VOLUMEN 8 OCTUBRE-DICIEMBRE 1955 NUM. 4

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 INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

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

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 Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

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

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Ceppi mutanti e tecniche relative in «Penicillium Chrysogenum Thom.», por **Aristide Carilli** 353

Estudio cariológico de algunas levaduras ascosporógenas y anascosporógenas, por **A. Socías** y **C. Ramírez** 389

Estudios sobre la fermentación del esparto. II, por **Vicente Callao** y **Enrique Montoya** 419

Micosis relacionadas con la antibioterapia, por **A. Socías** y **A. Portolés** 433

El aspecto estructural, bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto (continuación), por **Federico Beato y González** 491

INFORMACION

Actas de la Sociedad 525

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

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

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

VOLUMEN 8 1955

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

SUMARIO DEL NUM. 1

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

La población microbiana de las salmueras de aceitunas, por **Antonio Izquierdo Tamayo** 3

Obtención de antígenos y sueros hiperinmunes de las encefalitis de San Luis, Japonesa B, Equinas Este y Oeste y ensayos de fijación de complemento con los mismos. I, por **A. P. García Gancedo** 15

Estudios sobre nódulo-bacterias. I, por **Gregorio Fraile Ramos** 55

INFORMACION

Primera Reunión Europea de Normalización Biológica 95

Conferenciantes italianos 95

Actas de la Sociedad 96

IX Congreso Internacional del Frío 96

SUMARIO DEL MUM. 2

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Obtención de antígenos y sueros hiperinmunes de las encefalitis de San Luis, Japonesa B, Equinas Este y Oeste y

ensayos de fijación de complemento con los mismos. II, por **A. P. García Gancedo** 101

Descripción de las inclusiones intracelulares producidas por el virus «Broad-bean Mottle», por **Miguel Rubio Huertos** y **D. H. M. Van Slogteren** 133

Contribución al estudio de levaduras salvajes y cultivadas de la microflora española (continuación), por **Enrique Feduchy Mariño** 137

Nueva especie de levadura aislada de líquido curtiente: Saccharomyces Chambardi, nov. sp., por **Carlos Ramírez Gómez** y **Jacques Boidin** 225

SUMARIO DEL NUM. 3

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

L'utilizzazione delle varie fonti di carbonio da parte del Penicillium Chrysogenum, por **Filippo Dentice di Accadia** 231

Estudios sobre nódulo-bacterias. II, por **Gregorio Fraile Ramos** 249

El aspecto estructural, bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto. I, por **Federico Beato y González** 327

SUMARIO DEL NUM. 4

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Ceppi mutanti e tecniche relative in Penicillium chrysogenum Thom, por **Aristide Carilli** 353

Estudio cariológico de algunas levaduras ascosporógenas y anascosporógenas, por **A. Socías** y **C. Ramírez** 389

Estudios sobre la fermentación del esparto. II. Flora de la fermentación en las balsas, por **Vicente Callao** y **Enrique Montoya** 419

Micosis relacionadas con la antibioterapia, por **A. Socías** y **A. Portolés** 433

El aspecto estructural, bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto (continuación), por **Federico Beato y González** 491

INFORMACION

Actas de la Sociedad 525

VOLUMEN 8 OCTUBRE-DICIEMBRE 1955 NUM. 4

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.

Gráficas TEJARIO, S. A. Pza. del Biombo, 4.-Tel. 22 12 88-MADRID

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA. ROMA
CENTRO INTERNAZIONALE DI CHIMICA MICROBIOLOGICA

CEPPI MUTANTI E TECNICHE RELATIVE IN «PENICILLIUM CHRYSOGENUM THOM.» (*)

por
Aristide Carilli.

L'argomento che ho l'onore di trattare in questa conversazione riguarda in particolare i ceppi e le tecniche usate per ottenere mutanti in P e n i c i l l i u m, il primo della serie di microorganismi che possono considerarsi benemeriti dell'umanità, per gli immensi benefici che derivano dai prodotti del loro metabolismo.

Il genere P e n i c i l l i u m comprende un vasto gruppo di funghi —diffusissimi in natura— che, per il colore caratteristico delle loro spore, sono comunemente conoscluti col nome di «mufe verdi».

Questi funghi hanno richiamato l'attenzione degli studiosi fin dal secolo scorso, soprattutto per la loro importanza quali agenti di decomposizione e di fermentazione.

Già nel 1886 infatti, Saccardo citava i Penicilli quali agenti della decomposizione dei frutti di agrumi; Whemer, qualche anno dopo, riferiva ad alcuni di essi la produzione di acido citrico. E. Johan-Olsen (1898) ne sottolineava l'importanza nell'industria casearia. Si iniziava così lo studio della sistematica e della fisiologia di questi funghi; studio che, successivamente, portò ad un interesse via crescente sull'intero gruppo.

Tuttavia le ricerche su questi organismi conservarono una importanza soltanto relativa, rimanendo limitate a ricercatori isolati o a piccoli gruppi di studiosi, fino alla scoperta della penicillina. Da questo momento numerosissimi furono gli studiosi —microbiologi, chimici, biochimici— che rivol-

(*) Conferencia pronunciada en el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología. Madrid, 2 de marzo de 1955.

sero la loro attenzione ai Penicilli, i quali diventarono così un argomento di primaria importanza biochimica ed industriale.

Poichè l'argomento che trattero è abbastanza definito, non riferirò i successivi risultati ottenuti nel campo delle ricerche su questi organismi fino alla scoperta della penicillina. Tali notizie hanno importanza solamente storica.

La paternità del nome «Penicillium» risale a Link, il quale nelle sue «Observationes» (1809) descrisse molto brevemente il genere, con tre specie: Penicillium glaucum, P. candidum e P. expansum. Tuttavia la caratterizzazione di queste tre specie non doveva essere molto fondata, se lo stesso Link, nel 1824, decise di riportare tutti i Penicilli verdi sotto l'unica specie Penicillium glaucum. Ciò portò ad una notevole confusione in questo campo, già fra gli stessi contemporanei di Link. Confusione che continuò a presentare la letteratura tassonomica del Penicillium per molti anni ancora, fino a che non si affermò l'idea che, per uno studio tassonomico accurato, occorreva mantenere questi organismi in condizioni rigorosamente standardizzate di cultura.

Una data specie infatti, può presentare aspetti fondamentalmente diversi se coltivata su terreni nutritivi che differiscono anche solo per qualche elemento constitutivo: e ciò non solo per la capacità di risposta ai diversi terreni, ma anche per la tendenza, che è propria di questi funghi, a dare variazioni morfologiche e fisiologiche.

Così è avvenuto che molte specie descritte precedentemente come tali, alla luce di uno studio rigoroso, secondo i principi della standardizzazione delle culture, si siano rivelate quali semplici variazioni morfologiche di altre specie conosciute. Tuttavia, nonostante i grandi progressi fatti anche in questo campo, lo studio delle specie appartenenti a questo genere, presenta sempre grandi difficoltà anche per coloro che già dispongono di una buona tecnica e di una certa esperienza di Penicilli.

La colonia.

Il Penicillium su agar cresce formando un ammasso di ife, conidiofori e conidi, constituenti la colonia, cioè una organizzazione che solo apparentemente può ritenersi semplice, essendo in realtà molto complessa.

Vediamo quindi un po' meglio che cosa è la colonia. Possiamo considerarla innanzi tutto come una entità stabile dal punto di vista morfologico e fisiologico, o non è piuttosto un risultato di particolari e speciali condizioni di ambiente, che —esse sole— determinano quelle caratteristi-

che, difficilmente ripetibili? Oppure la colonia è semplicemente un insieme organizzato o disorganizzato di entità separatamente attive e vitali formanti quasi un complesso misto?

Vediamo più in dettaglio come si sviluppa una colonia: da uno o più conidi posti su un terreno contenente note ed adatte quantità di nutriliti, ha origine l'abbozzo della prima ifa (naturalmente la condizione migliore è l'origine monoconidica, per escludere le eventuali differenze nel corredo genetico dei diversi conidi). Successivamente la prima ifa si allunga, emette ramificazioni laterali, che a loro volta si allungano e si ramificano. Osservata al microscopio in questo primo stadio di crescita, la colonia appare formata da un intreccio irregolare di ife, a sviluppo tendenzialmente radiale ed avente ancora tutte le sue ife in intimo contatto con le sostanze nutritive del mezzo e con l'ossigeno. Continuando ad accrescersi però la colonia si sviluppa anche in profondità mediante ife sommerse, ed in alto mediante ife aeree. La colonia può ora considerarsi come la risultante di diversi strati di cellule e conseguentemente sono mutate le originarie condizioni di ambiente omogeneo. Le cellule degli strati più profondi, infatti, sono sì in intimo contatto con i nutriliti, ma non con l'ossigeno; e viceversa, le cellule degli strati superiori mancano del contatto diretto con gli alimenti, mentre sono immerse nell'ambiente aereo.

Ora, considerando che anche il metabolismo delle cellule non è uniforme nella colonia, che l'ambiente stesso in cui le cellule vivono è diverso nei vari punti della colonia, possiamo rilevare che la colonia deve essere considerata come una particolare risposta a particolari condizioni di ambiente; che tali condizioni non sono sempre le più adatte; che non sempre necessariamente l'aspètto della colonia può essere riprodotto e che, infine, lo stesso aspetto della colonia può non essere uniforme.

Queste considerazioni debbono essere tenute in gran conto da tutti coloro che si interessano di tali organismi, perchè da un attento lavoro micologico dipende oltre la buona conservazione dei ceppi, anche la possibilità di scoprire ceppi nuovi di più alto interesse sia scientifico che industriale.

Vediamo ora come si presentano questi organismi in cultura superficiale ed in cultura sommersa.

In cultura superficiale su agar le colonie si presentano circolari, con margine continuo ed intensamente sporificate. Il micelio si presenta con cellule regolari, settate, a forma di tubicino —le ife—; queste danno origine in superficie a rami fruttiferi detti conidiofori, perchè portanti i conidi,

che sono gli organi adibiti alla moltiplicazione della specie. Il conidioforo ha la forma caratteristica del pennello, che ha dato origine al nome latino

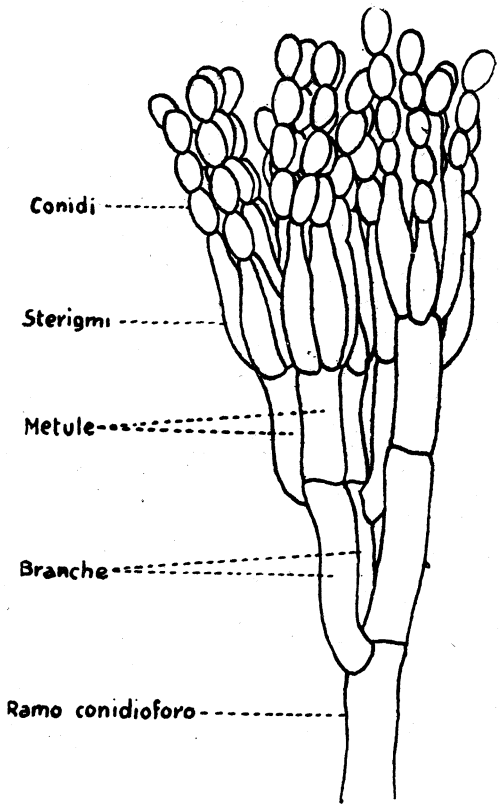


Fig. 1.

del genere (fig. 1). I conidi, di forma rotondeggiante e di diametro variabile da 3 a 5 micron, germinano a temperatura adatta —da 24° a 27°— dopo circa 10-12 ore di incubazione. Si origina così l'abbozzo della ifa primaria che dapprima si presenta semplice, quindi si ramifica in varie direzioni dando luogo al centro di una nuova colonia (fig. 2).

In cultura sommersa il micelio vegetativo presenta un aspetto simile nei tratti fondamentali a quello che si osserva nell culture superficiali su agar. Esso è costituito da ife che si presentano come tubuli settati, con ramificazioni laterali simili nell'aspetto alle ife da cui derivano. E' da

notare che la ramificazione e l'emissione di nuovi rami nel micelio in cultura sommersa è sempre indice di una intensa attività vegetativa e di ottime condizioni di sviluppo. In condizioni normali di cultura sommersa, cioè in condizioni aereate ed agitate, il micelio non produce conidi (fig. 3).

La formazione di conidi in cultura sommersa è stata ottenuta da Foster e coll. (1945), usando uno speciale terreno sintetico a base di cloruro di calcio (in proporzioni dal 2,5 al 5%); in queste condizioni il micelio inizia la formazione di conidi già a 48 ore di età dalla semina e la produzione va gradualmente aumentando finchè a 80-90 ore dall'inoculo, il terreno di cultura assume la colorazione verde tipica dei conidi di Penicillium.

Gilbert e Hichey (1946) hanno anche indotto la formazione di conidi in P. notatum, in condizioni che favoriscono una crescita stentata o moderata, aggiungendo minime quantità di Ferro e mantenendo il pH tra 5 e 6,5.

Tuttavia noi abbiamo potuto constatare recentemente a questo proposito che nelle condizioni suggerite da Foster e coll. in cultura sommersa non si formano penicilli tipici, in quanto i conidiofori sono rudimentali e differiscono da quelli prodotti in cultura superficiale su terreni semi-solidi o liquidi, per essere ridotti essenzialmente ad un corto ramo conidioforo, su cui sono inseriti direttamente pochi sterigmi (mai in numero maggiore di 3 o 4): mancano quindi completamente le metule (fig. 4). Inoltre si formano conidi anche da ife non diffenrenziate che differiscono da quelli prodotti normalmente anche per avere due nuclei invece di uno (fig. 5).

A questo proposito vorrei sottolineare che lo studio morfologico e citologico di questi organismi è molto facilitato dalle condizioni della cultura sommersa, essendo praticamente eliminate tutte le difficoltà inerenti al prelievo del materiale da osservare.

Un fenomeno come la formazione dei conidi, per esempio, o meglio, il meccanismo di formazione dei conidi, può essere seguito agevolmente in queste condizioni, mentre richiederebbe particolari accorgimenti ed una tecnica raffinata, se studiato nelle normali condizioni di cultura superficiale in agar. Un solo preparato dà la possibilità di individuare tutte le fasi successive della formazione del conidio (fig. 4).

E' chiaro come il fattore più importante nella produzione della penicillina sia poter disporre di un ceppo adatto di Penicillium, capace di produrre grandi quantità di antibiotico. Esistono naturalmente altri fattori che influenzano notevolmente la produzione, come l'agitazione,

l'aereazione e la composizione del terreno di cultura: un buon ceppo rimane tuttavia l'artefice primo del successo.

Per questa ragione, le ricerche intese a trovare le migliori condizioni di cultura furono condotte di pari passo con quelle intese al miglioramento dei ceppi. Così, mentre si passò dalla cultura superficiale alla cultura sommersa, migliorando sempre più i terreni di cultura con l'aggiunta di diverse sostanze atte ad incrementare la produzione, i primi ceppi venivano sottoposti ad un intenso lavoro di induzione di mutazioni e selezione per migliorarne la capacità produttiva.

I principali agenti mutageni adoperati sono i raggi ultra-violetti, i raggi X ed alcune azoto-ipriti (N-mustard) (metil-bis (β. cloroetil)-ammina). Illustriamo ora le tecniche usate per indurre mutazioni a mezzo di tali agenti, con speciale riguardo a quella del trattamento con i raggi ultravioletti, che, oltre ad essere la tecnica più diffusa, è generalmente adoperata anche per gli altri agenti mutageni cui abbiamo accennato.

La tecnica più comunemente usata per indurre mutazioni con azoto-iprite è la seguente: la soluzione di azoto-iprite si prepara aggiungendo 0,25 cc. di una soluzione contenente 19,2 mgr. di metil-bis-β-cloroetil-ammina a 9,75 cc. di soluzione acquosa sterile, contenente 270 mgr. di bicarbonato di sodio. Appena la base liberatasi si è disciolta (30 secondi), si aggiungono 10 cc. di una sospensione di spore contenente circa 150.000 spore per cc.; si agita e si lascia stare a temperatura ambiente (24° C.), agitando di tanto in tanto. Ad intervalli regolari si prelevano aliquote di 0,4 cc. e si aggiungono a 100 cc. di una soluzione stelire decontaminante, contenente 60 mgr. di glicina e 68 mgr. di bicarbonato di sodio. I campioni di spore così trattati e un campione di spore non trattato sono conservati a 4° C. per 24 ore. La diluizione della miscela con la soluzione di glicina-bicarbonato ferma efficacemente l'azione dell'azoto-iprite sulle spore e decontamina la miscela smuovendo i gruppi β-cloroetile che non hanno reagito mediante la reazione con acqua o glicina. Dopo la conservazione a 4° C., si piastrano le spore in scatole Petri su di un terreno agarizzato e, dopo il periodo di incubazione a 24° C. di temperatura, si isolano le colonie superstiti.

Un'altra tecnica molto importante, certamente la più diffusa, è l'induzione di mutanti con raggi ultravioletti. Per meglio illustrare questa tecnica, descriviamo un'esperienza eseguita nell'Istituto Superiore di Sanità di Roma, allo scopo di ottenere mutanti morfologici di P. chrysoge-

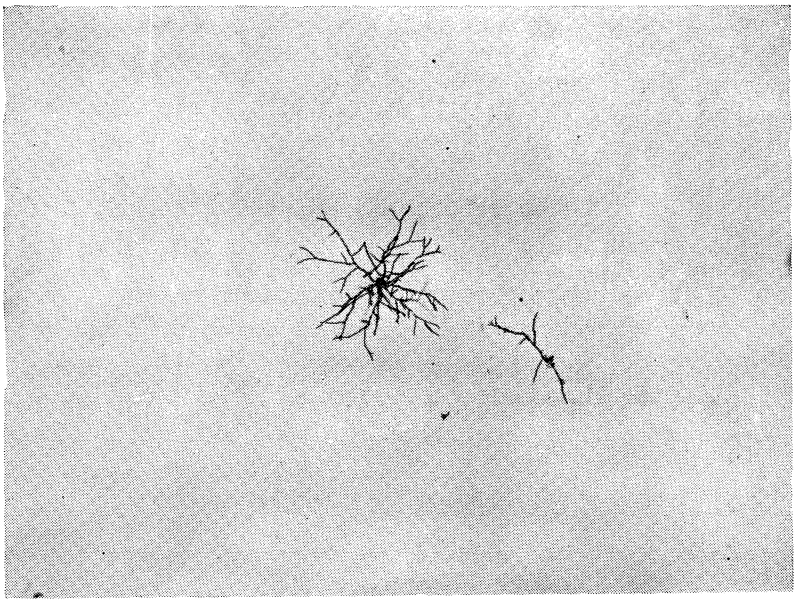


Fig. 2.

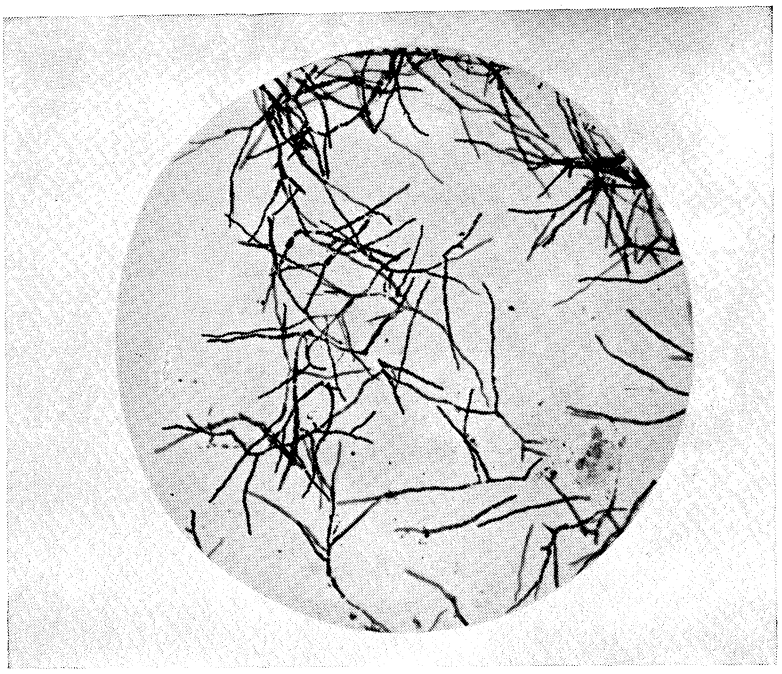


Fig. 3.

Fig. 4.

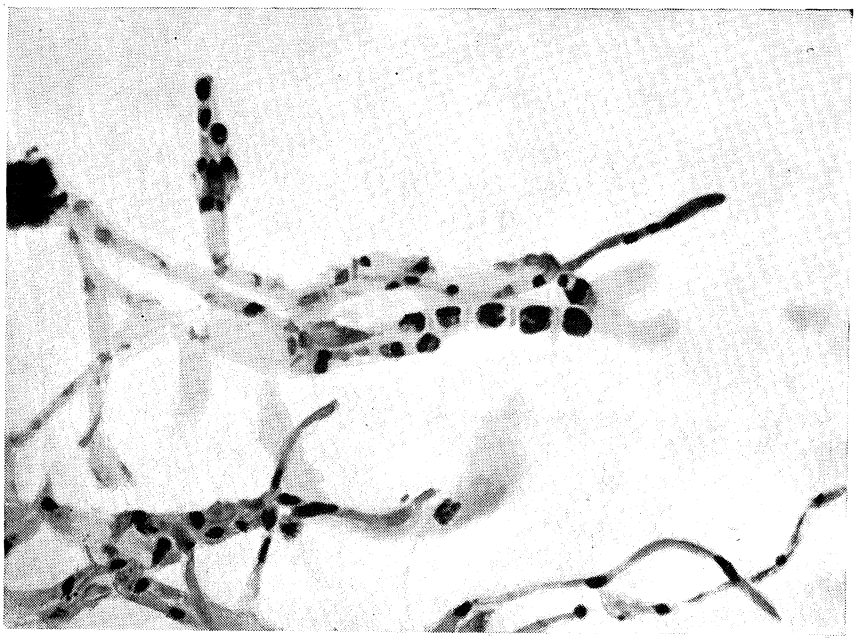


Fig. 5.

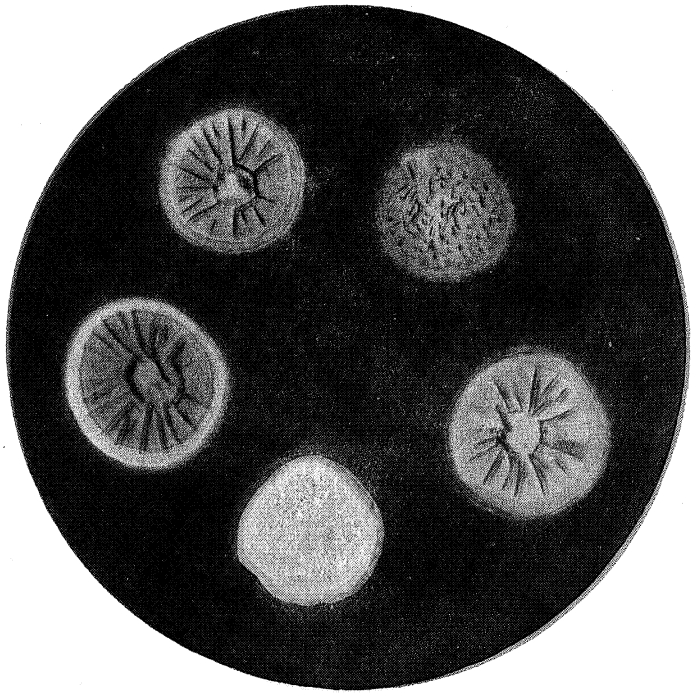


Fig. 7.

