre cinco especies de plantas y el estudio de su histología podemos clasificar como una nueva estirpe del virus Anillo negro de la col.

Se señala la importancia y significación de las inclusiones intracelulares para su reconocimiento.

BIBLIOGRAFIA

(1) **OLIVEIRA, M. L. D., e BORGES (M. L.).**—1944. Estudo dos virus das Crucíferas 11 Estirpes isoladas de Mattiola incana R. Br. **Bol. Soc. Brot.** 19 (2. S): 265-272.

(2) **OLIVEIRA, M. L. D., e BORGES, M. L.**—1945. Estudo dos virus das Cruciferas 111 Estirpes isoladas de Brassica oleracea L. **Agron. Lusitana.** 7: 317-335.

(3) **RUBIO HUERTOS, M.**—1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. **Microb. Espań.** 3: 207-231.

(4) **SMITH, K. M.**—1937. A texbook of plant virus diseases. London. Churchill Ltd.

(5) **TOMPKINS,C. M.**, and **THOMAS, H. R.**—1938. Black Ring a virus diseases of cabbage and other crucifers. **J. Agric. Res.** 57: 929-943.

INFORMACION

ACTAS DE LA SOCIEDAD

MADRID

Acta de la sesión celebrada el día 23 de marzo de 1953.

Bajo la presidencia de don Antonio Ruiz Falcó, se abre la sesión a las veinte horas, en un salón de los locales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, sitos en Duque de Medinaceli, 4.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. Son admitidos como nuevos socios don Carlos Ramírez Gómez, Doctor en Ciencias Naturales, de Madrid, presentado por don Arnaldo Socías y don Jaime del Campo, y don Faustino Valcárcel Sánchez, Doctor en Veterinaria, de Buenos Aires, presentado por don Jacinto Megías y don José García Bengoa.

Don Manuel Moreno presenta una comunicación con el título «Sobre la aparición del género Bordetella en el «Bergey's Manual».

Don Carlos Ramírez da lectura a las siguientes comunicaciones:

«Introducción de una modificación al método de Wickerham para la determinación cuantitativa de la fermentación de la rafinosa por las levaduras».

«Una nueva especie de Sporotrichum: el Sporotrichum sanguineum».

«Contribución a la tinción de ascosporas y clamidosporas de levaduras».

«Estudios sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos».

Don Miguel Rubio lee su trabajo «Estudio de una nueva estirpe de Brassica virus L. y sus inclusiones intracelulares».

Por último, el señor Presidente se dirige a la reunión invitando a los socios a enviar a la Secretaría de la Sociedad, y con la mayor rapidez, los trabajos que deseen presentar al próximo Congreso Internacional de Microbiología.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las veintiuna horas.

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE ARTICULOS DE REVISTAS

Bajo este epígrafe se efectúa la publicación sistemática, por orden cronológico, de los títulos de los trabajos que han aparecido en los últimos años en las principales revistas microbiológicas. En este número se recogen los títulos correspondientes a los tomos 57 y 58 (1949) de **Journal of Bacteriology** (Biblioteca del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.—I. E.).

Mediante convenio con el Servicio de Microfilm del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, **Microbiología Española** puede facilitar a los suscriptores reproducciones de los artículos que deseen, para lo cual bastará escribir a la Redacción de la Revista, Serrano, 113 ó 152, Madrid, precisando el número en negrita que encabeza el artículo cuya copia se solicita.

Los precios y condiciones se detallan al final de esta Sección.

3.293

SCHUHARDT (V. T.), RODE (L. J.), FOSTER (J. W.) and **GLENDA OGLESBY.** 1949. An Antibrucella factor in peptones. **Journal of Bacteriology.** 57: 1-8. I. E.

3.294

PRATT (Robertson) and **DUFRENOY (Jean).**—1949. Cytochemical Mechanims of penicillin action. VIII.—Involvement of ribonucleic acid derivatives. **Journal of Bacteriology.** 57: 9-13. I E.

3.295

REESE (Elwyn), SANDERSON (Katheryn), WOODWARD (Roland) and **EISENBERG (G. M.).**—1949. Variation and mutation in penicillium chrysogenum, wis Q176. **Journal of Bacteriology.** 57: 15-21. I. E.

3.296

KNAYSI (Georges) and **HILLIER (James).**—1949. Preliminary observations on the germination of the endospore in bacillus Megatherium and the structure of the spore coat. **Jornal of Bacteriology.** 57: 23-29. I. E.

3.297

FLORMAN (Alfred L.).—1949. The agglutination of human erythrocytes modified by treatment with newcastle disease ond influenza virus. **Jornal of Bacteriology.** 57: 31-38. I. E.

3.298

GUTHRIE (Robert).—1949. Studies of a purine-requiring mutant strain of escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 57: 39-46. I. E.

3.299

MILLER (Catherine R.) and **ELSON (William O.).**—1949. Dithiocarbamic acid derivatives. I.—The relation of chemical structure to in vitro antibacterial and antifungal activity against human pathogens. **Journal of Bacteriology.** 57: 47-54. I. E.

3.300

SEGAL (William) and **WILSON (P. W.).**—1949. Hydroxylamine as a source of nitrogens for azotobacter vinelandii. **Journal of Bacteriology.** 57: 55-60. I. E.

3.301

DOETSCH (Raymond N.) and **PELCZAR (Michael J.).**—1949. The Microbacteria. II.—The growth of microbacterium lacticum in a chemically defined medium. **Journal of Bacteriology.** 57: 61-62. I. E.

3.302

JOHNSON (Charles W.), WEST (Harold D.), JONES (Hessie L.) and **LONG (Carolyne J.).**—1949 Biocerin: an antibiotic produced by bacillus cereus. **Journal of Bacteriology.** 57: 63-65. I E.

3.303

HARRIS (J. O.) and **PATTY (R. E.).**—1949. Conductivity studies of bacterial suspensions. **Journal of Bacteriology.** 57: 67-71. I. E.

3.304

KELNER (Albert).—1949. Studies on the genetics of antibiotic formation: the induction of antibiotic-forming mutants in actinomycetes. **Journal of Bacteriology.** 57: 73-92. I. E.

3.305

LEVINE (Seymour) and **NOVAK (Milan).**—1949. The Effect of fatty acids on the oxygen uptake of blastomyces dermatitidis. **Journal of Bacteriology.** 57: 93-94. I. E.