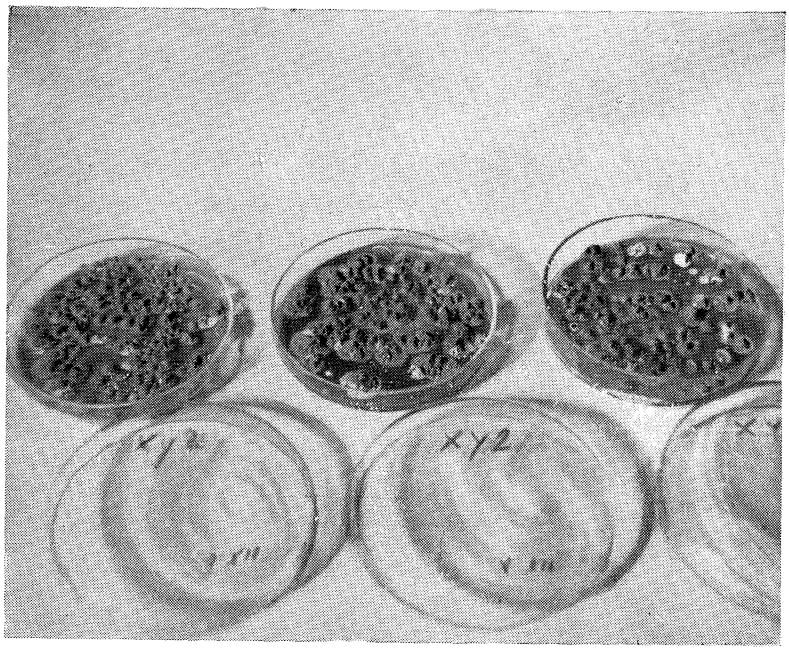


Fig. 6.

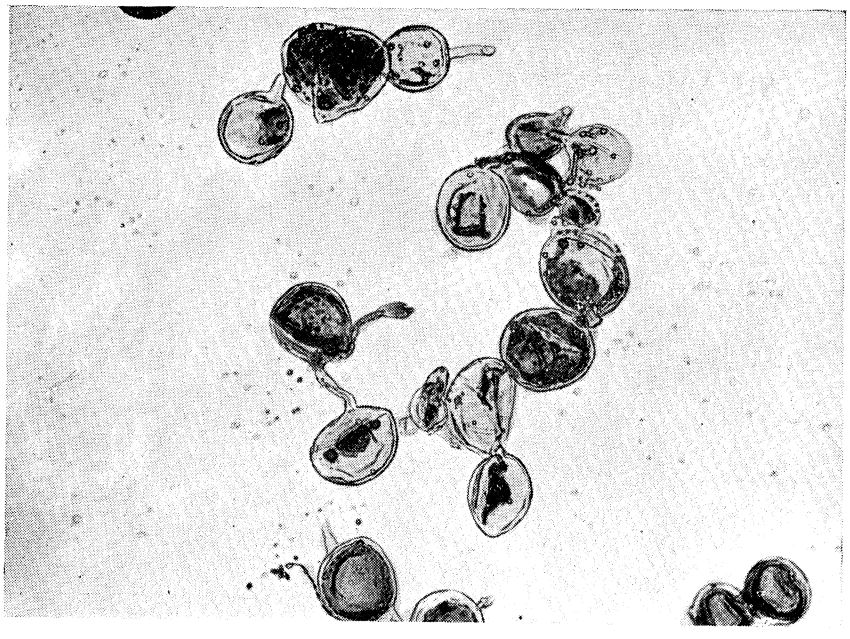


Fig. 8.

n u m , per studiare eventuali relazioni biochimiche e morfologiche in questo organismo.

Fu scelto come ceppo di partenza il P e n c h r y s o g e n u m Wis. 49.133 che presenta in terreni standard, iseguenti caratteri culturali: colonie rotonde, a margine continuo, vellutate; sporificazione verde abbondante, micelio bianco prima della sporificazione, conidi rotondi od ovali, con dimensioni varianti da 2,5 a 4 μ, assenza di pigmento diffusibile nel mezzo.

Le spore furono ottenute da culture di 8 giorni di età cresciute in provette a becco di clarino, tenute in termostato a 24° C. e contenenti un terreno agarizzato a base di saccarosio, corn steep liquor e sali minerali (Moyer e Coghill, 1947) e sospese in acqua distillata sterile in modo da ottenere una concentrazione di circa 30.000 spore/cc. Tale sospensione venne distribuita in piastre di Petri con un terreno agarizzato in ragione di 0,1 cc. per piastra (3.000 spore circa) e ripartita uniformemente su tutta la superficie della piastra con una bacchetta di vetro sterile a forma di T.

Il trattamento mutageno fu eseguito con lampada germicida a raggi ultra-violetti di 15 watt, posta alla distanza di 30 cm. dalle piastre, e con tre diversi tempi di esposizione: 1'30", 2', 2'30". Le piastre vennero quindi incubate in termostato alla temperatura di 24° C., e dopo 8 giorni di sviluppo si isolarono le colonie sopravvissute.

Il tempo ottimale di esposizione risultò essere 2', ottenendosi in tal modo una mortalità di circa il 95 %. La maggior parte delle colonie sopravvissute non presentavano aspetto diverso da quello del ceppo genitore, mentre una piccola percentuale di esse, il 5 % circa, presentò variazioni morfologiche stabili, come per es. Il colore delle spore, il colore e la forma del micelio, etc. (fig. 6). Queste colonie di mutanti morfologici furono catalogate come segue (fig. 7):

Ceppi gialli: costituenti colonie rotonde a margine continuo, raggiate, con micelio e conidi gialli; presenza di pigmento giallo diffusibile nelle culture invecchiate mentre il genitore diretto, ceppo 49.133, non era pigmentato.

A tale proposito ricordiamo che il genitore originale. Wis. Q 176, dal quale per passi successivi discende il 49.133, è dotato di un intenso pigmento giallo; ciò mise pertanto in evidenza una certa regressione di questi mutanti gialli verso i caratteri primitivi.

Ceppi giallo-verdi: constituiti da colonie rotonde, raggiate, a margine

continuo, con micelio e spore giallo-verdi. Questi ceppi sono intermedi fra il mutante giallo ed il ceppo genitore verde. Anche qui si notò la presenza di un pigmento diffusibile nel mezzo, meno intenso però che nel caso dei ceppi gialli.

Ceppi bianchi: constituiti da colonie rotonde, lisce a margine continuo, micelio bianco con sporificazione leggera e variabile fino ad ottenere ceppi non sporificati.

Ceppi rugosi: costituiti da colonie di dimensioni variabili a margine discontinuo, circonvolute, non pigmentate, con pochissimo micelio aereo, leggera sporificazione verde. Tali colonie in cultura superficiale su agar risultano formate da cellule simili a lieriti (fig. 8).

L'esperienza, come ho detto precedentemente, era stata progettata per ottenere mutanti morfologici, allo scopo di studiare eventuali correlazioni tra proprietà biochimiche e proprietà morfologiche in Penicillium.

I diversi mutanti morfologici ottenuti, e il ceppo parente quale controllo, furono pertanto coltivati in cultura sommersa in beute agitate, con terreno adatto alla produzione di penicillina (corn steep, lattosio, carbonato di calcio). E le culture furono sistematicamente seguite riguardo la produzione di penicillina, l'andamento del pH, il consumo degli zuccheri e lo sviluppo miceliale, espresso in peso secco.

Riguardo la produzione di penicillina, l'esperienza mise in evidenza i seguenti fatti:

i ceppi probabili mutanti, ma non diversi morfologicamente dal ceppo genitore, tranne che per una più intensa e rapida sporificazione, producevano meno penicillina del parente (fig. 9); tale diminuzione nella produzione non poteva essere attribuita ad una minore utilizzazione di lattosio, il cui consumo era solo leggermente inferiore a quello del controllo (fig. 10); nè ad un diverso andamento del pH, risultato identico a quello del controllo (fig. 11); nè ad un insufficiente sviluppo miceliale, anch'esso identico al controllo (fig. 12).

i ceppi gialli producevano come il ceppo parente (fig. 9), e anche in questo caso non si rivelarono differenze sensibili nell'utilizzazione del lattosio (fig. 10), nell'andamento del pH (fig. 11), a nello sviluppo miceliale (fig. 12).

Anche i ceppi rugosi con caratteristiche morfologiche tanto diverse da quelle del ceppo parente, producevano come il controllo, nonostante il minore consumo di lattosio; mentre solo i ceppi bianchi producevano

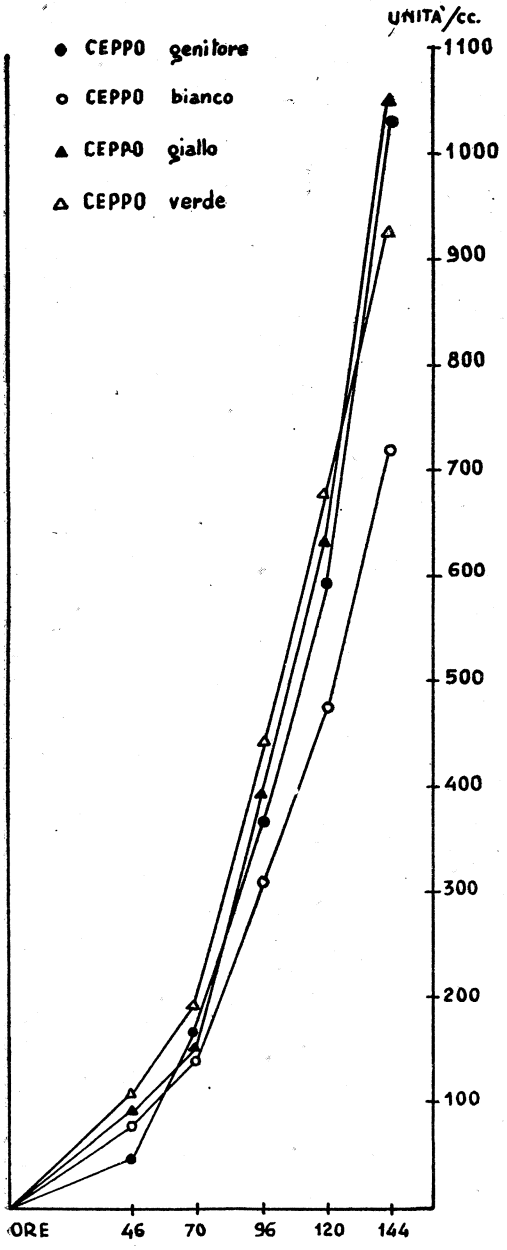

UNITA'/cc.
CEPPO genitore
CEPPO bianco
CEPPO giallo
CEPPO verde
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
ORE
46
70
96
120
144

Fig. 9.

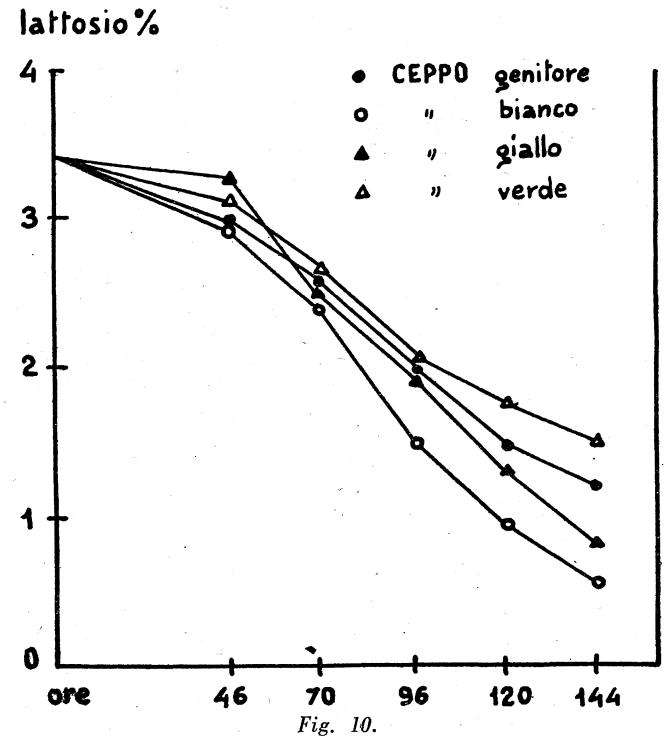

lattosio %
4
3
2
1
0
ore
46
70
96
120
144
● CEPPO genitore
○ " bianco
▲ " giallo
△ " verde

Fig. 10.

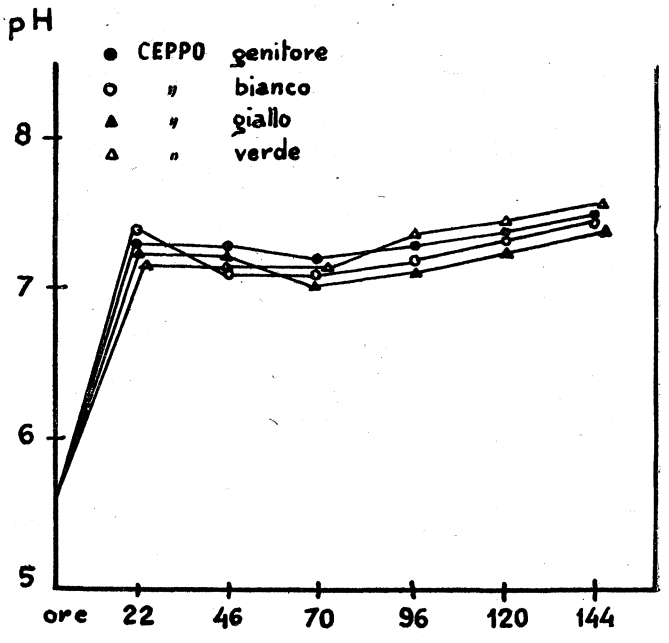

pH
8
7
6
5
ore
22
46
70
96
120
144
● CEPPO genitore
○ " bianco
▲ " giallo
△ " verde

Fig. 11.

costantemente meno del genitore, pur mostrando pressocchè identici l'andamento del pH, l'utilizzazione del lattosio e lo sviluppo miceliale (figg. 13, 14, 15, 16).

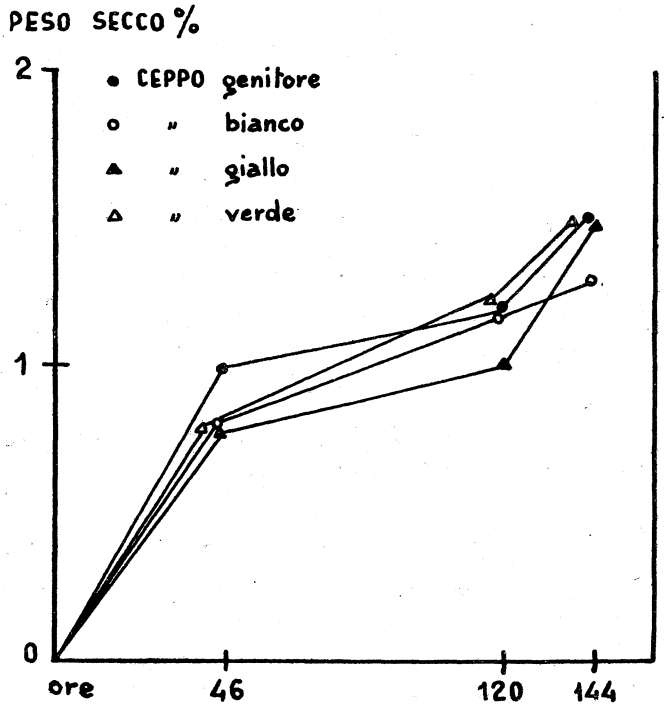


Fig. 12.

Per quanto riguarda tuttavia il ceppo rugoso, va notato che mentre nelle culture su agar esso è formato quasi esclusivamente da cellule simili a lieviti (fig. 8), in cultura sommersa si sviluppa con ife normali, anche se non risultano del tutto scomparse le cellule lievitiformi (fig. 17).

Se si esclude quindi il caso dei ceppi bianchi, che producevano sensibilmente meno del ceppo parente, tutti gli altri risultati portavano alla conclusione che non esistevano differenze sensibili nel metabolismo dei mutanti morfologici saggiati; metabolismo inteso come produzione di antibiotico, andamento del pH e utilizzazione del lattocio.

Non risultava pertanto nessuna correlazione tra proprietà biochimiche

e caratteristiche morfologiche: evidentemente la differenziazione si riferiva solo ad spetti macroscopici più evidenti, quale la maggiore o minore

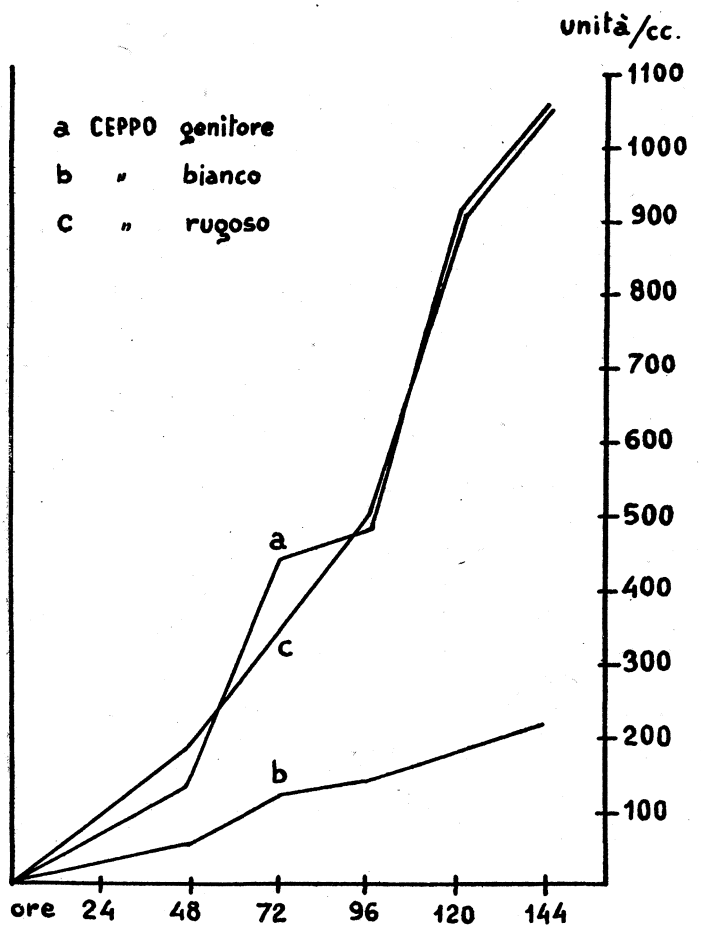


Fig. 13.

produzione di spore, il colore delle spore stesse e la forma del micelio in agar culture, soprattutto per quanto riguarda i ceppi rugosi.

L'argomento è tuttavia di grande interesse e, nonostante i risultati negativi dell'esperienza riportata, credo si riuscirà a trovare una qualche relazione tra metabolismo e forma in Penicillium, così come le

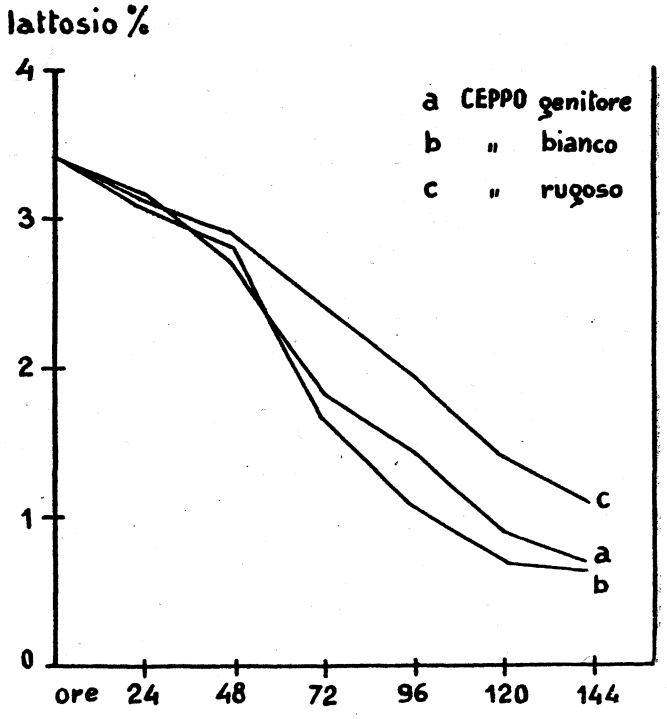

lattosio %
4
3
2
1
0
a CEPPO genitore
b " bianco
c " rugoso
c
a
b
ore 24 48 72 96 120 144

Fig. 14.

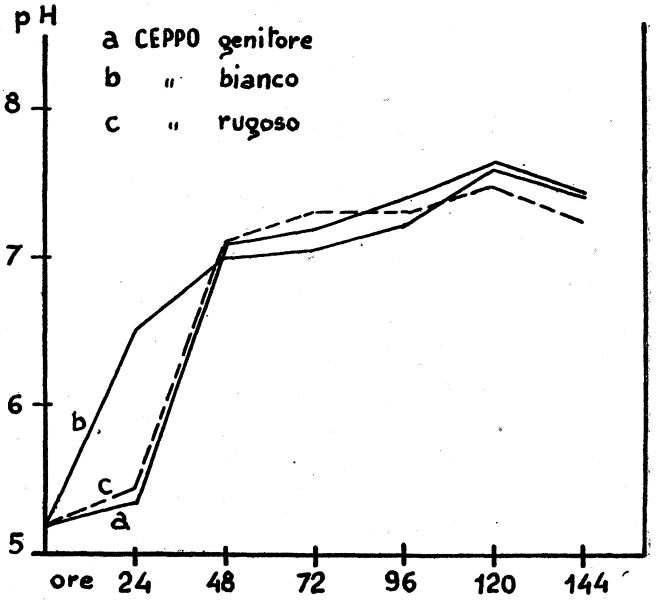

p H
8
7
6
5
a CEPPO genitore
b " bianco
c " rugoso
b
c
a
ore 24 48 72 96 120 144

Fig. 15.

recenti esperianze di Nickerson (1953) hanno messo in evidenza per i lieviti più precisamente in Candida.

Abbiamo già trovato una relazione del genere nei ceppi rugosi di Penicillium, la cui forma simile a lieviti è correlata ad un metaboli-

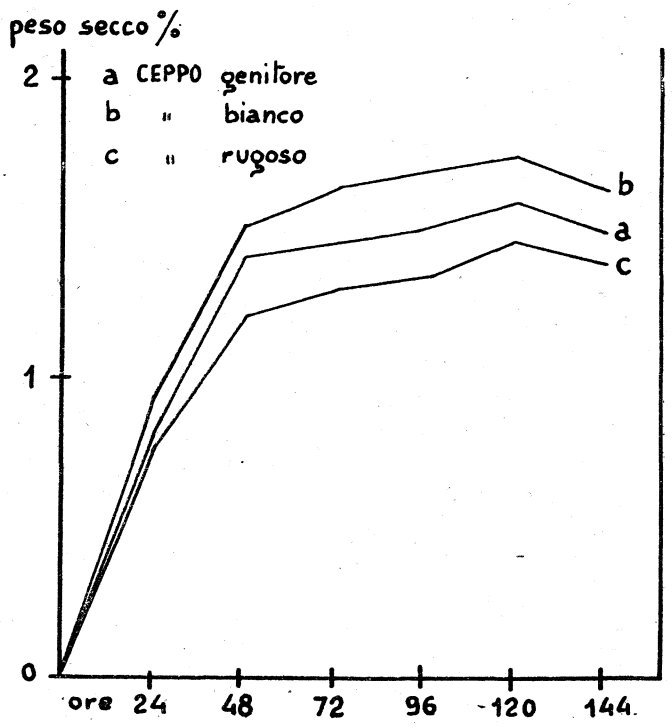


Fig. 16.

smo acido di questi ceppi; infatti se si fanno crescere in un terreno tamponato con carbonato di calcio a pH 6,3-6,5, la forma rugosa scompare e le colonie si sviluppano con ife normali.

La stessa tecnica che ho descritto per la ricerca di mutanti morfologici, viene seguita per ottenere mutanti maggiori produttori di penicillina.

I numerosi ceppi ottenuti per induzione di mutazioni e selezione devono essere sistematicamente saggiati allo scopo di individuare quelli buoni produttori: ciò comporta l'effettuazione di un corrispondente numero di fermentazioni parallele e comparative, che non è possibile

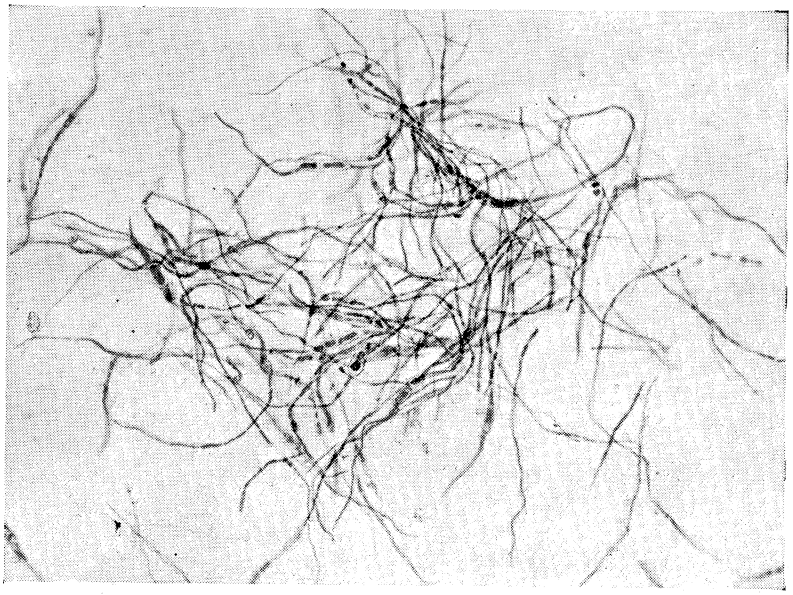


Fig. 17.

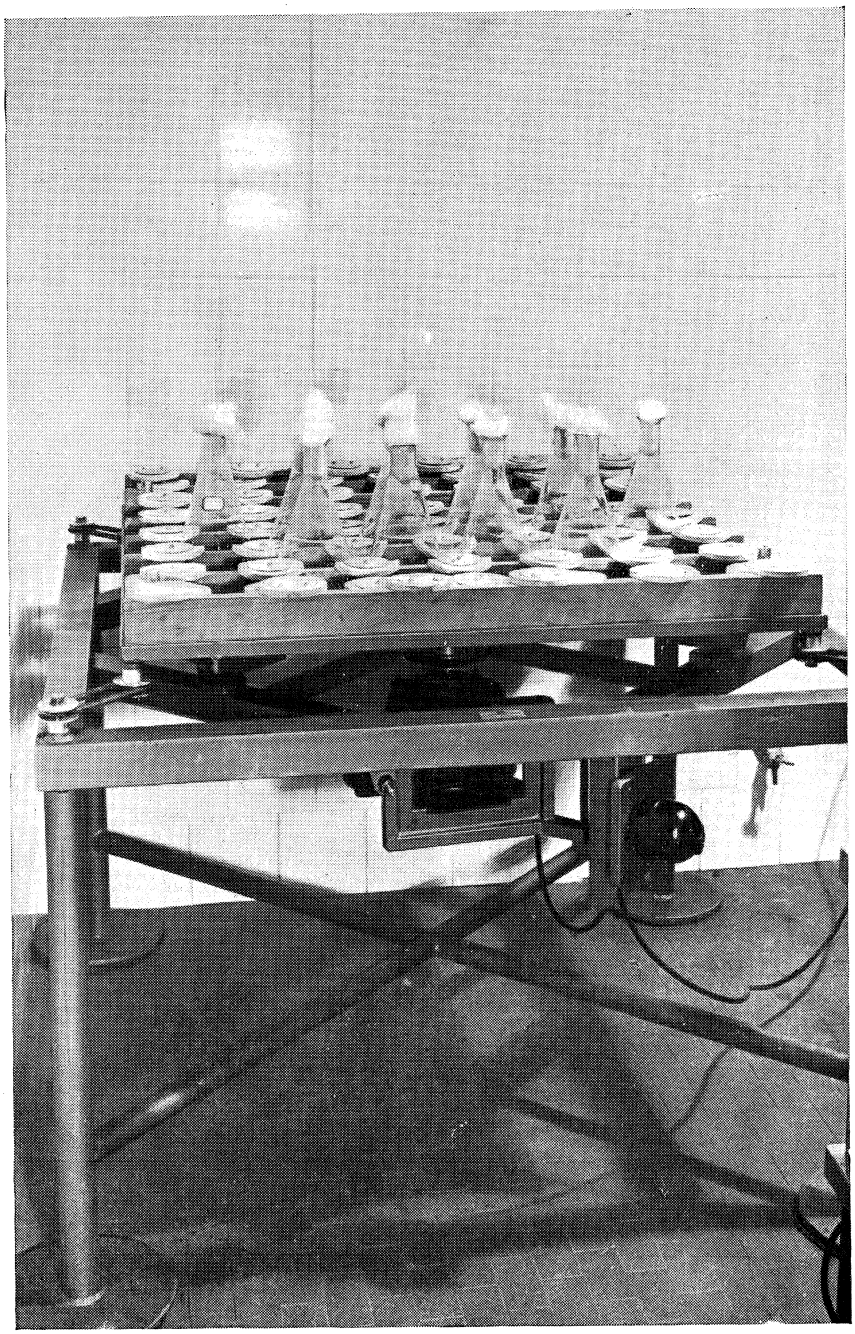


Fig. 18.

eseguire subito in veri fermentatori, più o meno grandi, per evidenti ragioni di spazio e di economia.

I primi saggi comparativi vengono pertanto effettuati in beute poste su agitatori alternativi o rotatori. Attualmente sono generalmente usati quelli rotatori, di tipi diversi: la fig. 18 mostra il tipo usato nel nostro Istituto, constituito da una piattaforma portante i supporti di gomma per le beute, poggiata su 4 sfere metalliche e rotante a mezzo di puleggie con eccentrico di 10 cm.

I ceppi provati e selezionati mediante fermentazione in beuta sono destinati a passare nei tanks; risulta quindi della massima importanza cercare di avvicinare il più possibile le condizioni di fermentazione della beuta o del tank, che sono diverse sopprattutto per le particolari condizioni di aereazione della beuta.

Si è constatato fra l'altro (Chain e Gualandi, 1954), che esiste una notevole differenza di aereazione per beute di identica forma e volume,

VELOCITA' DI DIFFUSIONE DELL'OSSIGENO

Volume beuta	1000 cc.	500 cc.	500 cc.
Volume liquido	100 cc.	100 cc.	50 cc.
cc O_2/100 cc. liq./ora	103	64	101
Shaker rotatorio - eccentricità 50 mm rotazione 285/min.			

Fig. 19.

in rapporto al volume del liquido contenuto (fig. 19), con perfetta correlazione riguardo alla produzione di penicillina (fig. 20).

I migliori ceppi rivelatisi nelle beute agitate, vengono poi provati in fermentatori di scala ridotta e di dimensioni diverse, che riproducono per

quanto è possibile le condizioni dei fermentatori di capacità industriale.

In nostro impiamto pilota dispone di fermentatori da 10 lt (figg, 21 e 22), 50 lt (fig. 23), 200 lt (fig. 24), 3.000 e 15.000 lt (fig. 25). Tuttavia

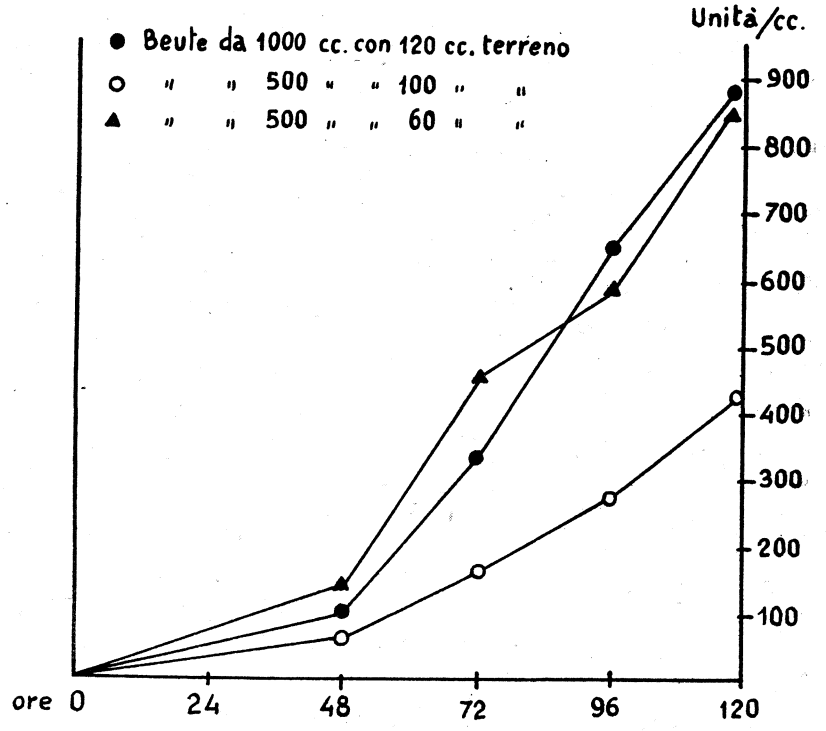


Fig. 20.

nel lavoro di adattamento alle condizioni dei vari fermentatori, bisogna tener conto di diversi fattori che possono notevolmente influenzare i risultati delle fermentazioni.

Uno di questi fattori è l'agitazione: ci si deve attendere, per esempio, nel micelio sviluppato in condizioni di intensa agitazione meccanica (fig. 26), una attività metabolica qualitativamente e quantitativamente diversa da quella di un micelio sviluppato in condizioni di agitazione meccanica debole o completamente assente (fig. 27). Questo fattore deve essere tenuto presente nell'interpretazione delle differenze osservate nel corso di fermentazioni fungine condotte in fermentatori di diverse grandezze. Esso può, ad esempio, essere responsabile del fatto, di recente

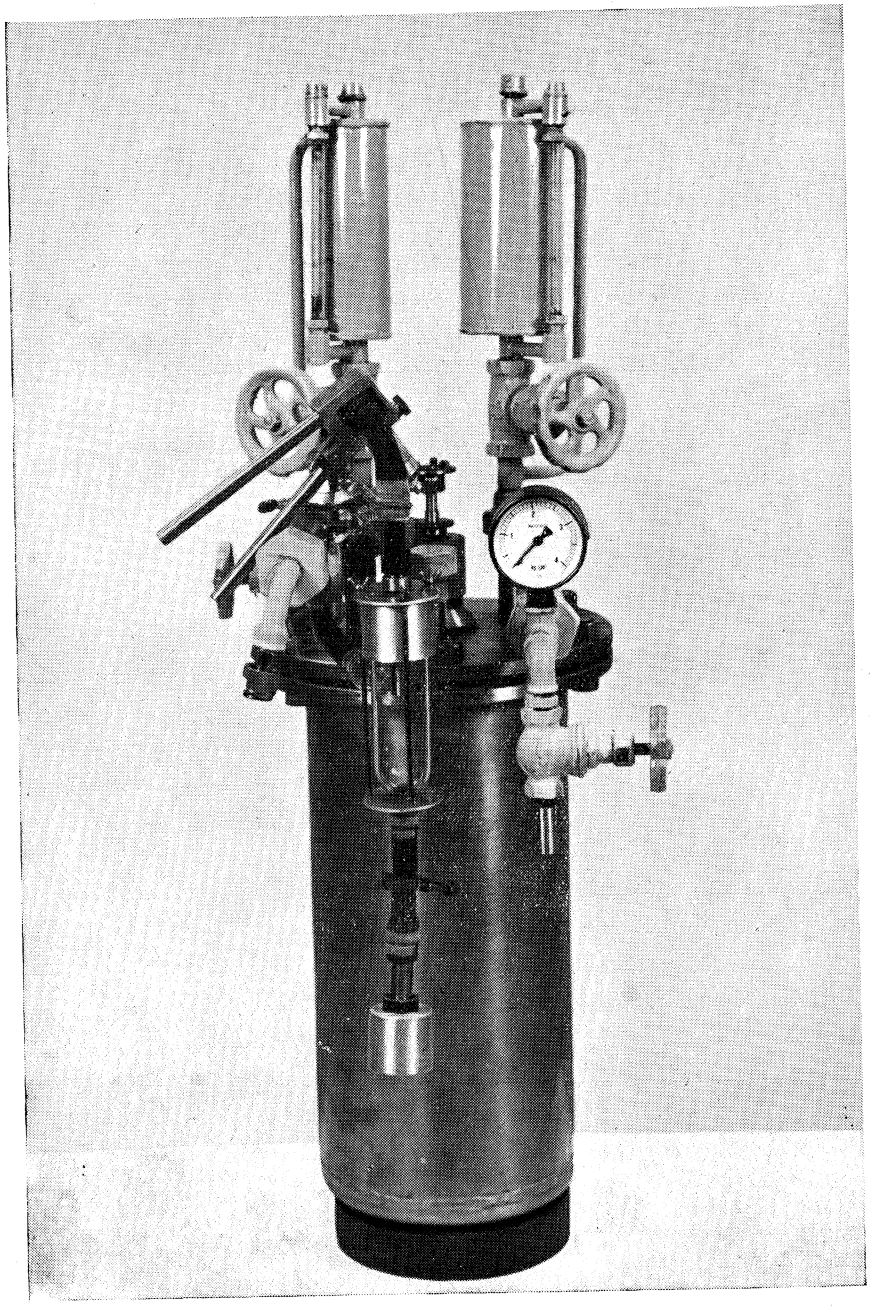


Fig. 21.

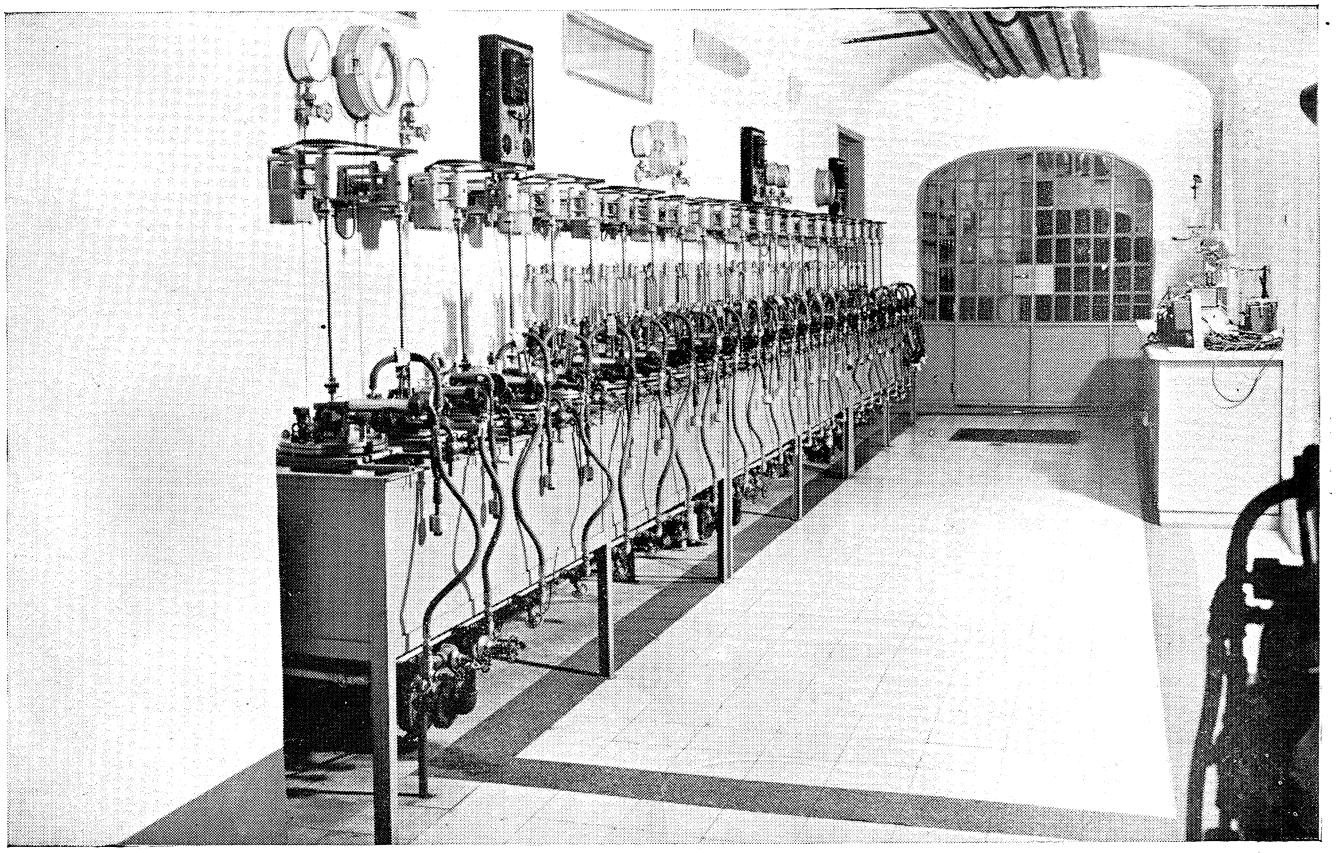


Fig. 22.

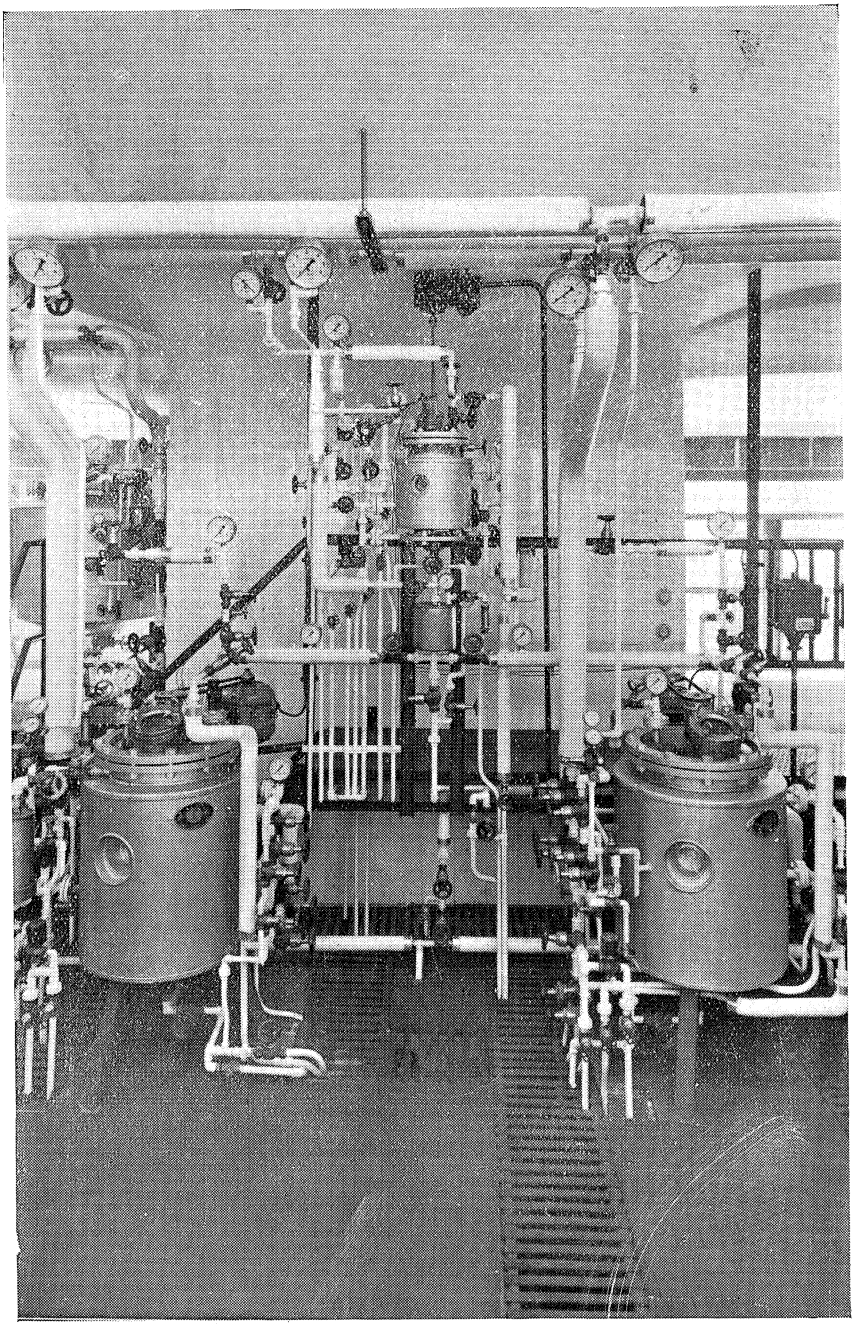


Fig. 23.

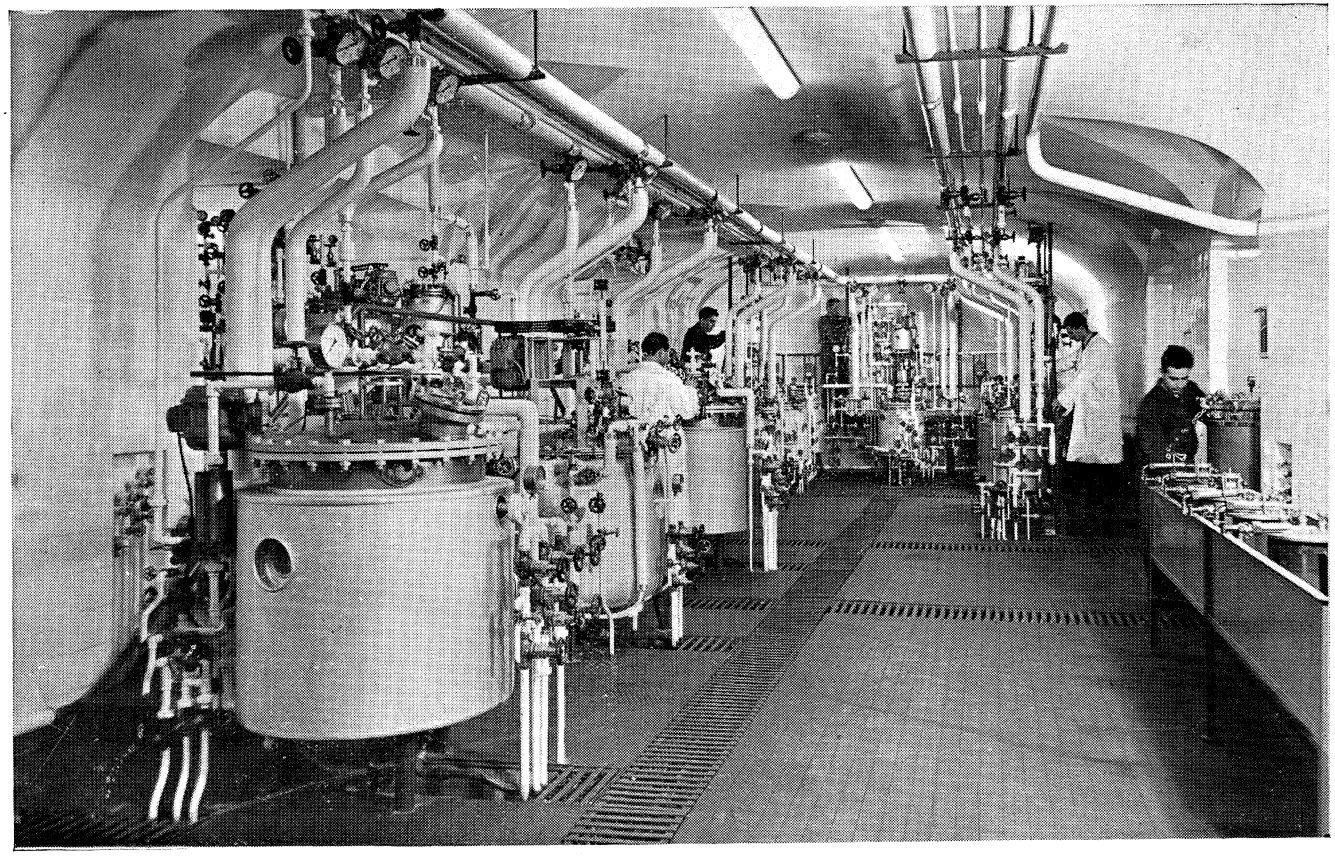


Fig. 24.