3.306

FOUST SPRAGVE (Carolyn) and **BELLAMY (W. D.).**—1949. Micromanometric determination of galactose by differential fermentation using a strain of streptococcus mastitidis. **Journal of Bacteriology.** 57: 95-100. I. E.

3.307

KLUENER (R. G.).—1949. A paper chromatographic method for the quantitative estimation of penicillin entities. **Journal of Bacteriology.** 57: 101-109. I. E.

3.308

PIJPER (Adrianus).—1949. The flagella of spirillum volutans. **Journal of Bacteriology.** 57: 111-118. I. E.

3.309

EAGLE (Harry), FLEISCHMAN (Ralph) and **MUSSELMAN (A. D.).**—1949. The serum concentration of penicillin G in mice rabbits and men after its intramuscular injection in aqueous solution. **Journal of Bacteriology.** 57: 119-126. I. E.

3.310

PELTIER (George L.) and **SCHROEDER (Floyd R.).**—1949. The relation between proteolytic and amylolytic enzyme production by isolates of the bacillus subtilis group. **Journal of Bacteriology.** 57: 127-130. I. E.

3.311

TAKAHASHI (William N.) and **RAWLINS (T. E.).**—1949. The effect of washing frozen mosaic leaves on the length of tobacco mosaic virus particles. **Journal of Bacteriology.** 57: 131-134. I. E.

3.312

BALOWS (Albert) and **JENNISON (M. W.).**—1949. Thermophilic, cellulose-decomposing bacteria from the porcupine. **Journal of Bacteriology.** 57: 135. I. E.

3.313

BRUNER (D. W.) and **MORAN (Alice B.).**—1949. Salmonella canoga-a new type. **Journal of Bacteriology.** *57*: 135-136. I. E.

3.314

ROGERS (L. A.).—1949. An apparatus for the desiccation of cultures. **Journal of Bacteriology.** *57*: 137-140. I. E.

3.315

JONES (Kenneth L.).—1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. **Journal of Bacteriology.** *57*: 141-145. I. E.

3.316

STOKES (J. L.).—1949. Fermentation of glucose by suspensions of escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** *57*: 147-158. I. E.

3.317

LIND (Howard E.) and **ALLAN (Diana).**—1949. The diagnosis of klebsiella pneumoniae (friedlander's bacillus) from the gastrointestinal tract of normal healthy adults. **Journal of Bacteriology.** *57*: 159-162. I. E.

3.318

PENNINGTON (Derrol).—1949. The use of periodate in microbiological staining. **Journal of Bacteriology.** *57*: 163-167. I. E.

3.319

YEGIAN (Diran) and **VANDERLINDE (Robert J.).**—1949. The biological characteristics of streptomycin-dependent mycobacterium ranae. **Journal of Bacteriology.** *57*: 169-178. I. E.

3.320

ZOBELL (Claude E.) and **JOHNSON (Frank H.).**—1949. The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestial and marine bacteria. **Journal of Bacteriology.** *57*: 179-189. I. E.

3.321

McNEIL (Ethel), HINSHAW (W. R.) and **KISSLING (R. E.).**—1949. A study of Borrelia anserina infection (spirochetosis) in Turkeys. **Journal of Bacteriology.** *57*: 191-206. I. E.

3.322

CAVALLITO (Chester J.) and **BAILEY (John Hays).**—1949. An antibacterial principle from centaurea macullosa. **Journal of Bacteriology.** 57: 207-212. I. E.

3.323

SMITH (R. L.), BECK (Jay V.) and **ANDERSON (E. J.).**—1949. The effect of pollen on the sporulation of bacillus larvae (white). **Journal of Bacteriology.** 57: 213-218. I. E.

3.324

STEINHAUS (Hedward A.), HUGHES (Kenneth M.) and **BLOCK WASSER (Harriette).**—1949. Demostration of the granulosis virus of the variegated cutworm. **Journal of Bacteriology.** 57: 219-224. I. E.

3.325

RUCKER (Robert R.), JOHNSON (Harlan E.) and **ORDAL (Erling J.).**—1949. An investigation of the bactericidal action and fish toxicity of two homologous series of quaternary ammonium compounds. **Journal of Bacteriology.** 57: 225-234. I. E.

3.326

OLSON (B. H.) and **JOHNSON (Marvin J.).**—1949. Factors producing high yeast yields in synthetic media. **Journal of Bacteriology.** 57: 235-246. I. E.

3.327

HOBBY (Gladys L.), LENERT (Tulita F.), REED (Wilma) and **RINNE (Dorothy).**—1949. The enhancement of the chemotherapeutic action of penicillin. **Journal of Bacteriology.** 57: 247-252. I. E.

3.328

STARR (Mortimer P.).—1949. The Nutrition of phytopathogenic bacteria. III.—The gram-positive phytopathogenic corynebacterium species. **Journal of Bacteriology.** 57: 253-258. I. E.

3.329

COPE (Elizabeth J.) and **KASPER (Joseph A.).**—1949. A serological study of proteus rettgeri and similar organisms. **Journal of Bacteriology.** 57: 259-264. I. E.

3.330

SAMPTH (Angus) and **LITTLE (Paul).**—1949. Cultivation of trypanosoma cruzi in liquid media. **Journal of Bacteriology.** 57: 265. I. E.

3.331

ZARRET (Arnold J.) and DOETSCH (Raymond N.).—1949. A new selective medium for the cuantitative determination of members of the genus proteus in milk. **Journal of Bacteriology.** 57: 266. I. E.

3.332

BILLEN (Daniel) and LICHSTEIN (Herman C.).—1949. Aspartic acid decarboxylation by rhizobium trifolii. **Journal of Bacteriology.** 57: 267-268. I. E.

3.333

MUÑOZ (J.), SCHERAGO (M.) and WEAVER (R. H.).—1949. A serological of the pseudomonas genus. **Journal of Bacteriology.** 57: 269-278. I. E.

3.334

HAMRE (Dorothy).—1949. The effect of ultrasonic waves upon klebsiella pneumoniae, saccharomyces cerevisiae, miyagawanella felis, and influenza virus A. **Journal of Bacteriology.** 57: 279-295. I. E.