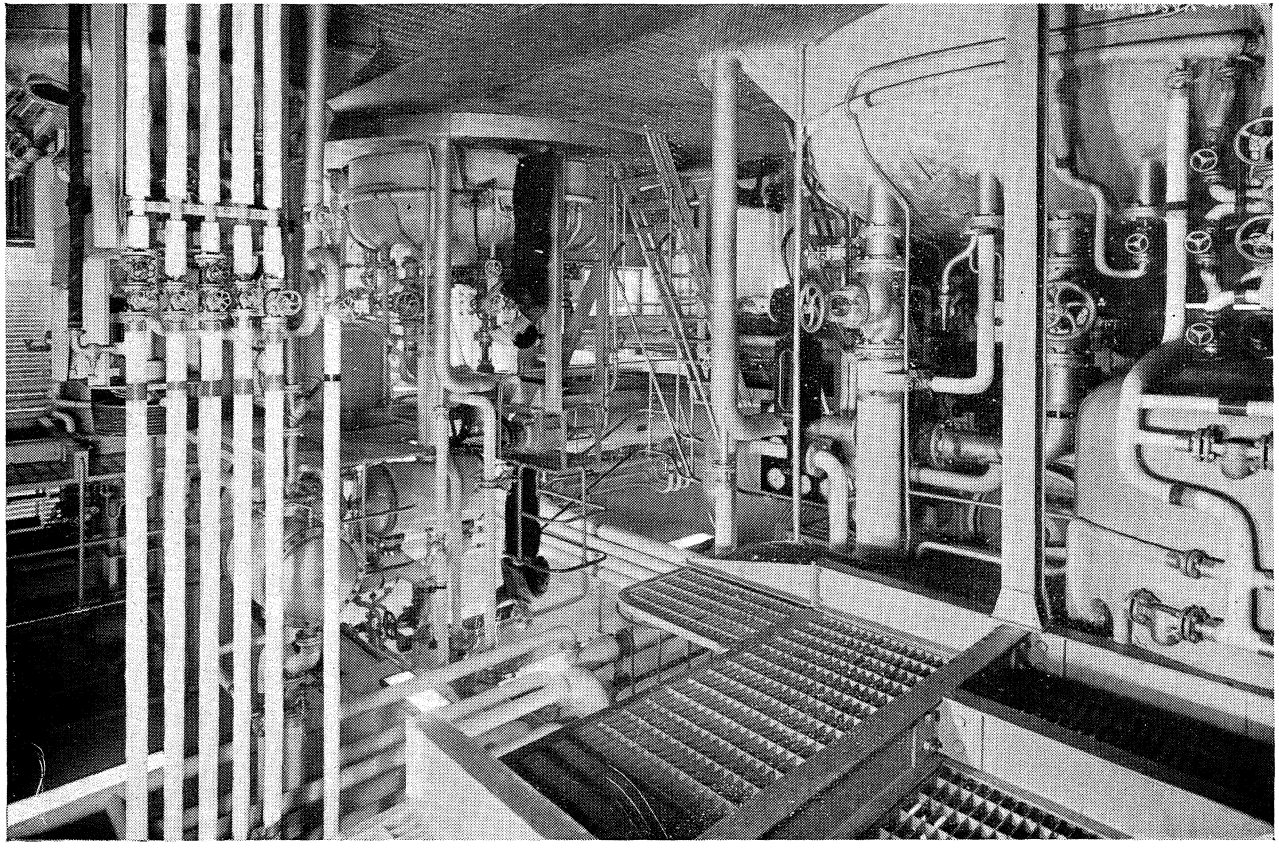


Fig. 25.

Fig. 26.

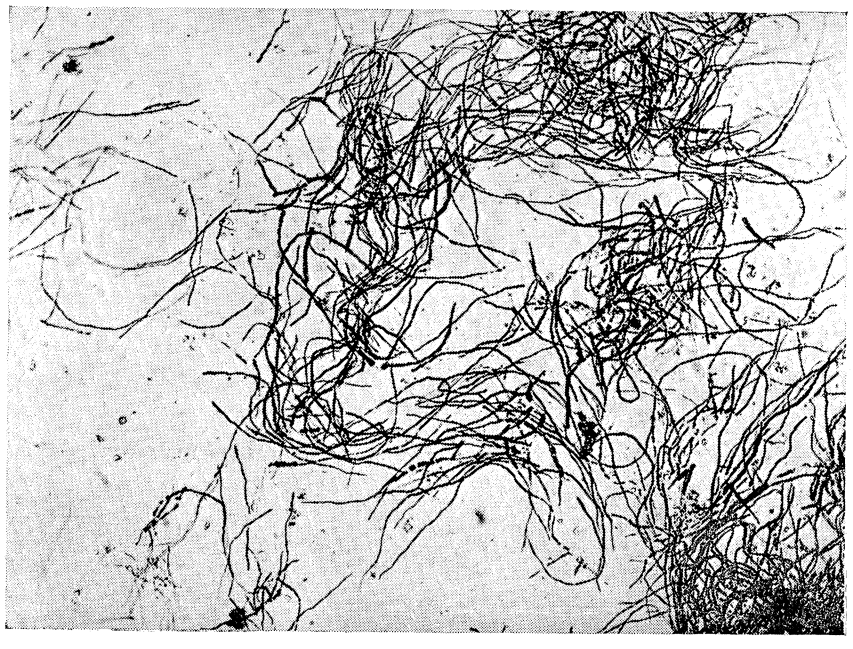


Fig. 27.

osservato, che certi prodotti metabolici ottenuti in alte produzioni in piccoli fermentatori di laboratorio si ottengono in produzioni molto più basse in fermentatori su scala industriale, benchè tutte le varianti controllabili, come la composizione del terreno di cultura e l'intensità dell'aereazione, fossero mantenute rigorosamente identiche. D'altro lato, poichè l'intensità di aereazione dipende dal grado di agitazione meccanica, può non essere sempre possibile raggiungere il grado di aereazione desiderato, senza eccessivo danno al micelio fungino e conseguenti profondi cambiamenti nel suo metabolismo. In tali casi possono aversi risultati soddisfacenti solo adottando fermentatori di maggiore capacità, dove un'alta intensità di aereazione si può raggiungere con una intensità di agitazione meccanica per unità di volume più bassa di quella necessaria per ottenere la stessa aereazione in piccoli fermentatori.

Il lavoro di miglioramento dei ceppi con la tecnica dell'induzione di mutazioni che ho illustrato, deve essere accompagnato dal continuo controllo dei ceppi ottenuti, per evitare possibili degenerazioni, frequentissime soprattutto riguardo alla produzione di penicillina o altra sostanza antibiotica. Questo controllo comporta un continuo lavoro di selezione, con sottoisolamenti del ceppo e saggio della produttività dei sotto-ceppi.

La fig. 28 mostra i risultati ottenuti qualche anno fà da sottoisolamenti di un ceppo buon produttore di penicillina: i sotto-ceppi mostrarono una considerevole variazione nella produzione, riferita a quella del ceppo da cui erano stati selezionati a caso.

Le tecniche che ho sommariamente illustrate sono quelle che hanno permesso di ottenere il continuo miglioramento dei ceppi riguardo alla produzione di penicillina.

Per dare un'idea anche solo approssimativa dell'enorme progresso fatto in questo campo, grazie al lavoro di scienziati e tecnici di vari Paesi compiuto in diversi anni, riporto i passi successivi ottenuti in questo senso, dai primi ceppi produttori in cultura superficiale, fino a quelli altamente selezionati che sono attualmente utilizzati nell'industria.

La tabella 1 dà la genealogia dei ceppi migliori produttori in cultura superficiale.

L'ultimo ceppo fu usato per le prime culture superficiali su scala industriale; si ottenevano massime rese di 160-200 u/cc.

La genealogia dei primi ceppi per cultura sommersa è schematizzata nella tabella 2.

Il ceppo NRRL 1951-B25 fu selezionato da colonie di P. chrysoge-

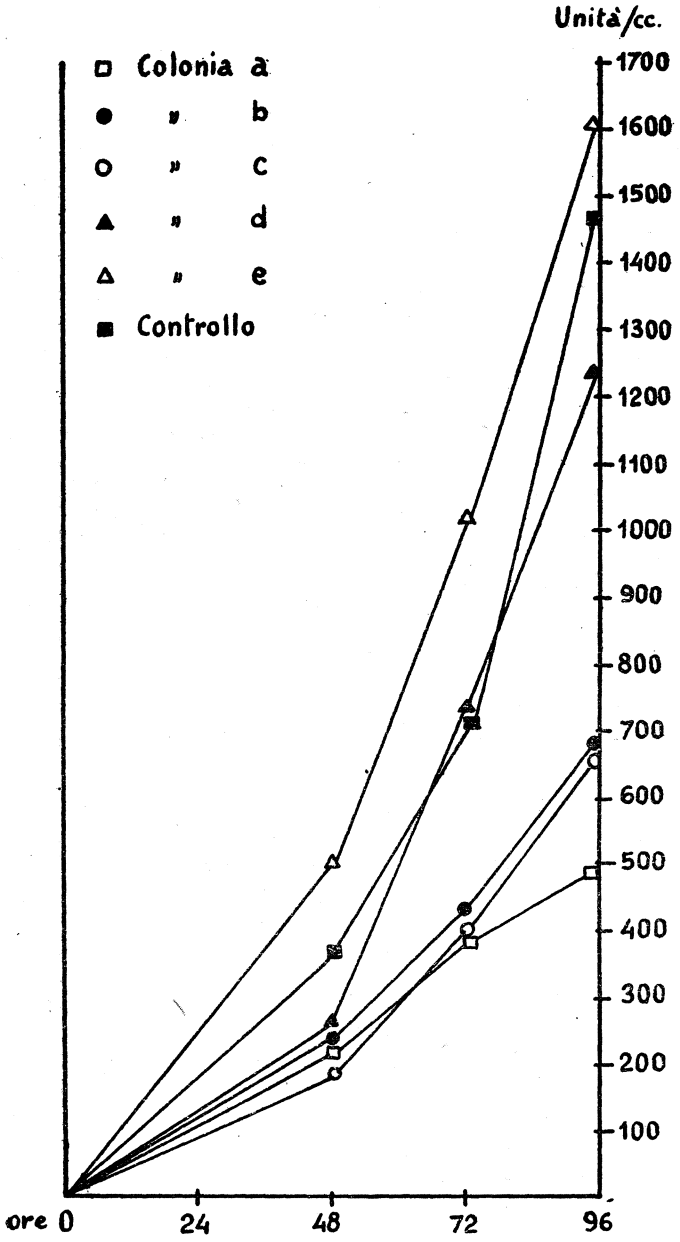

Unità/cc.
Colonia a
" b
" c
" d
" e
Controllo
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
ore 0
24
48
72
96

Fig. 28.

— TAB. 1 —

Ceppo di Fleming (Penicillium notatum)

↓ (selezione)

Ceppo Squibb 1249

↓ (selezione)

Ceppo NRRL 1249 - B 21 -

— TAB. 2 —

NRRL 1951 - B 25 (100 - 200 u/cc.)

↓ (trattamento ai raggi X)

X - 1612 (300 - 500 u/cc.)

↓ (trattamento ai raggi UV)

Q 176 (oltre 1.000 u/cc.)

n u m isolato da un melone ammuffito. Con successivi trattamenti a mezzo di raggi X e con raggi U. V., effettuati da Backus e Coll (1946) presso il Carnegie Institute, si ottenne il Q 176, buon produttore di penicillina, ma che secerneva anche un intenso pigmento giallo chiamato « c r i s o g e - n i n a » (formula bruta $C_{15}H_{22}O_6$) studiato da Clutterbuck, Lovell e Raistrick (1932).

Altri pigmenti sono stati caratterizzati in questo gruppo da autori diversi e, probabilmente, essi non rappresentano la totalità dei pigmenti prodotti dai Penicilli, e la cui presenza ostacola principalmente la purificazione della penicillina. Per questa ragione un considerevole sforzo fu effettuato per trovare dei ceppi che, pur essendo alti produttori, non dessero pigmento.

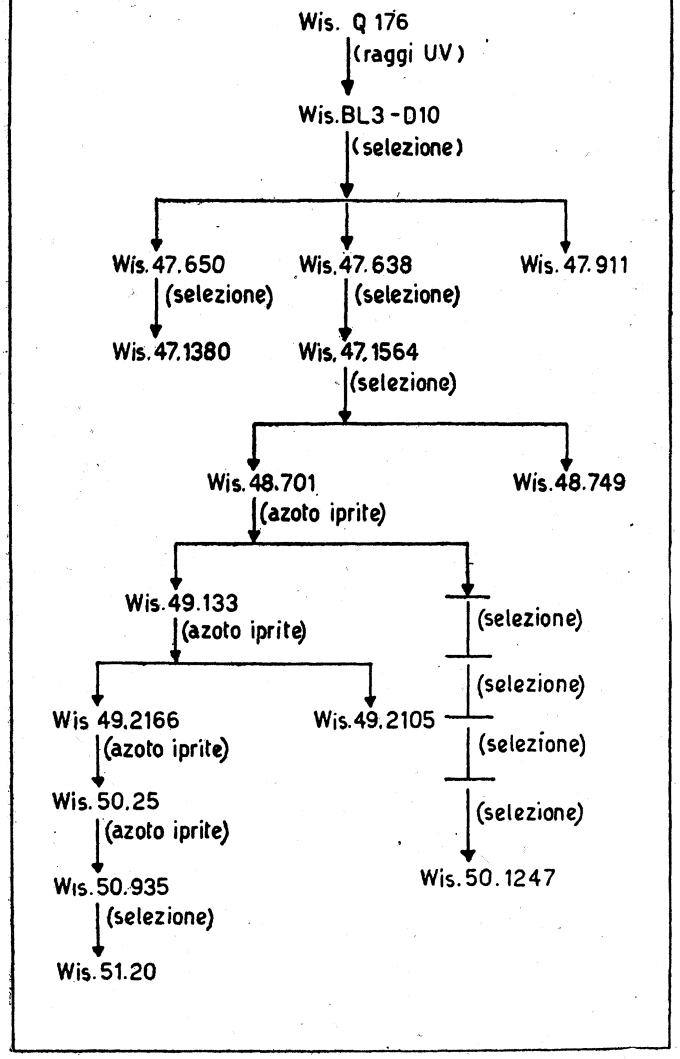
De Somer (1947) fu il primo a trattare con i raggi X un ceppo di P. c h r y s o g e n u m, selezionando dei ceppi non produttori di pigmento per la produzione industriale della penicillina. Higuchi, Jarvis, Peterson e Johnson ottennero 1050 unità nel 1946 e Peterson nel 1947 1550 u/cc. Nel 1950 infine, Brown e Peterson ottennero circa 2.000 u/cc. La genealogia degli ultimi ceppi ottenuti mediante trattamento con raggi U. V. e con azoto-ipriti è riassunto nella tabella 3: essi furono ottenuti tutti nell' Università del Wisconsin, a Madison.

Come si vede i ceppi di P. c h r y s o g e n u m riportati nella tabella sono tutti discendenti del Q 176 Wis. Questo ceppo, alto produttore di penicillina, ma che, come abbiamo detto, produce pigmento giallo, entrò nell'uso industriale alla fine del 1945.

Al principio dell'estate del 1947 si era ottenuto dal Q 176 un ceppo piuttosto interessante, chiamato poi Wis. BL3-D10 che non produceva pigmento giallo nel terreno. Questo ceppo fu ottenuto sottoponendo i conidi del Q 176 a un debolissimo trattamento con radiazioni ultraviolette di 2750 A; esso fu selezionato e considerato molto interessante, perchè, nonostante producesse meno antibiotico del ceppo parente, la produzione di penicillina era molto maggiore di tutti gli altri ceppi senza pigmento incontrati fino ad allora.

Attraverso un programma di selezione che si svolse per oltre tre anni e vagliando migliaia di sottoisolamenti dal BL3-D 10, si ottennero un certo numero di ceppi, tra cui i migliori furono quelli riportati nella tabella. Di questi ceppi sette furono ottenuti per selezione di varianti prodottesi spontaneamente in una serie di tre generazioni. Gli altri tre

TAB. 3


Wis. Q 176
(raggi UV)
Wis.BL3 - D10
(selezione)
Wis. 47.650
(selezione)
Wis. 47.1380
Wis. 47.638
(selezione)
Wis. 47.1564
(selezione)
Wis. 47.911
Wis. 48.701
(azoto iprite)
Wis. 48.749
Wis. 49.133
(azoto iprite)
Wis 49.2166
(azoto iprite)
Wis. 50.25
(azoto iprite)
Wis. 50.935
(selezione)
Wis. 51.20
(selezione)
(selezione)
(selezione)
(selezione)
Wis. 49.2105
Wis. 50.1247

ceppi furono ottenuti quali sopravvissuti da trattamenti di spore con azoto-ipriti (metil-bis (β cloroetil)-ammina).

Nove di questi ceppi sono caratterizzati dal fatto che i loro miceli non danno pigmento giallo o ne danno tanto poco che non ostacola la purificazione della penicillina. Questa mancanza di produzione di pigmento, contrastando fortemente non solo con la situazione incontrata tra i ceppi selvaggi, ma anche con la situazione di tutte le culture che eranostate precedentemente selezionate, fu il migliore pregio del genitore BL3-D10.

Nessuno dei discendenti del BL3-D10 ha finora dimostrato una riversibilità per la produzione di pigmento giallo.

Tuttavia un interessante derivato azoto-iprite, il Wis. 40.2105 secerne un pigmento bruno-rossiccio nel terreno di cultura. Anche per questo quindi da questo ceppo non è continuata la selezione.

La genealogia dei ceppi riprodotta nella tabella 3 si ferma al 5120, perchè non mi è stato possibile avere quella successiva. Ma altri ceppi sono stati selezionati e si può dire che, oggi, ogni impianto per la produzione di penicillina dispone di un suo laboratorio di ricerca in questo campo e quindi di ceppi nuovi continuamente selezionati.

Tutto il lavoro svolto e i risultati ottenuti nell'aumento della produzione unitaria, insieme a quelli raggiunti nel continuo miglioramento delle condizioni di cultura, hanno decisamente contribuito allo sviluppo di quella che è ormai una delle più fiorenti industrie chimiche farmaceutiche; ed ha permesso che la penicillina, farmaco raro e costoso nell'immediato dopo-guerra, sia diventato accessibile a tutti e quindi di uso comune, per il prezzo relativamente basso, apportando i ben noti immensi benefici nella moderna terapia umana.

BIBLIOGRAFIA

BACKUS, M. P., STAUFFER, J. F., and **JOHNSON, M. J.**—1946. J. Am. Chem. Soc., 68, 152-153.

BROWN, W. E., and **PETERSON, W. H.**—1950. Ind. Eng. Chem., 42, 1.823.

CHAIN, E. B., and **GUALANDI, G.**—1954. Rend. Ist. Sup. Sanità, English Edition 17, 5-70.

CLUTTERBUCK, P. W., LOVELL, R., and **RAISTRICK, H.**—1932. Biochem. J., 26, 1.907.

DE SOMER, P.—1947. Bull. Soc. Chim. Biol., 29, 364-366.

FOSTER, J. W., MC DANIEL, L. E., WOODRUFF, H. B., and **STOCKES, J. L.**—1945. J. Bact., 50, 366-368.

GILBERT, W. J., and **HICKEY, R. J.**—1946. J. Bact., 51, 731-733.

HIGUCHI, K., JARVIS, F. G., PETERSON, W. H., and **JOHNSON, M. J.**—1946. J. Am. Chem. Soc., 68, 1.669.

JOHAN-OLSEN, O.—1898. Centbl. f. Bakt., II 4, 161-169.

LINK, H. F.—1809. Gesselschaft Naturforschender Freunde zu Berlin, Magazin 3.

LINK, H. F.—1924. Species plantarum, Editio quarta, tomus 6, p. 70.

MOYER, A. Y., and **COGHILL, R. D.**—1947. J. Bact., 53, 329.

NICKERSON, W. J., and **MANKOWSKI, Z.**—1953. Am. Jour. Bot., 40, 584-591.

PETERSON, W. H.—1946-47. Harvey Lectures, Ser., XLII, 276.

SACCARDO, D.—1882-1928. Silloge fungorum, Pavia, Italia.

WHEMER, C.—1894. U. S. Patent 515.033.

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

ESTUDIO CARIOLOGICO DE ALGUNAS LEVADURAS ASCOSPOROGENAS Y ANASCOSPOROGENAS

por
A. Socías y C. Ramírez

Antes de entrar en detalles de nuestras investigaciones personales daremos una reseña del estado actual de las investigaciones sobre el núcleo de las levaduras.

Las levaduras han sido, sin duda, el grupo más estudiado citológicamente, dentro del orden Endomycetales.

Guilliermond (1940) y Henrici (1941) describen lo que ellos consideran como principales tipos de ciclos vitales en las levaduras. El primero reconoce tres grupos: «Tipo haplobióntico», «tipo diplobióntico» y «tipo haplodiplobióntico». Del primer tipo es ejemplo el género Zigosaccharomyces, cuya fase vegetativa es predominantemente haploide, quedando la fase diploide restringida al zigoto, que se forma previa conjugación de dos células haploides. Del tipo diplobióntico tenemos Saccharomycodes, con fase vegetativa diploide, reduciéndose la fase haploide a las ascosporas, que se copulan de dos en dos para germinar. Entre los que pertenecen al tercer tipo se puede citar el género Saccharomyces, en que la fase vegetativa tiende a ser diploide, aunque también existe de modo restringido una fase vegetativa haploide.

A pesar de que el Saccharomyces cerevisiae ha sido objeto de estudios citológicos durante más de cincuenta años, los investigadores no están todavía de acuerdo en cuál de los componentes celulares es el núcleo. Unos pocos investigadores modernos han vuelto a la antigua hipótesis de Wager y Penniston (1910) de que el núcleo de la célula de levadura es la gran vacuola celular y que el corpúsculo adosado a uno de los costados de ella es el nucleolo o «centrocromatina»,

según Lindegren. Sin embargo, la gran mayoría de los autores está de acuerdo en afirmar que la gran vacuola celular es un constituyente citoplásmico y que el corpúsculo antes mencionado es el verdadero núcleo.

Unos cuantos investigadores modernos están de acuerdo con Wager y Penniston (1910) en afirmar que la división del núcleo en la célula en gemación es amitósica, pero la mayoría aseguran que existe verdadera mitosis, como afirmó mucho antes Swellengrebel (1905), habiendo señalado la presencia de cuatro cromosomas en el núcleo de la célula en gemación.

Kater (1927) estudia la célula en gemación de Saccharomyces cerevisiae, llegando a las conclusiones ya expuestas anteriormente por Guilliermond y otros de que Wager y Penniston estaban en un error al considerar la vacuola celular como núcleo. Los «cordones de cromatina» de Wager y Penniston fueron considerados como cordones de metacromatina por Kater. Este descubrió que la metacromatina se divide en dos partes durante la división nuclear, quedando parte de ella en la célula madre y pasando la otra a la yema. Es probable que Lindegren (1947, 1948) tomara de este dato la idea de que los corpúsculos metacromáticos (de metafosfato) que se encuentran nadando en el jugo vacuolar son cromosomas. Kater observó durante la división nuclear un huso con ocho cromosomas, suponiendo que a cada polo del huso van ocho cromosomas, emigrando luego uno de los dos núcleos a la yema.

Guilliermond (1928), en un estudio sobre Saccharomycodes ludwigii, afirma que el núcleo de las levaduras no difiere estructuralmente del de los demás hongos. Sin embargo es partidario de considerar la división nuclear como amitósica. Anteriormente (1919) había descrito un tipo similar de división en otras levaduras, aunque encuentra que las divisiones en las ascas son aparentemente mitósicas. Sin embargo, años más tarde (1936, 1940) indica que ha observado figuras parecidas a mitosis en las células en gemación de Saccharomyces paradoxus y de Hansenula saturnus.