3.335

ANGULO (Juan J.), RICHARDS (Oscar W.) and ROQUE (Agustín L.).—1949. Demonstration of viral inclusion bodies in unstained tissue sections with the aid of the phase microscope. I.—The inclusion bodies of Yellow fever, herpes simpelx, fowl pox, and distemper. **Journal of Bacteriology.** 57: 297- 303. I. E.

3.336

MURRAY (F. J.), TETRAULT (P. A.), KAUFMANN (O. W.), KOFFLER (H.), PETERSON (D. H.) and COLINGSWORTH (D. R.).—1949. Circulin an antibiotic from an organism resembling bacillus circulans. **Journal of Bacteriology.** 57: 305-312. I. E.

3.337

HILLIER (James).—1949. Some remarks on the image contrast in electron microscopy and the two-component objective. **Journal of Bacteriology.** 57: 313-317. I. E.

3.338

HILLIER (James), MUDD (Stuart) and **SMITH (Andrew G.)**.—1949. Internal structure and nuclei in cells of escherichia coli as shown by improved electron microscopic techniques. **Journal of Bacteriology.** 57: 319-338. I. E.

3.339

LEONARD (John M.), and **BLACKFORD (Virginia L.)**.—1949. Fungus-inhibitive properties of bromoacetamides. **Journal of Bacteriology.** 57: 339-347. I. E.

3.340

GAULD (Ross L.), SCHLINGMAN (A. S.), JACKSON (Elizabeth B.), MANNING (Mary C.), BATSON (Herbert C.) and **CAMPBELL (Charlotte C.)**.—1949. Chloramphenicol (chloromycetin) in experimental cholera infections. **Journal of Bacteriology.** 57: 349-452. I. E.

3.341

JOHNSON (Frank H.) and **ZOBELL (Claude E.)**.—1949. The retardation of thermal disinfection of bacillus subtilis spores by hidrostatic pressure. **Journal of Bacteriology.** 57: 353-358. I. E.

3.342

JOHNSON (Frank H.) and **ZOBELL (Claude E.)**.—1949. The aceleration of spore disinfection by urethan and its retardation by hydrostatic pressure. **Journal of Bacteriology.** 57: 359-362. I. E.

3.343

ROBERTS (Richard B.) and **ALDOUS (Elaine)**.—1949. Recovery from ultraviolet irradiation in escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 57: 363-375. I. E.

3.344

SOBEL (H.) and **PLAUT (A.)**.—1949. The assimilation of cholesterol by mycobacterium smegmatis. **Journal of Bacteriology.** 57: 377-382. I. E.

3.345

TEMPLE (Kenneth L.).—1949. A new method for the preparation of silica gel plates. **Journal of Bacteriology.** 57: 383. I. E.

3.346

KLEMME (Dorothea E.) and **POE (Charles F.)**.—1949. The fermentation of alpha-methylglucoside. **Journal of Bacteriology.** 57: 384-385. I. E.

3.347

POE (Charles F.) and **JOHNSON O'KELLY (Ruby).**—1949. The action of phenol-bile media on the genera escherichia and aerobacter. **Journal of Bacteriology.** *57*: 385-386. I. E.

3.348

POE (Charles F.) and **CHARKEY (Lowell W.).**—1949. A study of boric acid media for the separation of escherichia and aerobacter. **Journal of Bacteriology.** *57*: 386-387. I. E.

3.349

BRUNER (D. W.).—1949. The transformation of salmonella oranienburg to salmonella Montevideo. **Journal of Bacteriology.** *57*: 387-388. I. E.

3.350

PARMELEE (C. E.), CARR (P. H.) and **NELSON (F. E.).**—1949. Electron microscope studies of bacteriophage active against streptococcus lactis. **Journal of Bacteriology.** *57*: 391-397. I. E.

3.351

SUGG (John Y.).—1949. An influenza virus pneumonia of mice that is nontransferable by serial passage. **Journal of Bacteriology.** *57*: 399-403. I. E.

3.352

PLUMLEE (Claude H.) and **POLLARD (Arthur L.).**—1949. Studies on bromineoxidizable sulfur-containing compounds in mold metabolism. **Journal of Bacteriology.** *57*: 405-407. I. E.

3.353

MRAK (E. M.), PHAFF (H. J.) and **MACKINNEY (G.).**—1949. A simple test for carotenoid pigments in yeasts. **Journal of Bacteriology.** *57*: 409-411. I. E.

3.354

ROSENBLUM (Eugene D.) and **WILSON (P. W.).**—1949. Fixation of isotopic nitrogen by clostridium. **Journal of Bacteriology.** *57*: 413-414. I. E.

3.355

MAASS (Eleanor A.) and **JOHNSON (Marvin J.).**—1949. Penicillium uptake by bacterial cells. **Journal of Bacteriolgy.** *57*: 415-422. I. E.

3.356

DOUDOROFF (Michael), WIAME (J. M.) and WOLOCHOW (H.).—1949. Phosphorolysis of sucrose by pseudomonas putrefaciens. **Journal of Bacteriology.** 57: 423-427. I. E.

3.357

SAVAGE (George M.).—1949. Improvement in streptomycin-producing strains of streptomyces griseus by ultraviolet and X-ray energy. **Journal of Bacteriology.** 57: 429-441. I. E.

3.358

MacPHERSON (Catherine F. C.), ALEIXANDER (Hattie E.) and LEIDY (Grace).—1949. Quantitative determination, in type-specific antisera to hemophilus influenzae, of the antibody that cross-reacts with encapsulated pneumococci. **Journal of Bacteriology.** 75: 443-446. I. E.

3.359

HENRY (Richard J.), HOUSEWRIGHT (Riley D.) and BERKMAN (Sam).—1949. Studies on streptomycin. VI.—The effect of streptomycin on the metabolism of multiplying bacteria. **Journal of Bacteriology.** 57: 447-451. I. E.

3.360

STEENKEN (W.) (jr.) and WOLINSKY (E.).—1949. The tuberculostatic effect of subtilin in vitro and in vivo. **Journal of Bacteriology.** 57: 453-457. I. E.

3.361

GRAESSLE (Otto E.) and PIETROWSKI (Joseph J.).—1949. The in vitro effect of para-aminosalicylic acid (pas) in preventing acquired resistance to streptomycin by micobacterium tuberculosis. **Journal of Bacteriology.** 57: 459-464. I. E.

3.362

CLARK (F. M.).—1949. Some nitrogen requirements of clostridium thermosaccharolyticum. **Journal of Bacteriology.** 57: 465-471. I. E.

3.363

GILMORE (Eleanor L.) and SPRINCE (Herbert).—1949. The growth of human pleuropneumonialike organisms in a simplified fluid medium. **Journal of Bacteriology.** *57*: 473-474. I. E.

3.364

RITTER (H.).—1949. A method for cultivating h e m o p h i l u s i n f l u e n z a e. **Journal of Bacteriology.** *57*: 474-475. I. E.

3.365

STEINKRAUS (Keith H.) and AYRES (John C.).—1949. A slide-cover-glass method for cultivating and couting anaerobes. **Journal of Bacteriology.** *57*: 475-476. I. E.

3.366

KLOTZ (I. M.) and MELLODY (Margaret).—1949. The inhibition of growth of e s c h e r i c h i a c o l i by some derivatives of urea. **Journal of Bacteriology.** *57*: 477-481. I. E.

3.367

SCHNEIERSON (S. Stanley) and TOHARSKY (Beatrice).—1949. A method for the determination of aureomycin in the blood. **Journal of Bacteriology.** *57*: 483-486. I. E.

3.368

WELSHIMER (H. J.) and ROBINOW (C. F.).—1949. The lysis of b a c i l l u s m e g a t h e r i u m by lysozyme. **Journal of Bacteriology.** *57*: 489-499. I. E.

3.369

BOAND (Arthur) and NOVAK (Milan).—1949. Sensitivity changes of actinomyces bovis to penicillin and streptomycin. **Journal of Bacteriology.** *57*: 501-508. I. E.

3.370

EMMART (E. W.), KISSLING (R. E.) and STARK (T. H.).—1949. The tuberculostatic action of nocardia extracts in white mice. **Journal of Bacteriology.** *57*: 509-514. I. E.

3.371

GROUPE (Vicent) and WINN (John D.).—1949. The characteristics of an agent morphologically resembling the chlamydozoaceae and causing sinusitis in turkeys. **Journal of Bacteriology.** *57*: 515-528. I. E.

3.372

DIENES (L.).—1949. The development of proteus culture in the presence of penicillin. **Journal of Bacteriology.** 57: 529-546. I. E.

3.373

VAN ESELTINE (William P.) and RAHN (Otto).—1949. The effect of temperature upon bacteriostasis. **Journal of Bacteriology.** 57: 547-554. I. E.

3.374

UPDEGRAFF (David M.).—1949. The production of phenol and para-cresol by marine bacteria. **Journal of Bacteriology.** 57: 555-564. I. E.

3.375

NEWCOMBE (Howard B.) and HAWIRKO (Roma).—1949. Spontaneous mutation to streptomycin resistance and dependence in escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 57: 565-572. I. E.

3.376

TOBIE (Walter C.) and JONES (Mary J.).—1949. Para-aminosalicylic acid in the metabolism of bacteria. **Journal of Bacteriology.** 57: 573. I. E.

3.377

BROWN (J. Howard) and KOCH (Marie L.).—1949. A transparent agar medium for growing neisseria gonorrhoeae. **Journal of Bacteriology.** 57: 574. I. E.

3.378

ATKIN (Lawrence), MOSES (William) and GRAY (Philip P.).—1949. The preservation of yeast cultures by lyophilization. **Journal of Bacteriology.** 57: 575-578. I. E.

3.379

AJL (Samuel J.) and WERKMAN (C. H.).—1949. On the mechanism of carbon dioxide replacement in heterotrophic metabolism. **Journal of Bacteriology.** 57: 579-593. I. E.

3.380

ABDEL-HAMID FARGHALY (Helma Miller) and McELROY (William D.).—1949. Factors influencing the recovery of biochemical mutans in luminous bacteria. **Journal of Bacteriology.** 57: 595-602. I. E.

3.381

BERRY (Joe J.), STARR (Robert W.), III, and HALLER (Evelyn C.).—1949. The effect of surface-active agents on phagocytosis. **Journal of Bacteriology.** *57*: 603-611. I. E.

3.382

FOSTER (Jackson W.) and HEILIGMAN (Fred).—1949. Mineral deficiencies in complex organic media as limiting factors in the sporulation of aerobic bacilli. **Journal of Bacteriology.** *57*: 613-615. I. E.

3.383

BOROFF (Daniel A.).—1949. Study on toxins and antigens of shigella dysenteriae. I.—Toxicity and antigenicity of whole organisms and various fractions of shigella dysenteriae. **Journal of Bacteriology.** *57*: 617-632. I. E.

3.384

EWING (William H.).—1949. Shigella nomenclature. **Journal of Bacteriology.** *57*: 633-638. I. E.

3.385

FOSTER (Jackson W.) and HEILIGMAN (Fred).—1949. Biochemical factors influencing sporulation in a strain of bacillus cereus. **Journal of Bacteriology.** *57*: 639-646. I. E.

3.386

PUCK (Theodore T.).—1949. A reversible transformation of T1 bacteriophage. **Journal of Bacteriology.** *57*: 647-655. I. E.

3.387

PLASTRIDGE (W. N.), WILLIAMS (L. F.) and ROMAN (Jeanne).—1949. An improved method for the preparation of vibrio foetus agglutination antigen. **Journal of Bacteriology.** *57*: 657-658. I. E.

3.388

BARTHOLOMEW (James W.) and RITTENBERG (S. C.).—1949. Thermophilic bacteria from deep ocean bottom cores. **Journal of Bacteriology.** *57*: 658. I. E.

3.389

EWING (William H.).—1949. The relationship of bacterium anitratum and members of the tribe mimeae (De Bord). **Journal of Bacteriology.** *57*: 659. I. E.

3.390

SCHERP (Henry W.) and FITTING (Charlotte).—1949. The growth of neisseria meningitidis in simple chemically defined media. **Journal of Bacteriology.** 58: 1-9. I. E.

3.391

SACKS (L. E.) and BARKER (H. A.).—1949. The influence of oxigen on nitrate and nitrite reduction. **Journal of Bacteriology.** 58: 11-22. I.E.