Badian (1937) está de acuerdo con Kater en que el núcleo de las levaduras no es la gran vacuola celular. No llega a observar un nucléolo, e indica que el núcleo se divide por mitosis primitiva, durante la cual dos cromosomas se dividen longitudinalmente y se separan, permaneciendo entre los cromosomas hijos un filamento finísimo de cromatina mientras éstos se van separando. Este autor piensa que los dos cromo-

somas de la célula vegetativa son bivalentes, formados por la unión de dos pares de cromosomas monovalentes en dos células haploides, en las que se ha verificado una plasmogamia. Según él, cree que esto explica sus observaciones de dos cromosomas en los núcleos en profase, incluso en la meiosis. Ha efectuado sus investigaciones, tanto en Schizosaccharomyces pombe como en Saccharomyces cerevisiae. Renaud (1938 b) y Guilliermond (1940) no están de acuerdo con él sobre este particular.

Renaud (1938 b) encuentra en Saccharomyces ellipsoideus un núcleo de estructura semejante al descrito por Guilliermond. Durante la división nuclear, la membrana nuclear y el nucléolo desaparecen, mientras se desarrolla un huso con pequeños cromosomas y centrosomas polares. Cree que a cada polo pasan ocho cromosomas, apareciendo cada grupo como una masa bilobulada sobre el huso.

Richard (1938) emplea la colchicina para retrasar la mitosis en la metafase. Pero, según él, su efecto es opuesto, estimulando el desarrollo. No encuentra evidencia de verdadera mitosis durante la gemación, sacando la conclusión de que es probable que se produzca amitosis. Beams, Zell y Zulkin (1940) concuerdan con Richard en afirmar que la división nuclear en las células en gemación se verifica por amitosis. Encuentran dichos autores que el núcleo es el corpúsculo que se halla a un lado de la vacuola celular. En cambio, Kater (1940, 1951) expresa su duda de que se produzca siempre amitosis como proceso reproductor en las levaduras o en cualquier otro organismo.

Sinoto y Yuasa (1941) experimentan algunas dificultades para distinguir las diversas partes del núcleo en reposo, pero su concepto sobre la estructura nuclear es, en esencia, el mismo que el de Guilliermond. Antes de hacer sus observaciones citológicas emplearon takadiastasa para disolver muchos de los gránulos citoplásmicos que pudieran interferir los resultados. Encuentran que existe una verdadera mitosis con cuatro cromosomas que pasan a cada polo del huso.

La mayoría de los investigadores modernos, dejando a un lado sus divergencias sobre el mecanismo de la división nuclear y el número de cromosomas presentes, están de acuerdo en que el núcleo es el corpúsculo situado fuera de la vacuola celular de la célula de levadura. Sin embargo, en una serie de trabajos y en un libro, Lindegren (1945 a, 1945 b, 1947, 1948, 1949, 1951 a, 1952), Lindegren y Lindegren (1946) y Towsend y Lindegren (1953), han hecho resurgir el antiguo concepto

de Wager y Penniston. Para este autor y sus colaboradores, las estructuras ricas en volutina de las células de levadura, que se encuentran en el interior de la gran vacuola celular, han sido identificadas como cromosomas por su estructura y comportamiento. Wiame (1946), en sus investigaciones, parece demostrar que la volutina de las células de levadura es metafosfato, pues la adición de fosfatos a los medios de cultivo aumenta la cantidad de volutina demostrable en las células, y los extractos de dichas células proporcionan grandes cantidades de metafosfatos. Lindegren (1945 a) es el primero en describir los cromosomas en la vacuola de las células de levadura. Lindegren y Lindegren (1946) describen la mitosis por la que los cromosomas se reparten en partes iguales entre la célula madre y la yema. Rafalko (1946) demuestra que los «cromosomas» de la «vacuola nuclear» son Feulgen positivos, dato con el que nuestros resultados no coinciden en absoluto. Al corpúsculo Feulgen positivo, externo a la vacuola nuclear, lo llama Lindegren «centrocromatina» (el núcleo de la mayoría de los autores) y lo homologa a la heterocromatina de los organismos superiores. Considera centrosoma a una estructura acidófila, unida externamente a la vacuola nuclear, que no se forma nunca de novo, y desempeña un papel importante en la gemación, conjugación y meiosis. Explica el papel de la volutina (metafosfato) en la mitosis (1947) y en la especificidad de los enzimas celulares (1948). Según él, la volutina es necesaria para la división de los cromosomas, y que sólo los recubiertos de ésta son capaces de dividirse, fundándose en el punto de vista de Wiame de que el metafosfato sería una fuente de energía por su contenido en cadenas ricas en energía. Los metafosfatos son sintetizados de los ortofosfatos sobre los cromosomas y transferidos al nucleolo. La síntesis de los ribonucleoproteidos que se produce en el nucleolo depende del suministro de metafosfato originado en los cromosomas, y la especificidad de los enzimas celulares puede estar asociada con este fenómeno, ya que los genes, según se sabe, controlan la especificidad de diversos enzimas celulares. Caspersson y Schultz (1940) demuestran que los ribonucleoproteidos celulares son sintetizados en el nucleolo y transferidos del nucléolo al citoplasma. Por lo que han propuesto que la especificidad de los enzimas, cuya síntesis está bajo control genético, depende de substancias específicas transportadas con el metafosfato polimerizado al nucleolo. Los ortofosfatos no serían empleados directamente en la formación de ribonucleoproteidos, sino que deberían pasar primero por la fase de metafosfato. Las cade-

nas, ricas en energía de los metafosfatos, proporcionarían la energía necesaria para la síntesis de los ribonucleoproteidos en el nucleolo, tanto como de las proteínas de los mismos cromosomas. La síntesis de los ribonucleoproteidos en el nucleolo debería iniciar la producción de enzimas específicos. Esto sugeriría que los metafosfatos transportarían grupos conferidores de especificidad del cromosoma al nucleolo, que proporcionarían especificidad a los ribonucleoproteidos sintetizados en el nucleolo.

En la teoría de Lindegren parece haber numerosas lagunas. Además, el concepto de núcleo propuesto por esta escuela no se relaciona en nada con lo que hasta ahora se conoce sobre la estructura y comportamiento de los núcleos de los demás hongos, ni, en general, las técnicas empleadas por este investigador y colaboradores revelan la verdadera naturaleza de los componentes nucleares.

En conexión con la controversia sobre qué componente de la célula es el núcleo, varios investigadores han estudiado la célula de levadura con ayuda de colorantes específicos del núcleo, en un esfuerzo para determinar la localización del ácido desoxiribonucleico. Después de emplear la técnica de Feulgen, Rochlin (1953) encuentra que sólo el corpúsculo, considerado como núcleo por la mayoría de los autores, tomaba el colorante.

Delaporte y Roukhelman (1938) y Delaporte (1939) hacen un estudio cuidadoso de los ácidos nucleicos de la célula de levadura. Sus investigaciones incluyen un estudio químico de extracto de células. Sacan la conclusión de que el ácido timonucleico (desoxiribonucleico) está localizado en el núcleo convencional y que el ácido zimonucleico (ribonucleico) está localizado en los corpúsculos de metacromatina de la célula de levadura.

Brandt (1941) estudia la célula de levadura bajo varias condiciones fisiológicas con ayuda de los rayos ultravioleta, sacando la conclusión que el núcleo verdadero y la gran vacuola celular son estructuras diferentes. Encuentra que dicha vacuola, bajo ciertas condiciones, contiene considerables cantidades de volutina. Ha observado también que las células menores carecen de vacuolas y que las células agotadas, que han permanecido sumergidas en el agua, muestran con frecuencia varias vacuolas pequeñas.

La citología de Saccharomyces cerevisiae ha sido recientemente investigada por científicos indios. Subramaniam (1945, 1946),

Subramaniam y Ranganathan (1945 a, 1945 b) y Ranganathan y Subramaniam (1947 a) han estudiado una cepa de esta levadura, afirmando que el número de cromosomas era de dos en el núcleo de la célula vegetativa. Afirman haber observado también un huso con centrosomas en las células en gemación. Sin embargo, es de notar que los dibujos que presentan son bastante esquemáticos y en su mayoría no concuerdan fácilmente con los de otros investigadores. A parte de esto, estos autores no aceptan la teoría de Lindegren sobre el núcleo, sugiriendo que los corpúsculos identificados por Lindegren como cromosomas serían mitocondrias.

Srinath (1946), empleando una combinación de fucsina básica y azul de toluidina, afirma haber encontrado seis pares de cromosomas en el núcleo de la célula vegetativa, mientras Naidu y Bakshi (1946 b) observan que seis cromosomas pasan a cada polo del huso durante la mitosis. Sin embargo, los «supuestos cromosomas» parecen estar dispersos por toda la célula durante la división nuclear.

Nagel (1946) estudia las células vegetativas de S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e con ayuda de numerosas técnicas citológicas, incluyendo la reacción de Feulgen, hematoxilina férrica de Heidenhain, Giensa, etc. Emplea una nomenclatura particular, llamando «magnicorp» a la gran vacuola, que según él es Feulgen negativa; «parvicorp» al corpúsculo Feulgen positivo, considerado por la mayoría de los autores como verdadero núcleo. No observa mitosis típica, aunque observa unidades especiales en el «parvicorp».

Levan (1947) considera también al corpúsculo exterior a la gran vacuola como núcleo verdadero. Cree que en la mitosis se pueden contar diez cromosomas en las células diploides, número mayor al indicado por la mayoría de los autores.

Recientemente Delamater (1949 a, 1950), empleando una técnica de tinción con fucsina, estudia la gemación de S. c e r e v i s i a e. Afirma que el corpúsculo Feulgen positivo que se encuentra fuera de la gran vacuola es el núcleo, y que no está unido a ella. Estudia el núcleo durante la mitosis, encontrando que en la profase aparecen dos pares de cromosomas, dos largos y dos cortos, y que el nucleolo degenera. Parece distinguir la aparición de un pequeño centriolo, que se divide en dos, pasando cada una de las dos partes a los polos del huso. Los cromosomas se dividen, y un grupo de cuatro pasa a cada polo. Cree, por tanto, que el número diploide es de cuatro. Finalmente hace una crítica de los trabajos de

Lindegren, fundándose en que el azul de metileno y el azul de toluidina no son colorantes específicos de la cromatina.

Winge (1951), cuyos estudios sobre genética de levaduras son de sobra conocidos, ha presentado recientemente una revisión de algunos de los conceptos en citología de levaduras, pero principalmente trata de la crítica de las investigaciones de Subramaniam y colaboradores. Según él, la mayoría de sus trabajos son de naturaleza superficial, no estando corroborados por suficiente evidencia citológica o genética. Presenta fotografías junto con una breve discusión de sus propios estudios citológicos, en los que investiga células tanto haploides como diploides, teñidas por la hematoxilina férrica de Heidenhain y la técnica de Feulgen. Sus figuras parecen indicar con más frecuencia un número base de dos corpúsculos teñidos, en el núcleo convencional, tanto en células haploides como en diploides, pero en ocasiones aparecen cuatro en las diploides. En una de las figuras se pueden ver dos de los supuestos cromosomas pasar a la yema, mientras que otros dos permanecen en la célula madre. Según observa Minge, esta descripción está, en parte, de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente por Badian. Winge (1952) revisa también la situación actual de la genética de levaduras.

Mientras que han sido muchos los que han estudiado la citología de las células de S. cerevisiae en gemación, pocos son los que han estudiado la división nuclear en las ascas. Esto es debido, sin duda, en parte a la dificultad de distinguir las ascas jóvenes de las células vegetativas. Se ha discutido el trabajo de Badian (1937) en el que saca la conclusión de que un grupo haploide de dos cromosomas es recibido por cada una de las cuatro ascosporas. Guilliermond (1936 b, 1940) ha observado que la cariogamia no sigue siempre inmediatamente a la plasmogamia en S. cerevisiae y en S. paradoxus, pero que en las células dicarióntica se pueden, por medio de división nuclear conjugada, producir yemas dicarióntica en las que se produce fusión nuclear. Guilliermond compara esto con la fase dicarionte de los Euascomicetos y de los Basidiomicetos.

Renaud (1937, 1938 a) confirma los resultados de Guilliermond, estableciendo, además, que algunas fusiones dicarióntica producen no sólo yemas dicarióntica, sino también yemas uninucleadas, que pueden conjugarse después para producir células diploides.

Los trabajos de Winge, Lindegren y otros sobre hibridación y segregación en las levaduras han contribuído mucho a una comprensión de los procesos meióticos, mucho más que lo han hecho las investigaciones

citológicas. Estas investigaciones han sido hechas primeramente con Saccharomyces y levaduras afines, tales como Saccharomycodes ludwigii y Zigosaccharomyces priorianus. Aunque la mayoría de las especies son heterotálicas, unas pocas son homotálicas. Winge y Laustsen (1939) llegan, no sólo a obtener híbridos, dentro de una sola especie, sino que obtienen híbridos interespecíficos en Saccharomyces. Uno de éstos está formado por el cruce de una especie hemotálica (S. cerevisiae). En un caso obtuvieron híbridos entre una cepa haploide de S. cerevisiae y otra, también haploide, de Zygosaccharomyces priorianus. Sin embargo, Winge y Lietz (1951), y últimamente Lodder y Van Rij (1952), consideran al género Zygosaccharomyces como idéntico a Saccharomyces.

Lietz (1951) encuentra un núcleo típico en Z. priorianus. Durante la gemación aparece en las células haploides un huso intranuclear con tres cromosomas, mientras que en las células diploides existen seis cromosomas. Observa en la profase nuclear del asca tres cromosomas bivalentes, creyendo que las dos divisiones sucesivas son meióticas. Encuentra que la plasmogamia puede producirse entre las ascosporas o entre dos yemas haploides. Sin embargo, este autor no puede comprobar la existencia de tipos de diferente compatibilidad en esta especie. Observó que la plasmogamia y la formación de las ascas se producía libremente en cultivos procedentes de una sola espora. Según Subramaniam (1950) Zigosaccharomyces y Schizosaccharomyces existen primeramente en la fase diploide.

Investigadores modernos afirman haber podido producir poliploides en S. cersvisiae. La mayoría de estos trabajos parecen arrancar del de Bauch (1942), que afirma haber obtenido razas gigantes y supergigantes con el empleo de productos químicos, tales como el acenafteno, el alcanfor y la heteroauxina. Subramaniam y colaboradores han publicado numerosos trabajos sobre este asunto. Afirman que el haber encontrado otros investigadores más de dos cromosomas era debido probablemente a haber estudiado razas poliploides. Subramanian y Ranganathan (1946), Subramaniam (1947 a, 1947 b, 1948 a, 1948 b, 1951), Ranganathan y Subramaniam (1948), Roya y Subramaniam (1952) y otros han descrito la formación de poliploides, algunos de los cuales resultan del empleo del acenafteno, con 3, 4, 5, 6, 8 y 18 cromosomas. Subramaniam (1948 b), en un trabajo sobre endoploidía, afirma que el llegar al máximo la fermentación, el núcleo llena casi por completo la célula, disminuyendo des-

pués de tamaño. Algunas de las llamadas células altamente poliploides contienen varias docenas de cromosomas. Rao y Subramanian (1952) afirman que estas células poliploides producen con frecuencia yemas con sólo dos cromosomas, en lugar del número poliploide que era de esperar. Lindegren y Lindegren (1951) han obtenido tetraploides y tripoides, con razones genéticas esperadas al segregarse en la formación de las ascas.

En un trabajo que se refiere en un principio al estudio genético de un mutante de Nadsonia richteri, Skovsted (1943) presenta algunas observaciones citológicas que tienden a confirmar las primeras investigaciones citológicas de Nadson y Konokotine (1926) sobre Nadsonia fulvescens y Nadsonia elongata. Saca la conclusión de que la cariogamia precede inmediatamente a la meiosis y que después de la segunda división meiótica degeneran generalmente tres núcleos, permaneciendo un núcleo haploide para la única ascospora.

Naidu y Bakshi (1946 a) emplea la técnica del azul de toluidina en el estudio de Candida utilis. manifestando que se produce división meiótica, con unos cuatro cromosomas bacilares que pasan a cada polo.

INVESTIGACIONES PROPIAS

Por nuestra parte, con el fin de poder comparar prácticamente los dos conceptos tan dispares, por una parte el concepto extravacuolar del núcleo, adoptado por la mayoría de los autores, y por otra el concepto vacuolar del mismo sostenido por Lindegren y su escuela, hemos tratado de repetir las técnicas de diversos autores, aplicándolas a una nueva especie de levadura aislada de concentrado de tanino: el Endomyces ovetensis Peláez y Ramírez (1955), que por tener dimensiones bastante regulares podía observarse con cierta facilidad con el microscopio óptico de que disponemos (1.000 X). Otras levaduras ensayadas han sido Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus I. J. F. M. 10, Torulopsis holmii I. J. F. M. 99, Nadsonia elongata I. J. F. M. 21 y Saccharomycodes ludwigii I. J. F. M. 17.

MATERIALES Y METODOS

El material empleado en nuestras experiencias ha sido cultivo puro de Endomyces ovetensis núm. I. J. F. M. 288 y de las levaduras

mencionadas anteriormente, conservado en agar malta y rejuvenecido en cada experimento. Es conveniente emplear cultivos jóvenes, ya que el acúmulo de glicógeno y gránulos oscurecería las estructuras, haciendo la interpretación muy difícil en los cultivos viejos.

Se han hecho en unos casos preparaciones permanentes pegando las levaduras sobre los portas con albúmina de Mayer y en otros se han examinado las células en suspensión.

Se han empleado los siguientes fijadores, cuya preparación indicaremos al tratar de cada caso: líquido de Bouin, sublimado-acético, iodo-formol-acético. Las preparaciones teñidas con hematoxilina férrica de Heidenhain fueron fijadas con líquido de Bouin o con sublimado-acético. Las preparaciones teñidas con el reactivo de Feulgen fueron fijadas con el sublimado-acético y las teñidas por la técnica de Robinow fueron fijadas con iodo-formol-acético.

Asimismo hemos empleado las técnicas de Towsend y Lindegren (1953) de tinción y montaje en suspensión, técnicas que detallamos seguidamente.

Técnicas de Towsend y Lindegren.

El teñir las levaduras sin tratamiento previo y observarlas luego directamente en el líquido de montaje tiene ciertas ventajas, pero las coloraciones son caprichosas y transitorias, si no se tienen en cuenta los efectos del pH, potencial redox y tono de las soluciones. Las preparaciones pueden observarse durante unos cuantos días, previa desecación por enfriamiento brusco, después de teñidas.

Las tinciones han de efectuarse en células desarrolladas en buenas condiciones de alimentación, en medios que contengan cantidades adecuadas de fosfatos, pues el azul de Toluidina sólo es efectivo en las células que contienen considerable cantidad de metafosfato. Después de rejuvenecer la levadura en agar malta, a 25° C., se resiembra a las cuarenta y ocho horas en el medio nutritivo siguiente:

Peptona	1 %
Extracto de levadura	1 %
PO_4H_2K	0,25 %
Glucosa	3 %
Agua corriente hasta completar 100 c. c.	

Se incuba a 25° C., obteniéndose resultados más uniformes si se airea el cultivo.

Tinción con azul de toluidina.

Material.—1.° Solución filtrada de azul de toluidina al 0,25 por 100 en agua destilada.

2.° Solución de agua oxigenada al 30 por 100.

3.° Solución tampón de pH 8, 5-8, 8, preparada añadiendo una solución de carbonato sódico 1/5 M. en cantidad suficiente, a una solución de bicarbonato sódico 1/5 M. (Con 25 c. c. de dicha solución de carbonato añadida a 500 c. c. de la solución de bicarbonato se obtiene un pH aproximado de 8,7.)

4.° Solución tampón de carbonato sódico de pH 11, consistente en una solución de carbonato sódico 1/8 M.

5.° Solución tampón de pH 8,1, mezclando solución de ácido bórico 3/10 M con solución de tetraborato sódico 1/10 M. (Con 100 c. c. de ácido bórico y 60 c. c. de tetraborato sódico se obtiene un pH de 8.1.)

Metódica.—Se toma 1 c. c. de líquido de cultivo, conteniendo aproximadamente 1 por 100 de levadura, y se echan en tres tubos de centrífuga tres muestras. Se centrifuga y se decanta. Se vuelve a centrifugar, después de haber hecho una nueva suspensión con las levaduras, en agua destilada. Se decanta de nuevo, se repite otro lavado, se centrifuga y se decanta, volviendo a suspender la levadura en el agua que queda en el fondo del tubo. Se añade entonces 0,05, 0,10 y 0,15 c. c. de solución de azul de toluidina a tres tubos, conteniendo cada uno 6 c. c. de solución tampón y 0,03-0,05 c. c. de agua oxigenada al 30 por 100, mezclando bien. Cada una de estas mezclas es introducida en uno de los tubos conteniendo la suspensión de levadura, agitándolo una sola vez de atrás adelante (el agitar demasiado produce aglutinación de las células). Después de pasados unos minutos, durante los que el colorante pasa por diversas fases, se pueden observar las levaduras en suspensión en el colorante.

Cada tinción se hace por triplicado, empleando tres concentraciones distintas de colorante, para ajustarse a las diferencias entre las células. Las estructuras delicadas son mejor observadas y los movimientos son más pronunciados con las concentraciones menores de colorante.

Tinción con sulfato de azul de Nilo.

Material.—1.° Una solución acuosa al 0,33 por 100 de sulfato de azul de Nilo.

2.° Solución tampón de bicarbonato sódico de pH 8,5-8,8.

3.º Solución tampón de bisulfito sódico 1/4 M.

4.º Solución tampón de carbonato sódico 1/4 M.

M e t ó d i c a . —Se preparan las suspensiones de levadura lavada lo mismo que se hizo para la técnica del azul de toluidina. Inmediatamente antes del empleo, se mezclan dos partes de tampón de bicarbonato y una parte de tampón de bisulfito (pH 6,5). Se preparan tubos con 6-7 c. c. de solución tampón y se les añade 0,05, 0,10 y 0,15 c. c. de colorante, mezclando bien. Cada una de estas soluciones de colorante tamponado se vierte sobre uno de los tubos con suspensión de levadura. Se mezcla bien y se deja descansar diez-quince minutos. Si se espera más tiempo, el colorante se precipitaría.

Con tampón alcalino el efecto es diferente. A cada tubo se añaden 3 c. c. de agua destilada y se mezclan con 0,05, 0,10 y 0,15 c. c. de colorante. Se evita la precipitación por exceso de álcali. Se añade una cantidad igual de carbonato sódico 1/4 M y se mezcla. El pH es de 10,5. Se añade la suspensión de levadura a cada mezcla de colorante y tampón, dejando reposar veinte-treinta minutos.

Hasta aquí las técnicas seguidas por Towsend y Lindegren. A continuación damos los detalles de las demás **técnicas empleadas en este trabajo.**

Las preparaciones han sido hechas sobre portas perfectamente desengrasados. Las levaduras son pegadas al porta por medio de una finísima capa de albúmina de Mayer o directamente. El porta sobre el que se ha extendido la albúmina es calentado suavemente sobre un mechero, hasta producción de humos, según aconseja La Cour (1941), antes de poner la suspensión de levadura a estudiar. Con la albúmina quedan pegadas al porta mayor número de células, pero con algunas técnicas de tinción tiende a teñirse ésta. En cambio, se pierden muchas células si son aplicadas directamente sobre el porta. Para poner la levadura sobre el porta, se echa sobre él una gotita de agua, añadiendo después con un asa la levadura, extendiéndola muy bien, o se añade directamente una suspensión de la levadura, esparciéndola con uniformidad sobre el porta. Esta operación debe hacerse rápidamente para evitar la desecación, lo que causaría muchas deformaciones en las células. Se sumergen entonces los portas, con la cara hacia abajo en la solución fijadora, en placas de Petri.

Fijadores empleados.—Se han probado diversos fijadores, habiendo adoptado los que aparentemente producían menos deformaciones, arru-

gamientos y granulaciones en el citoplasma. La desecación, incluso después de la fijación, produce deformaciones. La buena fijación está aparentemente relacionada con las condiciones de las células; así las células rejuvenecidas, en pleno desarrollo, se fijan mejor que las células viejas.