3.392

GROUPE (Vincent).—1949. Demonstration of an interference phenomenon associated with infectious bronchitis virus (IBV) of chickens. **Journal of Bacteriology.** 58: 23-32. I. E.

3.393

CHANG (Wei-schen) and PETERSON (W. H.).—1949. Factors affecting the biotin content of yeasts. **Journal of Bacteriology.** 58: 33-44. I. E.

3.394

STANIER (R. Y.) and TSUCHIDA (Martha).—1949. Adaptive enzymatic patterns in the bacterial oxidation of tryptophan. **Journal of Bacteriology.** 58: 45-60. I. E.

3.395

BLISS (Eleanor A.) and TODD (H. Patricia).—1949. A comparison of eight antibiotic agents, in vivo and in vitro. **Journal of Bacteriology.** 58: 61-72. I. E.

3.396

HUANG (Chi-To) and EATON (Monroe D.).—1949. The reversal by paba of sulfonamide inhibition of the viruses of lymphogranuloma venereum and mouse pheumonitis. **Journal of Bacteriology.** 58: 73-88. I. E.

3.397

LUDWIG (Ernest H.) and HUTCHINSON (W. G.).—1949. Aserological study of selected species of actinomycetes. **Journal of Bacteriology.** 58: 89-101. I. E.

3.398

BARKULIS (Ingebjorg Lid).—1949. Growth inhibition of eberthella typhosa by certain carbohydrates and its release my mutation. **Journal of Bacteriology.** 58: 103-109. I. E.

3.399

EDWARDS (P. R.) and HERMANN (G. J.).—1949. Two new salmonella types: Salmonella corvallis and salmonella colorado. **Journal of Bacteriology.** 58: 111-112. I. E.

3.400

YAGER (Robert H.), OLITSKY (Peter K.) and LAHELLE (O.).—1949. Additional properties of the mefl strain of poliomyelitis virus, especially with reference to attempts at cultivation in the chick embryo. **Journal of Bacteriology.** 58: 112-113. I. E.

3.401

CLEVERDON (Robert C.), PELCZAR (Michael J.) jr. and DOETSCH (Raymond N.).—1949. Vitamin requirements of bacillus coagulans. **Journal of Bacteriology.** 58: 113-114. I. E.

3.402

BUNTING (Mary I.), ROBINOW (Carl F.) and BUNTING (Henry).—1949. Factors affecting the elaboration of pigment and polysaccharide by serratia marcescens. **Journal of Bacteriology.** 58: 114-115. I. E.

3.403

GARSON (Warfield), McLEOD (Charlotte), TETRAULT (P. A.), KOFFLER (H.), PETERSON (D. H.) and COLINGSWORTH (D. R.).—1949. On the naming two antibiotics from members of the bacillus circulans group: circulin and polypeptin. **Journal of Bacteriology.** 58: 115-116. I. E.

3.404

SCHATZ (Albert), SAVARD (Kenneth) and PINTNER (Irma J.).—1949. The ability of soil microorganisms to decompose steroids. **Journal of Bacteriology.** 58: 117-125. I. E.

3.405

VERWEY (W. F.), THIELE (Elizabeth H.), SAGE (Dorothy N.) and SCHUCHARDT (Lee F.).—1949. A simplified liquid culture medium for the growth of hemophilus pertussis. **Journal of Bacteriology.** 58: 127-134. I. E.

3.406

WHITESIDE-CARLSON (Virginia) and **CARLSON (Warner W.)**.—1949. The vitamin requirements of leuconostoc for dextran synthesis. **Journal of Bacteriology.** 58: 135-141. I. E.

3.407

WHITESIDE-CARLSON (Virginia) and **CARLSON (Warner W.)**. — 1949. Studies of the effect of para-aminobenzoic acid, folic acid, and sulfanilamide on dextran synthesis by leuconostoc. **Journal of Bacteriology.** 58: 143-149. I. E.

3.408

FRIEDBERG (Felix) and **WEBB (Arthur H.)**.—1949. The uptake of C^{14} carboxyl-labeled glycine into the protein of torula utilis. **Journal of Bacteriology.** 58: 151-152. I. E.

3.409

HEDEN (Carl-Göran) and **WYCKOFF (Ralph W. G.)**.—1949. The electron Microscopy of heated bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 153-160. I. E.

3.410

MIGAKI (Hoyo) and **McCULLOCH (Ernest C.)**.—1949. Survivor curves of bacteria exposed to surface-active agents. **Journal of Bacteriology.** 58: 161-169. I. E.

3.411

ENGLESBERG (Ellis) and **STANIER (R. Y.)**.—1949. The relationship between growth and mutation in pseudomonas fluorescens. **Journal of Bacteriology.** 58: 171-180. I. E.

3.412

RYAN (Francis J.) and **SCHNEIDER (Lillian K.)**.—1949. The consequences of mutation during the growth of biochemical mutants of escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 58: 181-189. I. E.

3.413

RYAN (Francis J.) and **SCHNEIDER (Lillian K.)**.—1949. The consequences of mutation during the growth of biochemical mutants of escherichia coli. III.—The inhibitions of histidine-Independent bacteria by histidineless bacteria in aerated cultures. **Journal of Bacteriology.** 58: 191-200. I. E.

3.414

RYAN (Francis J.) and SCHNEIDER (Lillian K.).—1949. The consequences of mutation during the growth of biochemical mutants of escherichia coli. IV.—The mechanism of inhibition of histidine-independent bacteria by histidineless bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 201-213. I. E.

3.415

BILLEN (Daniel) and LICHESTEIN (Herman C.).—1949. Studies on the aspartic acid decarboxylase of rhizobium trifolii. **Journal of Bacteriology.** 58: 215-221. I. E.

3.416

POPE (Hilda).—1949. Growth inhibition of tubercle bacilli by analogues of phenylalanine. **Journal of Bacteriology.** 58: 223-228. I. E.

3.417

WAKSMAN (Selman A.), FRANKEL (Jack) and GRAESSLE (Otto).—1949. The in vivo activity of neomycin. **Journal of Bacteriology.** 58: 229-237. I. E.

3.418

GEST (Howard) and KAMEN (Martin D.).—1949. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. IV.—Photochemical production of molecular hydrogen by growing cultures of photosynthetic bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 239-245. I. E.

3.419

YOUMANS (Guy P.) and YOUMANS (Anne Stewart).—1949. A method for the determination of the rate of growth of tubercle bacilli by the use of small inocula. **Journal of Bacteriology.** 58: 247-255. I. E.

3.420

YEGIAN (Diran), BUDD (Vera) and VANDERLINDE (Robert J.).—1949. Streptomycin-dependent tubercle bacilli: A simple method for isolation. **Journal of Bacteriology.** 58: 257-259. I. E.

3.421

CLAPPER (William E.) and HEATHERMAN (Mary E.).—1949. Strain differences in oral lactobacilli and the relation to dental caries. **Journal of Bacteriology.** 58: 261-268. I. E.

3.422

ENY (Desire M.).—1949. Amino acids in healthy chlorella cells. **Journal of Bacteriology.** 58: 269-270. I. E.

3.423

SIGURDSSON (Björn) and**TRYGGVADOTTIR (Anna G.).**—1949. Immunization with heat-killed mycobacterium paratuberculosis in mineral oil. **Journal of Bacteriology.** 58: 271-278. I. E.

3.424

SPAULDING (Earle H.), MADAJEWSKI (Dorothy S.), ROWE (Robert J.) and BACON (Harry E.).—1949. The effect of orally administered streptomycin and sulfathalidine upon the bacterial flora of the colon. **Journal of Bacteriology.** 58: 279-289. I. E.

3.425

BRAUN (Werner).—1949. Studies on bacterial variation and selective environments. I.—The nature of the selective serum factor affecting the variation of brucella abortus. **Journal of Bacteriology.** 58: 291-297. I. E.

3.426

BRAUN (Werner).—1949. Studies on bacterial variation and selective environments. II.—The effects of sera from brucella-infected animals and from normal animals of different species upon the variation of brucella abortus. **Journal of Bacteriology.** 58: 299-305. I. E.

3.427

JONES (W. Grover), POLLARD (Arthur L.) and HOLTMAN (D. Frank).—1949. Variations in normal and brucella-immune rabbit serum as determined by paper-partition chromatography. **Journal of Bacteriology.** 58: 307-311. I. E.

3.428

LINDSTROM (Eugene S.), BURRIS (R. H.) and WILSON (P. W.).—1949. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 313-316. I. E.

3.429

MORSE (M. L.) and CARTER (C. E.).—1949. The synthesis of nucleic acids in cultures of escherichia coli, strains B and B/R. **Journal of Bacteriology.** 58: 317-326. I. E.

3.430

GORDON (Ruth E.) and SMITH (Nathan R.).—1949. Aerobic sporeforming bacteria capable of growth at high temperatures. **Journal of Bacteriology.** 58: 327-341. I. E.

3.431

THOMPSON (John H.) jr. and DODD (Matt C.).—1949. The properties of formaldehyde-resistant corynebacterium diphtheriae. **Journal of Bacteriology.** 58: 343-346. I. E.

3.432

BARTHOLOMEW (James W.), EVANS (E. Edward) and NIELSON (Eldon D.).—1949. The effect of esterification of protein carboxyl groups on the staining of bacterial cells. **Journal of Bacteriology.** 58: 347-350. I. E.

3.433

MURRAY (R. G. E.) and ELDER (R. H.).—1949. The predominance of counterclockwise rotation during swarming of bacillus species. **Journal of Bacteriology.** 58: 351-359. I. E.

3.434

MAASS (Eleanor A.) and JOHNSON (Marvin J.).—1949. The relations between bound penicillin and growth in staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology.** 58: 361-366. I. E.

3.435

DANZ (Frances J.) and SCHULTZ (Edwin W.).—1949. Gelatinous variants of pseudomonas aeruginosa. **Journal of Bacteriology.** 58: 367-378. I. E.

3.436

HERBST (Edward J.) and SNELL (Esmond E.).—1949. The nutritional requeriments of hemophilus parainfluenzae 7901. **Journal of Bacteriology.** 58: 379-386. I. E.

3.437

BOROFF (Daniel A.) and MACRI (Beatrice P.).—1949. Study toxins and antigens of shigella dysenteriae. II.—Active protection of shigella dysenteriae. **Journal of Bacteriology.** 58: 387-394. I. E.

3.438

DELWICHE (Eugene A.).—1949. Vitamin requirements of the genus propionibacterium. **Journal of Bacteriology.** 58: 395-398. I. E.

3.439

SUGG (John Y.).—1949. The variation of antigenic pattern and of mouse virulence in an influenza virus culture. **Journal of Bacteriology.** 58: 399-406. I. E.

3.440

DeSPAIN SMITH (Louis) and CARDNER (Mary Virginia).—1949. The occurrence of vegetative cells of clostridium perfingens in soil. **Journal of Bacteriology.** 58: 407-408. I. E.

3.441

DUCHOW (Esther) and **DOUGLAS (H. C.).**—1949. Rhodomicrobium vannielii, a new photoheterotrophic bacterium. **Journal of Bacteriology.** 58: 409-416. I. E.

3.442

McLEAN (Dorothy J.) and **FISHER (Kenneth C.).**—1949. The extra oxygen consumed during growth of serratia marcescens as a function of the carbon and nitrogen sources and of temperature. **Journal of Bacteriology.** 58: 417-428. I. E.

3.443

JETER (Wayburn S.) and **WYNNE (E. Staten).**—1949. Acid fuchsin methylene blue agar: a new differential medium for enteric bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 429-432. I. E.

3.444

CUSHING (John E.), SCHWARTZ (Martin) and **BENNETT (Rhona).**—1949. Altered responses of neurospora crassa to inhibiting concentrations of indole. **Journal of Bacteriology.** 58: 433-442. I. E.

3.445

KNOX (W. E.), AUERBACH (V. H.), ZARUDNAYA (K.) and **SPIRTES (M.).**—1949. The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes. **Journal of Bacteriology.** 58: 443-452. I. E.

3.446

RICHARDS (Oscar W.).—1949. Some fungous contaminants of optical instruments. **Journal of Bacteriology.** 58: 453-455. I. E.

3.447

DUNLOP (Stuart G.).—1949. The synthesis of amino acids by escherichia coli in pure cultures. **Journal of Bacteriology.** 58: 457-462. I. E.

3.448

HUTTON (William E.) and ZOBELL (Claude E.).—1949. The occurrence and characteristics of methaneoxidizing bacteria in marine sediments. **Journal of Bacteriology.** 58: 463-473. I. E.