Seguidamente damos la composición de los fijadores empleados con mejores resultados:

S u b l i m a d o - a c é t i c o .—Solución acuosa saturada de Cl2Hg más 0,5-1 por 100 de ácido acético glacial. Se mantienen las preparaciones a fijar durante veinticuatro horas. Este fijador es el que ha dado mejores resultados generales.

I o d o - f o r m o l - a c é t i c o .—Solución acuosa de iodo al 1 por 100 y ioduro potásico al 1 por 100 ... ... 20 c. c.
Formol al 40 por 100 ... ... 4 c. c.
Acético glacial ... ... 0,5 c. c.
Agua destilada ... ... 5-10 c. c.

Se mantienen las preparaciones doce-veinticuatro horas en el fijador. Es el que da mejores resultados con el método de Giemsa-Robinow.

Otros fijadores ensayados, pero desechados por producir deformaciones o granulaciones en el citoplasma, han sido el de Carnoy, el de Flemming, la mezcla picro-formol-acético y el alcohol.

Métodos de tinción empleados en el estudio del núcleo de las levaduras.

R e a c t i v o d e F e u l g e n (C o l e m a n 1 9 3 8) . Después de fijación de las células por el sublimado-acético, se procede del modo siguiente:

1. Hidrolizar siete-ocho minutos en ClH N, calentando a 60° C.
2. Detener la hidrólisis lavando en agua fría.
3. Teñir cuatro-cinco horas con el reactico de Feulgen.
4. Lavar durante diez minutos en tres baños sucesivos de bisulfito sódico y ClH.

T i n c i ó n d e G i e m s a (R o b i n o w 1 9 4 2) . Después de fijación con iodo-formol-acético, se procede del modo siguiente

1. Hidrolizar siete-diez minutos en ClH N, a temperatura de 60° C.
2. Detener la hidrólisis lavando con agua destilada fría.
3. Lavar con agua destilada a pH 7 hasta eliminar todo rastro de acidez.
4. Teñir con el colorante de Giemsa (una gota de colorante por c. c.

de solución tampón a pH 6,9-7,0) durante quince-cuarenta y cinco minutos.

5. Pasar la preparación por las siguientes mezclas de acetona y xilol:

A.	20 : 1	4-30 segundos.
B.	14 : 6	10-30 segundos.
C.	6 : 14	10-15 segundos.

6. Xilol puro durante diez-quince minutos, después de lo cual se monta en bálsamo neutro.

Tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain.—Después de fijación con sublimado-acético se procede como sigue:

1. Mordentar en solución acuosa al 4 por 100 de alumbre de hierro durante veinticuatro horas.
2. Lavar abundantemente.
3. Teñir con hematoxilina de Heidenhain durante veinticuatro horas.
4. Decolorar con solución saturada de ácido pícrico en agua destilada (Tuan, 1930).

RESULTADOS OBTENIDOS

Observación de las células en fresco.—Después de cultivar la levadura Endomyces ovetensis, número I. J. F. M. 288, en el medio siguiente, aconsejado por Towsend y Lindegren:

Glucosa	16	gr.
PO_4H_2K	0,8	gr.
Cl_2Ca	0,2	gr.
$PO_4H_2NH_4$	4,0	gr.
$SO_4Mg.7H_2O$	0,16	gr.
Extracto de levadura	2	c. c.

Agua destilada hasta 400 c. c. a 25° C. y en condiciones relativamente anaerobias, llenando un matraz hasta el cuello.

A las veinticuatro horas se observan fenómenos parecidos a los vistos por dichos autores en Saccharomyces cerevisiae; primeramente se ve en la vacuola un corpúsculo diminuto, que se mueve rápidamente y que aumenta de tamaño. Es de forma irregular y muy va-

riable. Más tarde se observan uno o más filamentos que parecen interrumpidos en forma de rosario (figura 1, núm. 1). En la figura 1, núm. 2, se observan en las vacuolas 1-2 corpúsculos esféricos bastante grandes (según Lindegren es el nucléolo).

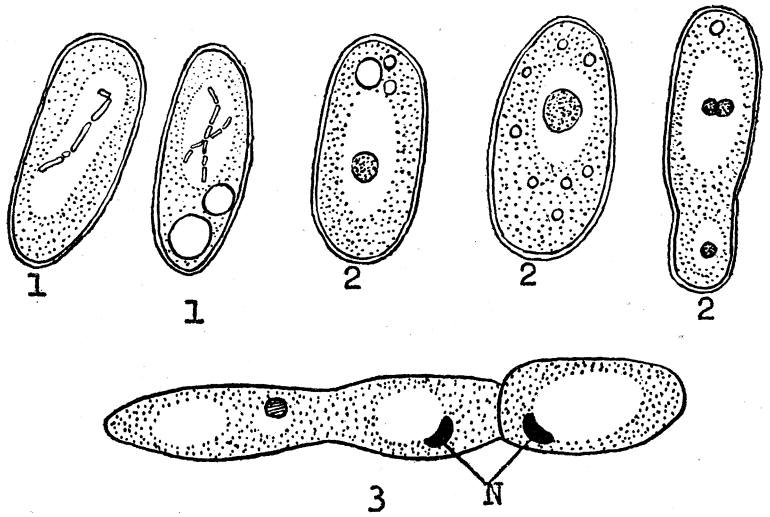


Fig. 1.—Endomyces ovetensis *IJFM 288.—Núm. 1. Células vivas, observadas en suspensión. Obsérvense las cadenas de bacilos (1.000 X).—Núm. 2. Células vivas, en suspensión. Obsérvense en las vacuolas los corpúsculos esféricos (nucleolos de Lindegren) (1.000 X).—Núm. 3. Células teñidas con sulfato de azul de Nilo a pH 6,5; N núcleos (?) (centrocromatina de Lindegren) (1.000 X).*

Observación de las células de Endomyces ovetensis, número I. J. F. M. 288, teñidas según las técnicas de Towsend y Lindegren (1953).

Tinción con azul de toluidina.—Al emplear como tampón el de pH 8,1 (ácido bórico-tetraborato sódico) se observan largos filamentos arrosariados dentro de las vacuolas (fig. 2, A), parecidos a los que se veían en las células sin teñir. Aquí están teñidos de rojo. Pero las formas que se encuentran con más frecuencia son bacilos gruesos, que pueden encontrarse unidos por parejas o libres. Hemos llegado a encontrar hasta dos parejas en una sola vacuola (fig. 2, B-E, G). En las células jóvenes, en lugar de gruesos bacilos, se ven bacilos más cortos y finos en mayor número (hemos llegado a contar hasta seis), dispersos por la vacuola o dispuestos de modo que un extremo está próximo a!

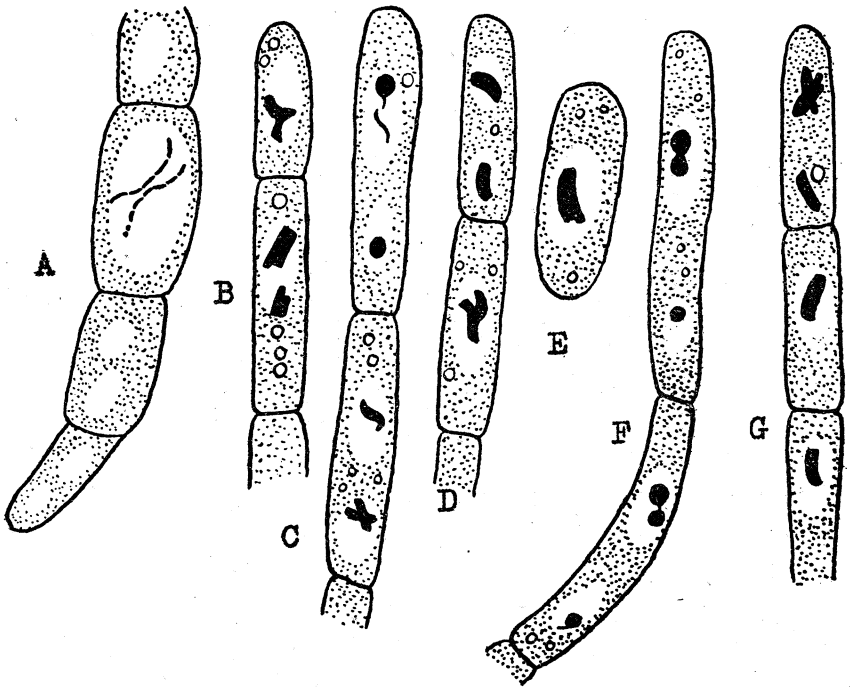


Fig. 2.—Endomyces ovetensis *IJFM 288 (1.000 X).—A. Micelio teñido con azul de toluidina a pH 8,1.—B-E, G. Micelio teñido con azul de toluidina a pH 8,1, obsérvense los gruesos bacilos en parejas.—F. Micelio teñido con azul de toluidina a pH 8,7, obsérvense los corpúsculos esféricos (nucleolos de Lindegren).*

límite interno de la vacuola (fig. 3) (son los supuestos «cromosomas» de Lindegren) o siguiendo paralelos a él (fig. 3).

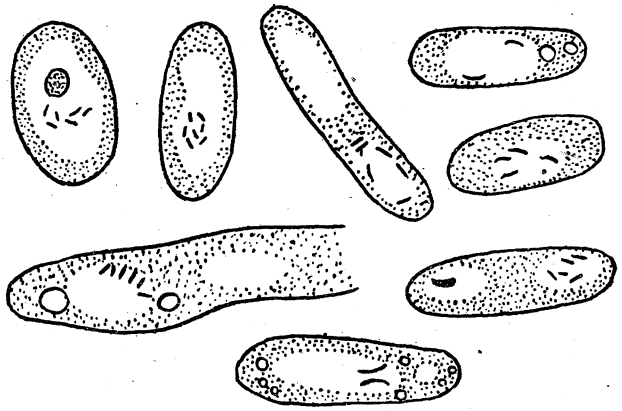


Fig. 3.—Endomyces ovetensis *IJFM 288 (1.000 X). Células teñidas con azul de toluidina a pH 8,1. Obsérvense en las vacuolas los grupos de finos bacilos (cromosomas de Lindegren).*

Empleando como tampón el de pH 8,7 (bicarbonato sódico-carbonato sódico) se observan corpúsculos redondos, teñidos de rojo, movedizos, uno o dos en cada vacuola (fig. 2, C, F) y unos gruesos bacilos teñidos de azul oscuro, dobles o sencillos.

Cuando se emplea tampón de carbonato sódico a pH 11,0, el jugo vacuolar se tiñe de rosa, lo que, según Lindegren, sería debido a que algo de metafosfato se habría disuelto en el jugo vacuolar. Seguidamente aparecen corpúsculos esféricos de color rojo dentro de la vacuola, que se mueven libremente en ella. Más tarde toman color azul.

Tinción con sulfato de azul de Nilo.—Con esta tinción, empleando tampón ácido, se tiñe un corpúsculo extravacuolar de color azul oscuro (fig. 1, núm. 3) sobre todo en las células jóvenes. Este corpúsculo podría corresponder a la llamada «centrocromatina» de Lindegren o al núcleo de la mayoría de los autores.

Con tampón alcalino el citoplasma permanece incoloro y las mitocondrias se tiñen de rojo anaranjado.

Tinción por la técnica de Feulgen.—En todas las células se observa una estructura Feulgen positiva, extravacuolar, que parece coincidir con la estructura que se teñía con el azul de Nilo, según

se describe anteriormente. Pero el inconveniente de esta técnica es que tiñe débil y con desigualdad.

Tinción con la hematoxilina férrica de Heidenhain.—Con esta tinción aparecen estructuras semejantes a las observadas con el reactivo de Feulgen, pero teñidas en negro. Según se decolore más o menos con la solución de pícrico se observará una región

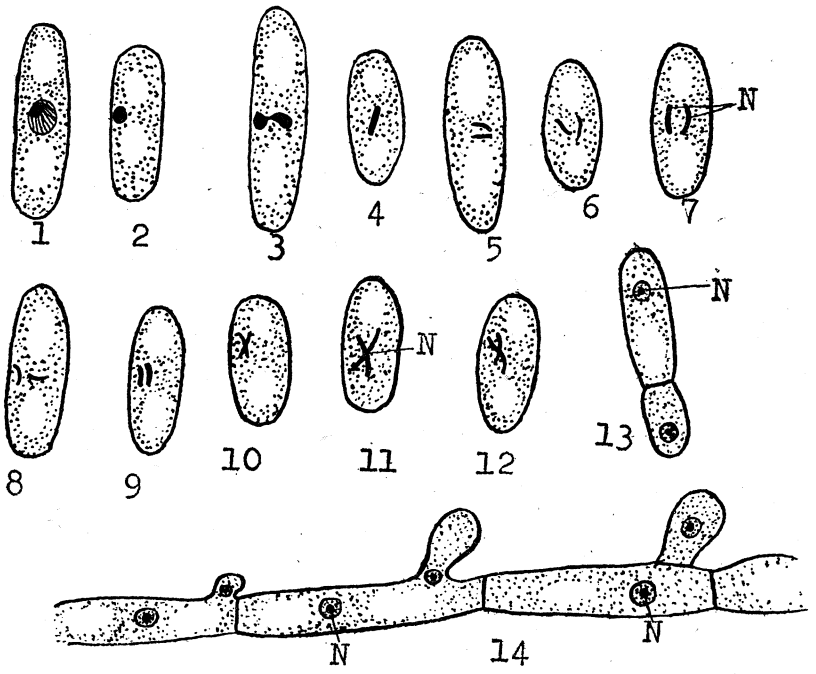


Fig. 4.—Endomyces ovetensis *IJFM 288 (1.000 X). Diversas fases de división nuclear durante la gemación; mitosis (?). N, núcleo. Tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain.*

central de color negro intenso y una zona circundante más clara (fig. 4, números 1, 13, 14) que se destaca perfectamente del resto del citoplasma. Esta estructura puede adoptar formas diversas (fig. 4, núm. 4-14).

Tinción de Giemsa-Robinow.—Esta técnica ha proporcionado los mejores resultados, pues se consigue una tinción muy clara de las estructuras. Con esta técnica se logra teñir las estructuras Feulgen positivas con más intensidad, contrastando perfectamente con el citoplasma y coincidiendo con las teñidas por las técnicas de Heidenhain.

DISCUSION

Sin pretender sacar conclusiones definitivas resumiremos los hechos, sugiriendo su interpretación.

Siguiendo el criterio de la mayoría de los autores, que nos parece el más lógico, creemos que la reacción Feulgen positiva de las estructuras observadas por nosotros parecería indicar su naturaleza nuclear, pues ya que se ha extraído de las células de levadura ácido desoxiribonucleico semejante al de los núcleos animales (Delaporte y Roukhelman, 1938, y Delaporte, 1939), la reacción nuclear debería obrar, lógicamente, del mismo modo en ambos, a no ser que dicha reacción no fuese tan específica como afirman sus autores.

Las células teñidas según las técnicas de Feulgen y de Robinow presentan unos corpúsculos extravacuolares, redondeados o irregulares, coloreados de rojo a rojo violáceo. Son visibles en todas las fases de división, en las células teñidas con reactivos de Feulgen, Giemsa-Robinow y hematoxilina férrica de Heidenhain, pero rara vez son visibles en las células vivas; sin embargo, en las células vivas de Endomyces ovetensis hemos llegado a observarlos bastante bien. Guilliermond (1919) parece haber sido el primero en describir una estructura semejante, teñida con hematoxilina férrica de Heidenhain. Margolena (1932) afirma que la reacción de Feulgen tiñe los núcleos de las levaduras. Por nuestra parte no hemos encontrado, por ahora, ninguna otra estructura

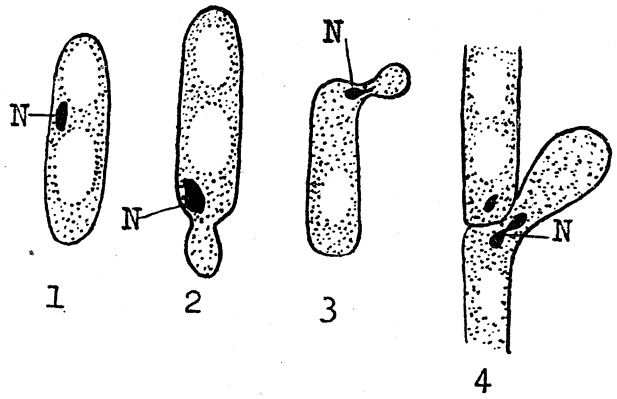


Fig. 5.—Endomyces ovetensis *IIFM 288 (1.000 X). Amitosis observada, tanto en las células aisladas en gemación (1-3), como en la gemación del micelio (4). N, núcleo. Tinción de Giemsa-Robinow.*

que pueda ser interpretada verosímilmente como núcleo, si no es la estructura Feulgen positiva mencionada.

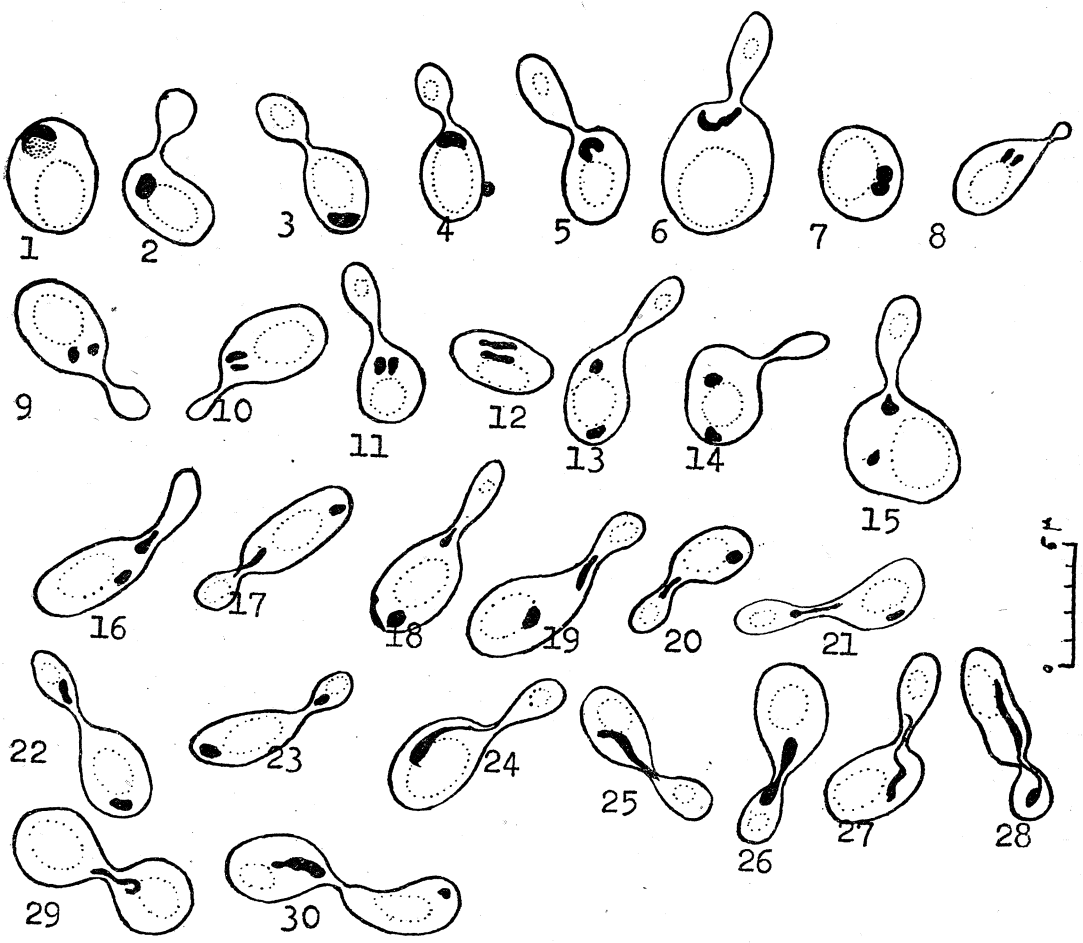


Fig. 6.—Saccharomyces cerevisiae, var. ellipsoideus *IJFM 10 (1.000 X). Diversas fases de división del núcle durante le gemación de la levadura, teñidas por el método de Giemsa-Robinow. 1-23. Mitosis (?). 24-30. Ami tosis (?).*

Esta estructura (llamémosla núcleo) parece dividirse unas veces por amitosis durante la gemación de la levadura (fig. 5, núm. 1-4; fig. 6, número 24-30; fig. 7, núm. 1-12; fig. 8, núm. 10; fig. 9, núm. 6-12) y otras veces parece existir una mitosis más o menos típica (fig. 4, núm. 1-

14; fig. 6, núm. 1-23; fig. 7, núm. 13-17; fig. 8, núm. 1-9; fig. 9, núm. 1-5). Los medios de que disponemos no nos han permitido observar detalles en la mitosis, pero en algún caso (fig 7, núm. 18) nos parece haber

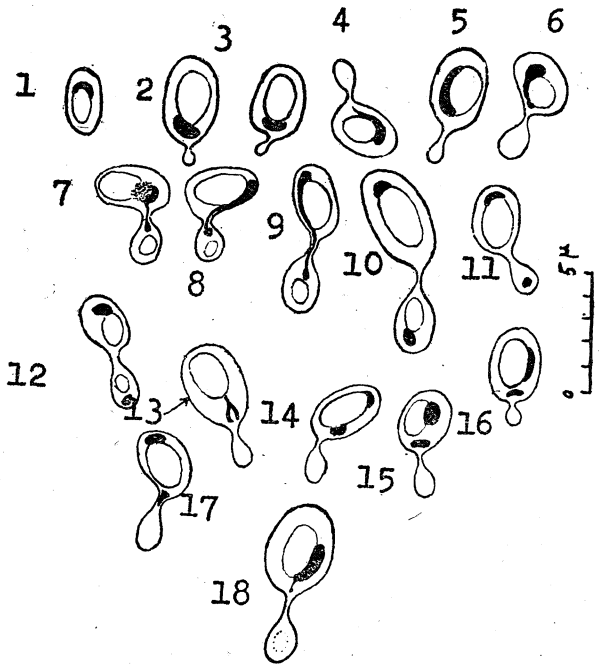


Fig. 7.—Torulopsis holmii *IJFM 99 (1.000 X). Diversas fases de la división nuclear de la levadura durante la gemación. Tinción de Giemsa-Robinow. 1-12. Amitosis. 13-18. Mitosis (?). 18. Obsérvese un supuesto centriolo (?) unido al núcleo por un fino filamento.*

observado, junto al núcleo, un punto teñido de rojo más intenso que el núcleo y posiblemente unido a él por un filamento finísimo que parecía dirigirse a la yema (centriolo ?).