3.449

EAGLE (Harry) and MUSSELMAN (Arlyne D.).—1949. The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. **Journal of Bacteriology.** 58: 475-490. I. E.

3.450

WAGNER (Robert R.).—1949. Nonspecific inhibition of the lecithinase activity of type a clostridium welchii toxin. **Journal of Bacteriology.** 58: 491-496. I. E.

3.451

EWING (William H.).—1949. The relationship of shigella dispar to certain coliform bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 497-500 I. E.

3.452

ZINSSER (Hans H.) and WILLIAMS (William J.).—1949. Fibrinolysis in gram-negative bacilli. **Journal of Bacteriology.** 58: 501-509. I. E.

3.453

KELNER (Albert).—1949. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated escherichia coli, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. **Journal of Bacteriology.** 58: 511-522. I. E.

3.454

CLEVERDON (Robert C.), PELCZAR (Michael J.)jr. and DOETSCH (Raymond N).—1949. The vitamin requirements of stenothermophilic aerobic sporogenous bacilli. **Journal of Bacteriology.** 58: 523-526. I. E.

3.455

HANSON (F. R.) and EBLE (T. E.).—1949. An anthiphage agent isolated from aspergillus Sp. **Journal of Bacteriology.** 58: 527-529. I. E.

3.456

SHAPIRO (S. K.) and SARLES (W. B.).—1949. Microorganisms in the intestinal tract of normal chickens. **Journal of Bacteriology.** 58: 531-544. I. E.

3.457

GALTON (Mildred M.) and STUART (C. A.).—1949. A pooled paracolobactrum intermedium antiserum for screening in enteric bacteriology. **Journal of Bacteriology.** 58: 545-546. I. E.

3.458

FITE PAINE (Thomas)jr. and LIPMANN (Fritz).—1949. No antistreptomycin activity shown by inositol phospholipids. **Journal of Bacteriology.** 58: 547. I. E.

3.459

POWELL (Mary E.).—1949. A simplified method for sealing petri dishes. **Journal of Bacteriology.** 58: 548. I. E.

3.460

SCHAEFER (Werner B.), MARSHAK (Alfred) and BURKHART (Blanche).—1949. The growth of mycobacterium tuberculosis as a function of its nutrients. **Journal of Bacteriology.** 58: 549-563. I. E.

3.461

LICHSTEIN (Hernan C.) and CHRISTMAN (John F.).—1949. The nature of the coenzyme of aspartic acid, serine, and threonine deaminases. **Journal of Bacteriology.** 58: 565-572. I. E.

3.462

WEDBERG (Stanley E.), BRANDT (Carl D.) and HELMBOLDT (Charles F.).—1949. The passage of microorganisms through the digestive tract of blaberus cranifed mounted under controlled conditions. **Journal of Bacteriology.** 58: 573-578. I. E.

3.463

BELCHER (M. Ruth) and LICHSTEIN (Herman C.).— 1949. Growth promortion and antibiotin effect of homobiotin and norbiotin. **Journal of Bacteriology.** 58: 579-583. I. E.

3.464

GOTS (Joseph S.) and SEVAG (M. G.).—1949. Antagonism to sulfathiazole by methylene blue and riboflavin in pneumococcal respiration. **Journal of Bacteriology.** 58: 585-593. I. E.

3.465

LEIN (Joseph) and **LEIN (Patricia S.)**.—1949. Studies on a neurospora mutant requiring unsaturated fatty acids for growth. **Journal of Bacteriology.** 58: 595-599. I. E.

3.466

CHERRY (William B.) and **WATSON (Dennis W.)**.—1949. The streptococcus lactis host-virus system. I.—Factors influencing quantitative measurement of the virus. **Journal of Bacteriology.** 58: 601-610. I. E.

3.467

CHERRY (William B.) and **WATSON (Dennis W.)**.—1949. The streptococcus lactis host-virus system. II.—Characteristics of virus growth and the effect of electrolytes on virus adsorption. **Journal of Bacteriology.** 58: 611-620. I. E.

3.468

MILER (Ruth E.), PASTERNAK (Varsenig Z.) and **SEVAG (M. G.)**.—1949. Inhibition of yeast hexokinase by homologous antiserum. **Journal of Bacteriology.** 58: 621-625. I. E.

3.469

EHRLICH (H. L.) and **WATSON (D. W.)**.—1949. Lysogenesis of bacillus megatherium. **Journal of Bacteriology.** 58: 627-632. I. E.

3.470

NIVEN (C. F.)jr., CASTELLANI (A. G.) and **ALLANSON (Virginia)**.—1949. A study of the lactio acid bacteria that cause surface discolorations of sausages. **Journal of Bacteriology.** 58: 633-641. I. E.

3.471

BARNES (Frederick W.) and **CARROLL (Marguerite D.)**.—1949. Chemical detoxification of flexner dysentery antigen. III.—A mouse test to measure toxicity relative to antigenicity. **Journal of Bacteriology.** 58: 643-651. I. E.

3.472

PEARSON (W. N.).—1949. A purine-requiring strain of photobacterium fischeri. **Journal of Bacteriology.** 58: 653-657. I. E.

3.473

RUCKER (Robert R.).—1949. A streptomycete pathogenic to fish. **Journal of Bacteriology.** 58: 659-664. I. E.

3.474

SCHUHARDT (V. T.), RODE (L. J.) and OGLESBY (Glenda).—1949. The toxicity of certain amino acids for b r u c e l l a e. **Journal of Bacteriology.** 58: 665-674. I. E.

3.475

JOHNSON (Frank H.) and GRAY (David H.).—1949. Nuclei and large bodies of luminous bacteria in relation to salt concentration, osmotic pressure, temperature, and urethane. **Journal of Bacteriology.** 58: 675-688. I. E.

3.476

SHAPIRO (S. K.), RHODES (R. A.) and SARLES (W. B.).—1949. L a c t o - b a c i l l i in the intestinal tract of the chicken. **Journal of Bacteriology.** 58: 689-694. I. E.

3.477

MORAN (Alice B.) and BRUNER (D. W.).—1949. Further studies on the bethesda group of paracolon bacteria. **Journal of Bacteriology.** 58: 695-700. I. E.