El hecho de que un grupo de investigadores, entre ellos Guilliermond (1919), Wager y Penniston (1910), crean que la división nuclear de las levaduras en gemación es amitótica, mientras que otros piensan que es mitótica (Kaier, 1927; Swellengrebel, 1905), necesita una explicación del fenómeno de la división. El descubrimiento de la mitosis, y el haberla encontrado como modalidad general de división nuclear, tanto en el

reino animal como en el vegetal, indujo a pensar que la amitosis no era un proceso normal. Algunos autores incluso pensaron que era un proceso patológico en células degeneradas. Pero, siguiendo a Conklin (1917), se puede decir que el número de casos en que se ha obser-

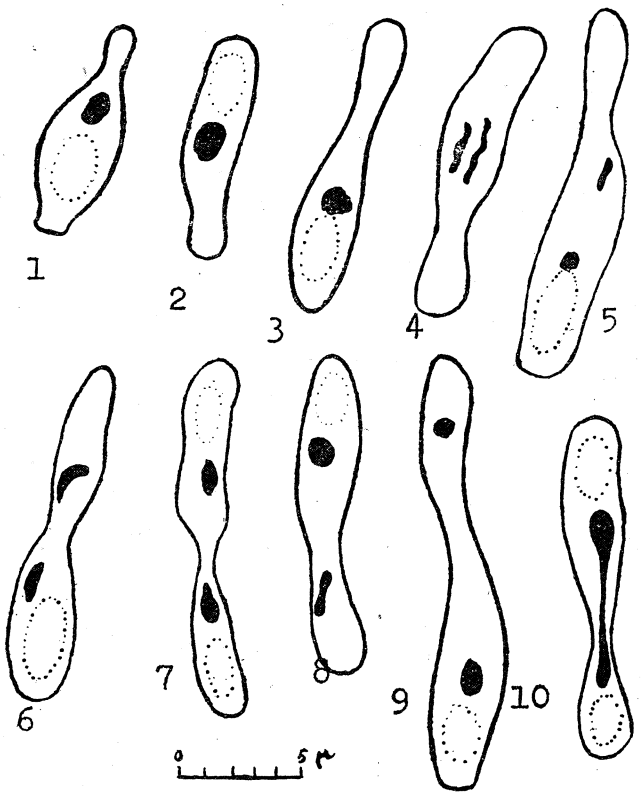


Fig. 8.—Saccharomycodes ludwigii *IJFM 17 (1.000 X). Diversas fases de la división nuclear durante la gemación de la levadura. 1-9. Mitosis (?). 10. Amitosis (?). Tinción por el método de Giemsa-Robinow.*

vado amitosis con regularidad, en ciertos tejidos, es demasiado elevado para poder asegurar que sea siempre un proceso patológico. Sin embargo, algunos autores rechazan la amitosis y defienden la mitosis en las levaduras, simplemente para estar de acuerdo con los razonamientos de la genética moderna. Es probable que del estudio genético se llegue a tener un conocimiento exacto, aunque indirecto, de la célula

de levadura; así los trabajos de Lindegren y Spiegelman (1944) y Winge (1939, 1944) demuestran regularidad en la segregación mendeliana de los caracteres durante la división nuclear. Las cepas diploides, que

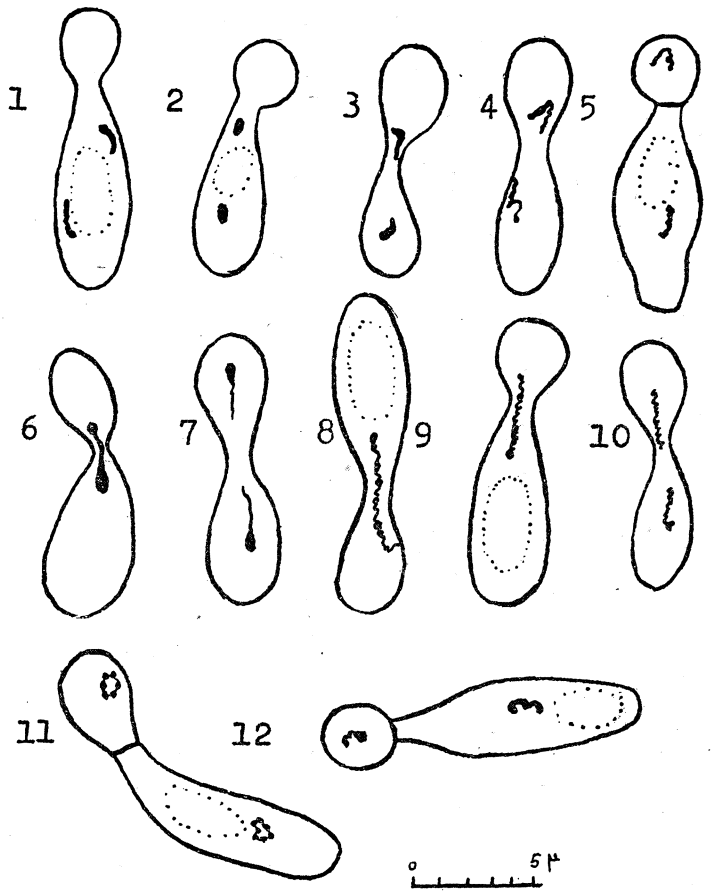


Fig. 9.—Nadsonia elongata *IJFM 21 (1.000 X). Diversas fases de la división nuclear durante la gemación de la levadura, teñida por el método de Giemsa-Robinow. 1-5. Mitosis (?). 6-12. Amitosis (?).*

se multiplican sólo vegetativamente, son estables y conservan sus características culturales, como era de suponer; en cambio, las cepas haploides proporcionan un tanto por ciento de mutaciones mucho más elevado. Esto se observa fácilmente en las colonias gigantes, donde las cepas

haploides muestran numerosos sectores de mutación que generalmente faltan en las diploides. Los autores partidarios de la mitosis en las levaduras se basan en estos resultados; pero ya que la división podría ser intranuclear, como en muchos hongos, y unido esto al tamaño pequeñísimo de las estructuras, no hemos podido observar cromosomas con el microscopio ordinario. Cierto número de investigadores han observado la división del núcleo en dos corpúsculos, dándoles el nombre de cromosomas. Nosotros los hemos observado también, unas veces paralelos entre sí y otras cruzados (fig. 4). Si son cromosomas o no, no estamos en condiciones de poderlo afirmar por el momento, aunque resultan un poco grandes comparados con el resto de la célula de levadura.

Por otra parte, los trabajos de Richard (1938), repetidos y confirmados por Beams y colabaradores (1940), demostrando que la colchicina no inhibe la gemación de las levaduras, sino que tiende a favorecerla, parecen aportar una prueba en favor de que el mecanismo de la gemación podría verificarse por un proceso amitótico, pues la colchicina tiene la propiedad de destruir los husos y bloquear la división del citoplasma en las células animales y vegetales que se dividen por mitosis.

Los hechos observados por nosotros: presencia de amitosis y mitosis (?) en las levaduras en gemación, nos hacen sugerir la idea de que podrían conciliarse las opiniones opuestas de los autores sobre este punto, suponiendo que, según las circunstancias, podrían presentarse ambas modalidades de división nuclear.

La vacuola entra en la yema antes que el núcleo y, según Lindegren (1945), esto tiene importancia en la iniciación de la yema. Si dentro de la vacuola se observan partículas, éstas entran también en la yema y a veces parecen emparejadas. Estos fenómenos, como ya dijimos anteriormente, dieron lugar a la interpretación de Wager y Penniston (1910) y Lindegren (1945) de que la vacuola y su contenido representan la «vacuola nuclear» y «los cromosomas», respectivamente. Aunque la vacuola y su contenido son Feulgen negativos en todas sus fases de desarrollo, Lindegren (1945) intenta salir del paso diciendo que la naturaleza desoxiribonucleoproteica (Feulgen positiva) del núcleo de los organismos superiores no implica necesariamente su presencia universal en la cromatina de los organismos más sencillos; razonamiento que no parece demasiado sólido, desde el momento en que se ha extraído de las levaduras ácido desoxiribonucleico.

CONCLUSIONES

1. Las levaduras observadas por nosotros parecen tener un núcleo definido, compacto, que da reacción positiva con el método de Feulgen y de Giemsa- Robinow.

2. El estudio citológico muestra, al parecer, que la división nuclear, durante la gemación, puede ser tanto mitótica (?) como amitótica.

3. Nuestras observaciones no están de acuerdo con la teoría vacuolar del núcleo.

BIBLIOGRAFIA

BADIAN, T.—1937. Sur la citologie des levures. **Bull. Int. Acad. Polon. Sci. et Lettres,** 5B: 61-87.

BAUCH, R.—1942. Chemogenetische Untersuchungen an der Hefe. **Ber. Deut. Bot. Ges.** 60: 42-63.

BEAMS, H. W.; L. W. ZELL and **N. M. SULKIN.**—1940. Cytological studies on yeast cells with special reference to the budding process. **Cytologia.** 11: 30-36.

BRANDT, M.—1941. Physiologische Chemie and Cytologie der Presshefe (ein Sammelbericht und neue Untersuchungen im ultra-violetten Licht und gefarbten Material). **Protoplasma.** 36: 77-119.

CASPERSSON, T., and **J. SCHULTZ.**—1940 **Proc. Nat. Ac. Sci.** 26: 507-517.

COLEMAN, L. C.—1938. Preparation of Leucobasic fucsin for use in the Feulgen reaction. 13: 123-124.

CONKLIN, E. G.—1917. Mitosis and amitosis. **Biol. Bull.** 33: 396-416.

DeLAMATER, E. D.—1949. The nuclear cytology of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Am. J. Bot.** 36: 808.

——— 1949 b. Nuclear cytology of fungi. **Trans. N. Y. Acad. Sci.** 11: 162-164.

——— 1950. The nuclear cytology of the vegetative diplophase of *S. cerevisiae*. **J. Bact.** 60: 321-332.

DELAPORTE, B.—1939. Sur les acides nucléiques des levures et leur localisation. **Rev. Gén. Bot.** 51: 449-482.

——— et **B. N. PHOUKHELMAN.**—1938. Sur la présence de la thya-

mine dans l'acide nucléique extrait des levures. **Compt. Rend. Ac. Sci.** (Paris). 206: 1.399-1.401.

GUILLIERMOND, A.—1919. The yeasts. John Wiley and Sons.

——— 1928. Recherches sur quelques Ascomycètes de la stigmatomycose des graines de cotonnier. Essai sur la phylogénie des Ascomycètes. **Rev. Gén. Bot.** 40: 328-342; 397-414; 474-485; 555-574; 606-624; 690-704.

——— 1936. Nouvelles observations sur la sexualité des levures et quelques observations sur la phylogénie des champignons. **Rev. Gén. Bot.** 48: 403-426; 470-493.

——— 1940. Sexuality, developmental cycle of yeasts. **Bot. Rev.** 6: 1-24.

HENRICI, A. T.—1941. The yeasts. **Bact. Rev.** 5: 97-179.

KATER, J. M.—1927. Cytology of S. cerevisiae with special referance to the nuclear division. **Biol. Bull.** 52: 436-448.

——— 1940. Amitosis I. **Bot. Rev.** 6: 164-180.

——— 1951. Amitosis II. **Bot. Rev.** 17: 105-108.

LA COUR, L.—1941. Acetic orcein: a new stain-fixative for chromosomes. **Stain Technology.** 16: 169-174.

LEVAN, A.—Studies on the camphor reaction of yeast. **Hereditas.** 33: 457-514.

LIETZ, Klaus.—1951. Beitrag zur Hefecytologie. **Arch. Mikrob.** 16: 275-302.

LINDEGREN, C.—1945 a. An analysis of the mechanis of budding in yeasts and some observations on the structure of yeast cell. **Mycologia.** 37: 767-780.

——— 1945 b. Yeast genetics. Lyfe cycles, cytology, hybridization, vitamin synthesis, and adaptative enzimes. **Bact. Rev.** 9: 111-120.

——— 1947. Function of volutin (metaphosphate) in mitosis **Nature.** 4.028: 63-64.

——— 1948. The origin of volutin on the chromosomes, its transfer to the nucleolus, and suggestion concerning the significance of this phenomenon. **Pric. Nat. Acad. Sci.** 34: 187-193.

——— 1949. The yeast cell, its genetics and cytology.

——— 1951 a. The mechanism of budding and copulation in Saccharomyces. **Exp. Cell. Res.** 2: 305-311.

——— 1951 b. The relation of metaphosphate formation to cell division in yeast. **Exp. Cell. Res.** 2: 275-278.

——— 1952. Symposia of the Society for experimental Biology. 6: 277-289.

——— and **G. LINDEGREN.**—1946. The cytogene theory. **Cold Spring Harbor Symposium of Quant. Biol.** 11: 115-129.

——— and **G. LINDEGREN.**—1951. Tetraploid Saccharomyces. **Jour. Gen. Microb.** 5: 885-893.

——— and **C. SPIEGELMAN** and **G. LINDEGREN.**—1944. Mendelian inheritance of adaptative enzimes in yeast. **Nat. Ac. Ssi. Proc.** 30: 346-352.

LODDER, J., and **N. J. W. Kreger-Van Rij.**—1952. «The Yeasts». Amsterdam.

MARGOLENA, L. A.—1932. Feulgen's and some of its application for botanical material. **Stain Techn.** 7: 9-16.

NADSON, G., and **KONOKOTINE.**—1926. Etude Cytologique sur les levures à copulation Heterogamique du genre «Nadsonia». **Ann. Sci. Nat. Serie Bot. et Zool.** VIII.

NAGEL, Lillian.—1946. A cytological study of yeasts. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 33: 249-281.

NAIDU, M. R., and **V. M. BAKSHI.**—1946 a. The chromosomes number in Torula utilis. **Current Sci.** 15: 164.

——— 1946 b. The cytology of yeasts. **Current Sci.** 15: 231.

PELAEZ CAMPOMANES, F., y **C. RAMIREZ GOMEZ.**—1955. Una nueva especie de Endomyces: Endomyces ovetensis. **Microbiología Española** (en prensa).

RAFALCO, J. S.—1946. **Stain Techn.** 21: 91-93.

RANGANATHAN, B., and **SUBRAMANIAM, M. K.**—1947. Centrosomes in yeasts. **Sci. and Cult.** 12: 478-481.

——— 1948. Studies on the cytology of yeasts V. Normal and abnormal mitosis in distillery yeast. **Proc. Nat. Inst. Sci. India.** 14: 389-405.

RAO, L. S. P., and **M. K. SUBRAMANIAM.**—1952. Somatic chromosomal reduction in yeast. **Arciv. f. Mikrob.** 17: 160-165.

RENAUD, J.—1937. Sur un Saccharomyces présentant dans sa sexualité de curieuses anomalies dues à un état dicaryontique de ses zigospores. **Compt. Rend. Acad. Sci.** (Paris). 204: 1.275-1.276.

——— 1938 a. Sur l'existence du dicaryon chez un Saccharomyces isolé du vin. **Compt. Rend. Acac. Sci.** (Paris). 206: 1.397-1.398.

——— 1938 b. Sur la digision du noyau des levures au cours du bourgeonnement; mise en évidence d'un centrosome et de la mitose. **Compt. Rend. Acad. Sci.** (Paris). 206: 1.918-1.920.

RICHARD, O. W.—1938. Colchicine stimulation of yeast growth Fails to reveal mitosis. **J. Bact.** 36: 187-195.

ROBINOW, C. F.—1942. A Study of the nuclear apparatus of bacteria. **Roy. Soc. London. Proc. B.** 130: 299-324.

ROCHLIN, Emilia.—1933. Uber die Nuklearreaction bei Hefen. **Zentralb. Bakt.** 88: 304-306.

ROYAN, S., and **M. K. SUBRAMANIAM.**—1951. Critical evidence for mitosis in yeasts. **Current Sci.** 20: 161-162.

——— 1952. Critical evidence for somatic doubling of chromosomes in a top yeast. **Nature** (London). 169: 932.

SINOTO, Y., and **A. YUASA.**—1941. Karyological studies in Saccharomyces cerevisiae. **Cytologia.** 11: 464-472,

SKOVSTED, A.—1943. Succesive mutation in Nadsonia richteri Kotska. **Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Phys.** 23: 409-453.

SRINATH, K. V.—1946. The chromosomes number of S. cerevisiae. **Current Sci.** 15: 50-51.

SUBRAMANIAM, M. K.—1945. Induction of polyploidy in S. cerevisiae. **Current Sci.** 14: 234.

——— 1946. Studies on the cytology of yeasts. I. Mitosis in S. cerevisiae. **Proc. Nat. Inst. India.** 12: 143-149.

——— 1947 a. Studies on the cytology of yeasts. II. Induction of polyploidy and heterochromatin. **Proc. Nat. Inst. India.** 13: 129-139.

——— 1947 b. Endopolyploidy in yeast. **Current Sci.** 16: 157-158.

——— 1948 a. Studies on the cytology of yeasts. III. The technique of handling yeast for cytological investigationi. **Proc. Nat. Inst. Sci. India.** 14: 315-332.

——— 1948 b. Studies on the cytology of yeasts. IV. Endopolyploidy in yeasts. **Proc. Nat. Inst. India.** 14: 325-333.

——— 1950. Haploidy and the species concept in yeasts. **Journ. Indian Inst. Sci.** 32 A: 41-50.

——— 1951. Tetraploidy in yeasts. La cellule 54: 145-148 ond Ranganathan B. 1945 a. Mitosis during budding in Saccharomyces cerevisiae. **Current Sci.** 14: 78-79 and Ranganathan. 1945 b. The chromosomes number of S. cerevisiae. **Current Sci.** 14: 131-132.

SUBRAMANIAN, M. K., and **B. RANGANATHAN.**—1946. Peculiar cytological behavior of a distillery yeasts. **Nature** (London). 157: 50-51.

SWELLENGREBEL, M.—1905. Sur la division nucléaire de la levure préssée. **Ann. Inst. Pasteur.** 19: 503-514.

TOWSEND, G. F., and **C. LINDEGREN.**—1953. Structures in the yeast cell revealed in wet mounts. **Cytologia.** 18: 183-201.

TUAN, H.—1930. Picric acid as a destaining agent for iron alum. **Stain Techn.** 5: 135-138.

WAGER, H., and **PENNISTON, A.**—1910. Cytological observation on the yeast plant. **Ann. Bot.** 24: 45-84.

WIAME, J. M.—1946. **Bull. Soc. Chim. Biol.** 28: 552.

WINGE, O.—1951. The relation between yeast cytology and genetics: a critique. **Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Phys.** 25: 85-99.

——— 1952. The basis for the present position of yeast genetics. **Wallerstein Commun.** 15: 21-44.

——— 1944. On segregation and mutation in yeast. **Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Phys.** 24: 79-95.

——— and **O. LAUSTSEN.**—1939. On 14 new yeast types produced by hybridization. **Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Phys.** 22: 337-350.

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

ESTUDIOS SOBRE LA FERMENTACION DEL ESPARTO

II. FLORA DE LA FERMENTACION EN LAS BALSAS

por
Vicente Callao y Enrique Montoya.

En el curso de los trabajos que sobre la fermentación del esparto vienen realizándose en nuestro laboratorio, la flora microbiana presente en el enriado, a la que, en definitiva, se deben toda la suerte de procesos bioquímicos responsables del mismo, no había sido estudiada hasta ahora con la atención que se merecía. Acerca de ella solo conocemos el trabajo publicado por Callao y Vigaray (1) en 1951, en el que se describen ocho bacterias que a su juicio toman parte activa en el citado proceso. Ahora bien, dichas bacterias fueron aisladas de un enriado artificial realizado en el laboratorio, en el cual se excluía la contaminación por las bacterias del aire, suelo y, lo que es más importante, de los lodos activos procedentes de anteriores enriados, presentes todas ellas en el enriado industrial. Por estas razones era de suponer que la composición de la flora del citado enriado industrial variaría grandemente de la determinada en las condiciones antes dichas. Dado que es imprescindible un conocimiento exacto de dicha flora para explicar los procesos bioquímicos que llevan a término el enriado, se comprenderá la importancia de un estudio de la flora de la fermentación en las balsas.

En el presente trabajo hacemos un estudio detallado de la flora, tanto aerobia como anaerobia, que se encuentra en las aguas de maceración del enriado industrial del esparto y al mismo tiempo efectuamos recuentos sistemáticos del número de gérmenes presentes en cada momento. Discutimos la posible acción de cada germen o grupo de gérmenes

sobre los distintos procesos bioquímicos y sobre el enriado en general y, por último, damos un esquema de lo que, a nuestro juicio, constituye el mecanismo del enriado.

MATERIAL Y TECNICAS USADOS

Hemos utilizado para nuestros análisis bacteriológicos las aguas de balsas de la «Espartera, S. A.», entidad industrial situada a unos dos kilómetros de Granada. En dicha industria, el enriado, que se lleva a cabo en balsas o depósitos de cemento capaces para 3.000 kgs. de esparto crudo, se efectúa cubriendo totalmente con agua el material y dejándolo fermentar durante un tiempo que oscila entre los nueve y quince días, según la temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo se renueva totalmente el agua y se deja otra vez fermentar durante ocho a diez días, al cabo de los cuales se da por terminado el proceso.

Las aguas de maceración, a medida que va avanzando el proceso, van adquiriendo turbidez, debido, de una parte, al paso al agua de substancias procedentes del esparto y, de otra, a la intensa reproducción microbiana. Al mismo tiempo van adquiriendo un color amarillento parduzco, que se acentúa conforme pasa el tiempo, así como también un olor desagradable a materia orgánica en putrefacción. La superficie de la balsa se recubre pronto de un velo grasiento, amarillo oscuro, que tiende a engrosar conforme avanza el enriado y que se ve constantemente atravesado por numerosas burbujas de gases, cuyo máximo desprendimiento tiene lugar durante la primera fase del proceso.

La toma de muestras la hemos efectuado de estas aguas mediante pipetas estériles y a profundidades comprendidas entre los 30 y 40 cms.

Como medio de aislamiento hemos utilizado un agar extracto de esparto, añadido de glucosa en proporción de 0,5 grs. por 100 y de indicador de Andrade.

Como medio de enriquecimiento para los anaerobios esporulados hemos utilizado el citado medio en su forma líquida y sin la adición del indicador.

El recuento total de bacterias aerobias lo hemos efectuado sobre agar

glucosado y tornasolado, al objeto de poder contar las bacterias productoras de ácidos.

Los medios de identificación y conservación han sido los usualmente empleados en la técnica microbiológica.

RESULTADOS OBTENIDOS

Las especies que hemos aislado en los análisis efectuados a lo largo de cuatro procesos completos de enriado han sido las que a continuación se exponen, clasificadas y denominadas todas ellas de acuerdo con el manual de Bergey (2):

Germen núm. 1.—Nitrosomonas europea. Este germen aparece durante todo el enriado, especialmente durante la última fase.

Germen núm. 2.—Nitrosococcus nitrosus. Aparece durante todo el enriado, especialmente durante las últimas fases.

Germen núm. 3.—Nitrobacter agile. Aparece durante todo el enriado, especialmente durante las últimas fases.

Germen núm. 4.—Pseudomonas cruciviae. Suele empezar a aparecer hacia el final de la primera etapa, para perdurar hasta el final del enriado.

Germen núm. 5.—Pseudomonas sp. Este germen, no identificado como ninguno de los descritos en el Bergey, es un bacilo muy pequeño, de extremos redondeados y eje recto, Gram negativo y móvil mediante un solo flagelo polar. Sobre agar produce colonias pequeñas, redondeadas, transparentes, lisas y brillantes. En caldo da enturbiamiento uniforme con ligero sedimento. Leche tornasolada inalterada a los cuatro días. Picadura en gelatina: crecimiento filiforme sin licuación. Aerobio. Indol negativo; rojo de metilo y Voges-Proskauer negativos; nitritos de nitratos positivos; amoníaco negativo; glucosa, lactosa y manita no fermentadas; sacarosa y maltosa fermentadas tardíamente con producción de ácidos.

Germen núm. 6.—Micrococcus sp. Aislado en la primera parte del enriado, se caracteriza por ser un coco grueso, de 2,5 a 3 micras de diámetro, agrupado en parejas o en racimos pequeños. Gram positivo e inmóvil. Sobre agar común produce colonias de 1,5 a 2 mm. de diámetro, opacas y no pigmentadas. En caldo crece bastante mal, con enturbiamiento uniforme. Leche inalterada y gelatina no licua-

da. Glucosa, lactosa, manita y sacarosa no fermentadas; sobre maltosa produce una pequeña cantidad de ácidos a los cuatro días. Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, nitritos de nitratos y amoníaco negativos.

Germen núm. 7.—Sarcina flava. Se aisla a lo largo de todo el proceso.

Germen núm. 8.—Streptococcus faecalis. Lo hemos encontrado en diversas ocasiones a lo largo del enriado, pero preferentemente en los primeros días.

Germen núm. 9.—Corynebacterium filamentosum. Sólo lo hemos encontrado en una ocasión: en una balsa que llevaba veinticuatro horas de maceración.

Germen núm. 10.—Eschericchia coli. Presente ya en las aguas utilizadas para la maceración, no deja de aparecer durante todo el proceso.

Germen núm. 11.—Eschericchia freundi. Presente durante todo el proceso.

Germen núm. 12.—Eschericchia intermedium. Aparece en los primeros días y generalmente no se encuentra después de la primera etapa.