3.478

PETERSON (Merlin H.) and JOHNSON (Marvin J.).—1949. Delayed hydrolysis of butterfat by certain l a c t o b a c i l l i and m i c r o c o c c i isolated from cheese. **Journal of Bacteriology.** 58: 701-708. I. E.

3.479

ROBERTS (Irena Z.), ROBERTS (R. B.) and ABELSON (P. H.).—1949. Effect of vitamin B_{12} on the phosphorus metabolism of l a c t o b a c i l l u s l e i c h m a n n i i. **Journal of Bacteriology.** 58: 709-712. I. E.

3.480

COLEMAN (Marion B.).—1949. Unusual strains of diphtheria bacilli from throat cultures. **Journal of Bacteriology.** 58: 712-713. I. E.

3.481

RAHN (Otto) and LEET (Merwin).—1949. Adaptive enzymes induced by insoluble substrates. **Journal of Bacteriology.** 58: 714-715. I. E.

3.482

DAVISON (Marjorie Moira), DEROW (Matthew A.) and WALKER (Burnham S).—1949. Staphylococcal hyaluronidase. **Journal of Bacteriology.** 58: 717-722. I. E.

3.483

COCHRANE (Vicent W.) and **DIMMICK (Isabel).**—1949. The metabolism of species of streptomyces. I.—The formation of succinic and other acids. **Journal of Bacteriology.** 58: 723-730. I. E.

3.484

SMOLELIS (A. N.) and **HARTSELL (S. E.).**—1949. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology.** 58: 731-736. I. E.

3.485

TANNER (F. W.)jr., VOJNOVICH (C.) and **VAN LANEN (J. M.).**—1949. Factors affecting riboflavin production by ashbya gossypii. **Journal of Bacteriology.** 58: 737-745. I. E.

3.486

OGINSKY (Evelyn L.), SMITH (Patricia H.) and **UMBREIT (Wayne W.).**—1949. The action of streptomycin. I.—The nature of the reaction inhibited. **Journal of Bacteriology.** 58: 747-759. I. E.

3.487

SMITH (Patricia H.), OGINSKY (Evelyn L.) and **UMBREIT (Wayne W.).**—1949. The action of streptomycin. II.—The metabolic properties of resistant and dependent strains. **Journal of Bacteriology.** 58: 761-767. I. E.

3.488

UMBREIT (Wayne W.) and **TONHAZY (N. E.).**—1949. The action of Streptomycin. III.—The action of streptomycin in tissue homogenates. **Journal of Bacteriology.** 58: 769-776. I. E.

3.489

REID (J. Douglas).—1949. The influence of the vitamin B complex on the growth of torulopsis (cryptococcus) neoformans on a synthetic medium. **Journal of Bacteriology.** 58: 777-782. I. E.

3.490

COHEN (Sidney).—1949. Stimulation of the growth of a strain of corynebacterium diphtheriae by polyvinyl alcohol. **Journal of Bacteriology.** 58: 783-790. I. E.

3.491

SHRIGLEY (Edward W.) and **MACULLA (Esther S.).**—1949. Characterization of the agglutinating principle in chorioallantoic fluid responsible for the clumping of certain strains of staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology.** 58: 791-802. I. E.

3.492

SMITH (Grant N.), WORREL (Cecilia S.) and **SWANSON (Ann L.).**—1949. Inhibition of bacterial esterases by chloramphenicol (chloromycetin). **Journal of Bacteriology.** 58: 803-809. I. E.

3.493

SCHADES (Arthur L.).—1949. Cobalt and bacterial growth, with special reference to proteus vulgaris. **Journal of Bacteriology.** 58: 811-822. I. E.

3.494

CHAPMAN (George H.).—1949. Comparison of ludlam's medium with staphylococcus medium number 110 for the isolation of staphylococci that blood. **Journal of Bacteriology.** 58: 823. I. E.

3.495

WILLIAMS (O. B.) and **REES (H. B.)jr.**—1949. Bacterial utilization of anionic surface-active agents. **Journal of Bacteriology.** 58: 823-824. I. E.

Fotocopias en microfilm.

Microfilm negativo: cada fotograma (24 × 36 mm.), 1 peseta.

Microfilm positivo (indicado cuando hay fotograbados): cada fotograma, 2 pesetas.

Carpeta «Filmoteca» para diez filmofichas: 2 pesetas.

Mínimo pagable en todo encargo: el valor de una filmoficha, 5 pesetas en negativo y 10 pesetas en positivo.

A partir de 1.000 fotogramas, precios especiales por convenir.

Opciones que se presentan: en negativo o en positivo; en rollo continuo o en filmofichas; con carpeta «Filmoteca» o filmofichas sueltas; metiendo en cada fotograma dos páginas o sólo una.

Salvo aviso en contrario, se servirán los encargos en microfilm negativo, en filmofichas y en carpetas, y el meter una o dos páginas por fotograma se supondrá se deja al discernimiento del Servicio, según sea el original.

La modalidad «filmoficha», por la gran facilidad de ordenación, archivación, localización rápida de las cintas y manejo de lectura, supera con mucho a la modalidad en rollo. Se llama **«filmoficha»** una tira de película de cinco fotogramas y medio (en otros sistemas, seis), en que caben diez páginas de libro ordinario (libro abierto, o sea, dos páginas cada foto). El medio fotograma que se añade (uno entero en otros sistemas) se destina a «referencia», es decir, autor, título y signatura en la filmoteca y en el centro de origen. Las filmofichas, para ofrecer tales ventajas, van alojadas en unas carpetas «Filmoteca», especialmente dispuestas para contener diez de ellas (cien páginas o cincuenta folios) en lóculos perfectamente adaptados, con sus referencias numéricas y espacio preciso para títulos, páginas y toda clase de indicaciones útiles.

Fotocopias en papel.

Formato:	9 × 12 cm.: en mate, 3	pts.; con brillo, 3,75	pts.
»	13 × 18 cm.: en mate, 4	pts.; con brillo, 5,25	pts.
»	18 × 24 cm.: en mate, 6	pts.; con brillo, 8,25	pts.
»	21 × 30 cm.: en mate, 6,25	pts.	
»	30 × 42 cm.: en mate, 9,25	pts.	

N. B. Estos precios están sujetos a cierta variación, según vengan facturadas las partidas de papel.