Germen núm. 13.—Bacterium ammoniagenes. Aislado durante la segunda fase del enriado.

Germen núm. 14.—Bacterium linens. Presente durante todo el proceso.

Germen núm. 15.—Bacterium zenkeri. Aparecè más frecuentemente en la segunda fase del proceso y en los días finales de la primera.

Germen núm. 16.—Bacterium zopfii. Aislado durante la segunda fase del enriado.

Germen núm. 17.—Bacterium acidulum. Presente durante todo el enriado.

Germen núm. 18.—Achromobacter aerophilum. Más frecuente en la segunda fase del enriado, aunque aparece también en la primera.

Germen núm. 19.—Bacterium sp. Bacilo corto, grueso, extremos redondeados, movilidad negativa y Gram positivo. Sobre agar produce colonias redondeadas, opacas y con un pigmento amarillo no difusible. Gelatina licuada a las cuarenta y ocho horas. En caldo da enturbiamiento uniforme y sedimento amarillo. Leche tornasolada acidifica-

da y coagulada, siendo posteriormente digerido el coágulo. Aerobio. Glucosa, lactosa, manita, sacarosa y maltosa fermentadas con producción de ácidos. Indol, rojo de metilo y amoníaco positivos; Voges-Proskauer y nitritos de nitratos negativos. Tornasol reducido a las cuarenta y ocho horas.

Germen núm. 20.—Bacterium sp. Bacilo esbelto, recto o ligeramente curvo, extremos redondeados, movilidad negativa y Gram positivo. Sobre agar común crece formando colonias redondeadas, opacas y con pigmento amarillo anaranjado no difusible. En caldo produce enturbiamiento uniforme con escaso sedimento amarillo que se desintegra. Gelatina licuada a las cuarenta y ocho horas. Leche tornasolada peptonizada y reducida. Sobre patata produce un barniz cremoso, brillante y de un color amarillo anaranjado intenso. Aerobio. Indol y amoníaco positivos; rojo de metilo, Voges-Proskauer y nitritos de nitratos negativos. Glucosa, lactosa, sacarosa, manita y maltosa negativas. Este germen se aisla a lo largo de todo el proceso, pero principalmente en la segunda parte del mismo.

Germen núm. 21.—Bacterium sp. Bacilo corto, grueso, de extremos redondeados, aunque aparecen también formas largas, casi filamentosas. Gram positivo, movilidad negativa. Sobre agar produce colonias redondeadas, translúcidas y de color gris amarillento. En caldo da enturbiamiento uniforme, con ligero sedimento. Gelatina no licuada. Leche tornasolada inalterada. Aerobio. Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, nitritos de nitratos y amoníaco negativos. Glucosa, lactosa, sacarosa, manita y maltosa no fermentadas a los cuatro días. Suele aislarse este germen a lo largo de todo el proceso.

Germen núm. 22.—Bacterium sp. Bacilo corto, grueso, generalmente en diplobacilos. Gram positivo, movilidad negativa. En agar da colonias redondeadas, translúcidas y de color amarillo grisáceo. En caldo produce enturbiamiento homogéneo. Gelatina no licuada al cabo de la semana. Leche tornasolada inalterada. Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, nitritos de nitratos y amoníaco negativos. Glucosa fermentada con ácidos; lactosa, sacarosa, manita y maltosa no fermentadas. Se aisla más generalmente en la segunda fase del enriado.

Germen núm. 23.—Bacillus subtilis. Se aisla durante todo el proceso.

Germen núm. 24.—Bacillus brevis. Se aisla durante todo el proceso.

Germen núm. 25.—Clostridium butyricum. Puede aislarse durante todo el proceso, pero abunda más en la primera fase.

Germen núm. 26.—Clostridium acetobutylicum. Aparece a lo largo de todo el proceso.

Germen núm. 27.—Clostridium spumarum. Aislado en los últimos días del enriado.

Independientemente de las especies descritas, hemos observado que en las aguas de maceración existen gérmenes con actividad de oxidación de los compuestos azufrados, probablemente pertenecientes al género Thiobacillus, aun cuando no hemos conseguido aislarlos.

Como complemento de la determinación cualitativa de la flora microbiana del enriado del esparto, hemos efectuado el recuento de las bacterias aerobias presentes en el mismo a lo largo de dos procesos completos de dicho enriado. Las temperaturas medias durante dicho tiempo fueron las siguientes: máxima 32,8°, mínima 15,0° y media 23,8°. Los resultados obtenidos se expresan en las tablas I y II y gráficamente en las figuras 1 y 2.

Los resultados de las dos experiencias, aunque siguen una marcha paralela, presentan diferencias bastante considerables, del orden de los seis millones de gérmenes por c. c. No obstante, esta diferencia pierde su significado si se tiene en cuenta que la balsa correspondiente a la experiencia núm. 2 perdía agua, lo que traía como consecuencia que al añadir agua diariamente los gérmenes se diluyeran considerablemente.

TABLA I

Tpo. de maceración	Millones/c. c.	Observaciones
0 horas	1,2	agua de pozo
1 días	108,0	" " "
2 "	892,0	" " "
3 "	2.000,0	" " "
4 "	5.240,0	" " "
5 "	11.500,0	" " "
6 "	13.340,0	" " "
7 "	14.000,0	" " "
8 "	14.500,0	" " "
9 "	357,0	cambio de agua
10 "	1.453,0	" " "
11 "	3,564,0	" " "
12 "	6.854,0	" " "
13 "	7.372,0	" " "
14 "	7.600,0	" " "
15 "	7.983,0	fin del enriado

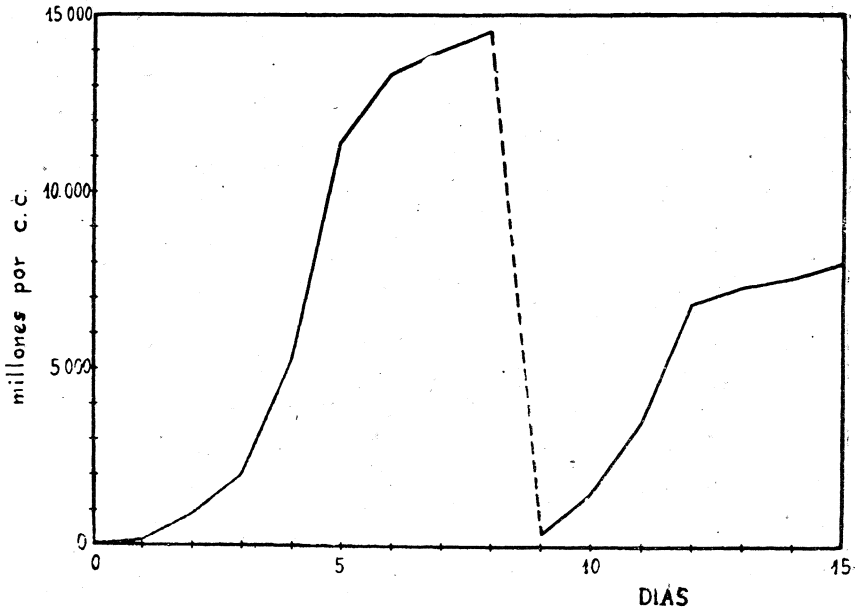


Figura n.º 1.—Gráfica correspondiente a la Tabla I.

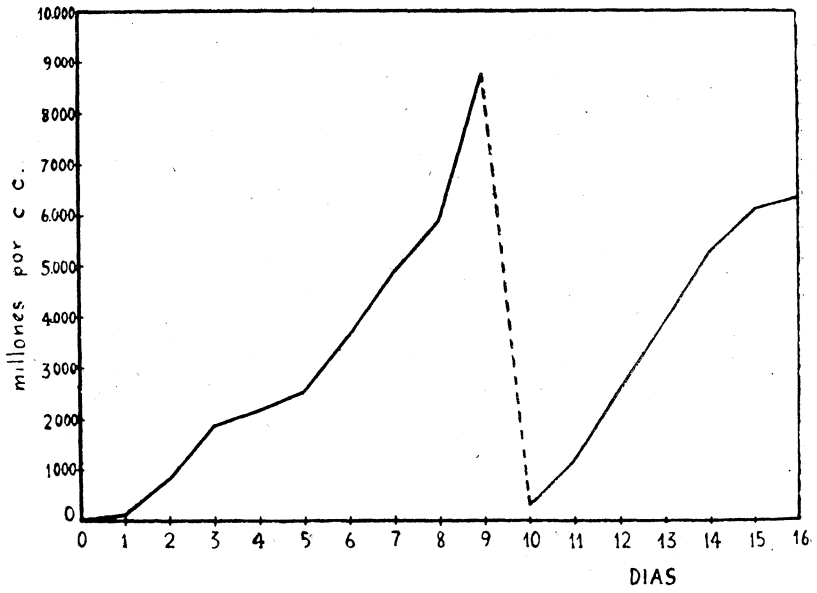


Figura n.º 2.—Gráfica correspondiente a la Tabla II.

TABLA II

Tpo. de maceración	Millones/c. c.	Observaciones
0 horas	1,2	agua de pozo
1 días	111,0	" " "
2 "	783,0	agua a la balsa
3 "	1.845,0	" " " "
4 "	2.140,0	" " " "
5 "	2.500,0	" " " "
6 "	3.600,0	" " " "
7 "	4.850,0	" " " "
8 "	5.860,0	" " " "
9 "	8.743,0	" " " "
10 "	265,0	cambio de agua
11 "	1.141,0	agua a la balsa
12 "	2.582,0	" " " "
13 "	3.890,0	" " " "
14 "	5.302,0	" " " "
15 "	6.153,0	" " " "
16 "	6.325,0	fin del enriado

En relación con el número de bacterias productoras de ácidos a partir de los hidratos de carbono, hemos observado que es muy grande durante la primera fase del enriado, llegando a constituir el 75 por 100 del total de la flora aerobia. En cambio, a partir del cambio de las aguas la flora acidógena va perdiendo terreno paulatinamente, hasta que en los últimos días se ve igualada por la flora alcalinizante e indiferente.

DISCUSION

Hemos descrito anteriormente 27 especies bacterianas aisladas de las aguas de maceración del enriado del esparto. Acerca de dichas especies no se puede asegurar que todas ellas tomen parte activa en los fenómenos del enriado, ya que posiblemente algunas procederán de contaminaciones ocasionales o bien formarán parte de la flora saprofita sin acción directa sobre el esparto. Sin embargo, todas ellas, en razón del medio utilizado en su aislamiento, son capaces de vivir en medios que contengan como única fuente de materia orgánica, si exceptuamos la glucosa, la materia extractiva procedente del esparto, por lo que no podemos menos de pensar que en mayor o menor grado todas son capaces de actuar sobre las substancias propias del esparto. Exceptuamos de lo antes dicho, como es lógico, a las bacterias nitrificantes, las cuales son incapaces de utilizar la materia orgánica.

De otra parte, las propiedades bioquímicas de las bacterias aisladas se adaptan perfectamente a lo hasta ahora conocido en relación con el proceso del enriado. Consiste éste, como sabemos, en un ataque de la fibra cruda, en el sentido de eliminar todas o la mayoría de las substancias que acompañan a la celulosa y que actúan, independientemente de su utilidad en la planta viva, como cemento de unión de unas fibras con otras. Dichas substancias son fundamentalmente pectinas, hemicelulosas, gomas, almidón y materia nitrogenada, siendo entre todas ellas las pectinas las más importantes en razón de su cantidad y de su papel específico de substancia cementadora.

Sobre las pectinas antes indicadas tienen acción acusada los siguientes gérmenes aislados: Bacillus subtilis, Bacillus brevis, Clostridium acetobutylicum, Bacterium acidulum y los gérmenes pertenecientes al género Escherichia. Dichos gérmenes degradan las pectinas hasta el término de ácidos grasos de cadena corta que, posteriormente, pueden ser oxidados hasta el término de CO_2 y H_2O.

En el trabajo de Esteban sobre la Bioquímica de la fermentación del esparto (3) se demuestra que, efectivamente, en las aguas de maceración están presentes de manera constante determinada cantidad de ácidos orgánicos. La máxima cantidad de estos ácidos se obtiene entre los siete y ocho primeros días del enriado, para bajar después del cambio de aguas hasta un nivel inferior, en el que se mantienen más o menos constantes hasta el final del enriado.

La interpretación que nosotros damos a este fenómeno es la siguiente: en un principio las pectinas, así como también probablemente las demás substancias hidrocarbonadas, son rápidamente degradadas por los gérmenes antes citados a moléculas menos complicadas, a partir de las cuales son ya capaces la mayoría de los gérmenes presentes, con capacidad para actuar sobre los hidratos de carbonos sencillos, de producir ácidos orgánicos. Al mismo tiempo estos gérmenes, al encontrar una fuente de energía adecuada, se reproducen rápidamente, lo que explica la elevada cifra de bacterias acidógenas que arroja el recuento. Ahora bien, dado que la cantidad de pectinas contenidas en el esparto es limitada, es fácil de comprender que llegará un momento en que esta rápida reproducción de gérmenes acidógenos se verá frenada por la falta de substrato hidrocarbonado adecuado, así como también que la cantidad de ácidos producidos disminuirá. En este momento preciso (Esteban) es cuando se acostumbra a

cambiar el agua de las balsas, lo que, en nuestra opinión, resulta una operación eficaz, ya que de esta forma se elimina el exceso de ácidos, así como también gran parte de la flora acidógena, lo que permite el más fácil desarrollo de otros tipos de flora.

En la segunda fase del proceso, la flora acidógena, ahora notablemente disminuída, prosigue su labor de ataque sobre los restos de pectinas y otras substancias hidrocarbonadas, ataque que tiene como resultado el mantener un nivel de ácidos aproximadamente constante (Esteban) hasta el final del proceso.

Las proteínas del esparto, de otra parte, sufren también desde los primeros momentos el ataque de los gérmenes proteolíticos, merced al cual dan en definitiva amoníaco, ácidos orgánicos y ácido sulfhídrico. Entre los gérmenes que hemos aislado son productores de amoníaco a partir de proteínas y peptonas los siguientes: Bacillus brevis, Bacillus subtilis, Eschericchia coli, Corynebacterium filamentosum, Bacterium ammoniagenes, Bacterium zenkeri, Germen n.º 19 y Germen n.º 20.

Queda explicado de esta forma el origen del amoníaco en las aguas de enriado, cuya presencia y evolución ha sido estudiada por Callao y Esteban (4). Estos autores demuestran cómo el amoníaco aparece en las aguas desde los primeros momentos para ir aumentando progresivamente hasta el final de la primera fase. Ahora bien, durante dicha fase no se encuentra nunca como amoníaco libre, sino combinado. En la segunda fase, aunque los niveles alcanzados por el amoníaco total no son tan grandes como en la primera, aparece siempre amoníaco libre (Esteban).

Esta evolución del amoníaco la explicamos, de acuerdo con los resultados obtenidos, de la siguiente manera: El ataque de las proteínas por los gérmenes antes citados trae como consecuencia que desde los primeros momentos se libere cierta cantidad de amoníaco. Ahora bien, dado que el ataque de las pectinas y demás hidrocarbonados es mucho más rápido, como se deduce de la más rápida proliferación de la flora acidógena, la cantidad de ácidos que se producen es siempre mayor de la necesaria para neutralizar el amoníaco originado por la flora proteolítica, lo que trae como consecuencia que mientras dura este estado de cosas, es decir, durante la primera fase, no se pueda demostrar amoníaco libre en las aguas. Terminada la primera fase, la cantidad de ácidos se estabiliza y entonces el amoníaco producido rebasa el nivel de los mismos y aparece en forma libre. En nuestra opinión, la aparición de amoníaco libre debería

indicar el final del proceso, ya que sería indicio de que la casi totalidad de las pectinas han sido ya destruídas.

A pesar de lo dicho, no se puede descartar la posibilidad de que parte del amoníaco presente en las aguas provenga, no de la proteínas, sino de los nitritos y nitratos presentes en el agua utilizada para el enriado, ya que algunos de los gérmenes aislados (*Clostridium acetobutylicum*) son capaces de transformar los primeros en amoníaco y la mayoría pueden actuar sobre los nitratos reduciéndolos a nitritos.

En relación con la aparición de SH_2 en las aguas (Esteban), diremos que son bastantes los gérmenes aislados capaces de producirlo a partir de los aminoácidos azufrados. En cuanto a su desaparición, se debe posiblemente a la presencia de bacterias oxidadoras del azufre, de cuya acción ya hemos hablado.

La desaparición de los nitratos y nitritos de las aguas de maceración se explica fácilmente, como ya hemos dicho, por la acción reductora de gran parte de la flora que transforma los citados compuestos en amoníaco y nitrógeno que se desprende. Ahora bien, en las aguas existen gérmenes nitrificantes, lo que hace suponer que también debe tener lugar el ciclo en sentido contrario. Dado que a partir de los primeros días de fermentación no aparecen en las aguas (Esteban), hemos de suponer que a medida que nitritos y nitratos se originan son inmediatamente reducidos por el resto de la flora.

Antes de terminar hemos de hacer notar la presencia de gérmenes celulolíticos, de los que hemos aislado el *Clostridium spumarum*. Estos gérmenes atacan la fibra celulósica y ejercen por tanto una acción perjudicial. Por consiguiente, en un enriado llevado racionalmente se debería de vigilar la aparición de los citados gérmenes y suspender el proceso cuando su número pasase de cierto límite.

RESUMEN

Se han aislado 27 gérmenes de las aguas de maceración del esparto pertenecientes a los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Eschericchia*, *Bacterium*, *Bacillus* y *Clostridium*.

Dichos gérmenes actúan sobre el esparto de la siguiente manera:

Las pectinas y demás substancias hidrocarbonadas son atacadas rápidamente por gérmenes de los géneros Clostridium, Bacillus, Bacterium y Eschericchia, degradándose a productos menos complejos que se transforman por la acción de los citados gérmenes y demás acidógenos en ácidos orgánicos, CO_2 y H_2. Este ataque se lleva a cabo en la primera fase del enriado, debiendo coincidir su decrecimiento con el cambio de aguas, al objeto de eliminar la mayor parte de la flora acidógena una vez cumplida su misión.

Simultáneamente, por la acción de gérmenes de los géneros Bacillus, Corynebacterium y Eschericchia, se descomponen las proteínas del esparto, dando lugar a la producción de restos ácidos, amoníaco y una pequeña cantidad de SH_2. El amoníaco se produce en cantidad relativamente menor que los ácidos orgánicos procedentes de los glúcidos, lo que trae como consecuencia que en esta primera fase no aparezca amoníaco libre.

Durante la segunda fase, las pectinas y demás elementos hidrocarbonados, consumidos casi por completo en la primera, se hallan en defecto, lo que trae como consecuencia un escaso desarrollo de la flora acidógena en beneficio de la proteolítica y la aparición consiguiente de amoníaco libre que marcaría el final del enriado, ya que indicaría que la casi totalidad de las pectinas han sido consumidas.

En los primeros días del enriado todas las sales nítricas y nitrosas desaparecen de las aguas por la acción reductora de las bacterias aisladas, dando en último término nitrógeno gaseoso que se desprende o amoníaco. En las últimas fases del proceso, el amoníaco por la acción de los gérmenes nitrificantes se transforma en nitritos y nitratos, aunque este proceso va enmascarado por la intensa acción reductora del resto de la flora.

Por último, es muy importante observar la aparición de gérmenes celulolíticos, los cuales ejercen una acción desfavorable sobre la fibra.

BIBLIOGRAFIA

(1) **CALLAO, V.**, y **VIGARAY, J.**—Flora aerobia de la fermentación en el enriado experimental del esparto. Microbiología Española. Vol. IV, n.º 1, págs. 9-14.

(2) **BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.** 6.ª ed. 1948. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

(3) **ESTEBAN, E.**—1954. Contribución al estudio bioquímico de la fermentación del esparto. Anejos del Boletín de la Universidad de Granada. Tesis Doctorales, VI.

(4) **CALLAO, V.,** y **ESTEBAN, E.**—1952. La evolución del amoníaco en el proceso del enriado del esparto. Microbiología Española, Vol. V, n.º 1.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

MICOSIS RELACIONADAS CON LA ANTIBIOTERAPIA

por
A. Socías y A. Portolés.

A) INTRODUCCION

Hace bastante tiempo que venimos observando la aparición de distintas especies de hongos levaduriformes en enfermos que, habiendo sido tratados por diversos antibióticos, presentaban fenómenos de antibiótico-resistencia.

En principio, nos limitamos a la observación de los hechos y a su recopilación. Donde con más frecuencia se encontraron fué en los exudados de niños afectos de amigdalitis; aceptando la posibilidad de que estas levaduras existieran en la garganta de los niños sanos en equilibrado comensalismo con las células; a este fin sometimos treinta y un niños sanos, de distintas edades y ambiente social, a un detenido examen bacteriológico de su faringe, no encontrando en ellos la presencia de levaduras.

Posteriormente, en algunos casos patológicos que hemos podido seguir más de cerca, y estimulados con los resultados anteriores, hemos estudiado los distintos microorganismos que se iban desarrollando en los diferentes medios de cultivos, comprobando el intenso pleomorfismo característico de estos fenómenos, que parecen establecer estrecha relación entre bacterias y levaduras, hasta tal punto que creemos que unos se forman a expensas de los otros por intervención de los antibióticos o substancias con ellos relacionadas.

B) ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Antes de pasar a la parte experimental, presentamos una breve reseña de los antecedentes bibliográficos que sobre estas cuestiones se han citado,

teniendo en cuenta que de su consulta se deducen opiniones y teorías contradictorias para los distintos autores, ya sea por las diferencias en métodos de trabajo, ya sea por las distintas hipótesis explicativas de las observaciones efectuadas.

1) Especies levaduriformes en el organismo.

Comensales.—En principio hemos de considerar los investigadores que han señalado la presencia de levaduras, localizándolas en distintas partes o vísceras de organismo humano, considerándolas, bien como seres saprofitos, bien como patógenos. Según unos (Brigoo, 6), la presencia de la especie Candida en la cavidad bucal es un hecho cierto porque Rauramo y Peunttinaur la encuentran en el 17,4 por 100 de los niños recién nacidos examinados por ellos; Tanner y Lampert, en el 10 por 100 de los hombres normales; Ortiz, en un 10 a 60 por 100 de los holandeses, y el mismo Brigoo encuentra en Saigón un 31,2 por 100 de hombres, mujeres y niños europeos y asiáticos que tienen levaduras en boca o garganta, observando que la tasa más baja la dan los niños. Stübben (45), estudiando los microbios de la boca normal en 132 personas, encuentra un 39 por 100 de positividad para la especie Candida cuando utiliza medios sacarosados para la investigación mediante cultivos.

Patógenas.—No obstante, para la mayoría de los casos de moniliasis citados se hace responsables a estas levaduras de un efecto patógeno: siendo Niño, Urzúa y Nolte (34) los primeros en confirmar el papel patógeno de estos hongos, habitualmente saprofitos, aislando 156 cepas de Candida albicans a partir de distintos productos patológicos humanos, en casos de epidermomicosis, oncomicosis, broncomicosis, vulvovaginitis, etc. Ormerod y Friedmann (35) citan un caso de candidiasis de rinofaringe que terminó por invadir los bronquios, provocando la muerte del enfermo debido a una bronco-pneumonía por la asociación de Candida albicans y un estafilococo penicilin-resistente, cuyo cuadro infeccioso se produjo a causa de un tratamiento intenso con antibióticos para curar una sinusitis maxilar; asimismo Floch (16) aisla Candida tropicalis en dos casos de bronco-pneumonía.

Algunos autores al investigar sobre patología animal, Gourtois, Secretáin, Mariat y Levaditi (18), descubren fortuitamente una micosis espontánea en monos de la Guinea francesa, los cuales sufren la presencia de pápulas o nódulos violáceos que encierran un pus amarillento, cremoso, en

el que pululan células de levadura elipsoidales aisladas o en cadenetas y que parece se trata de especies de Histoplasma.

Concomitantes con la antibioterapia.—Kunstadter, Mc. Lean y Greengand (24) sugieren que el uso de los antibióticos en determinados momentos puede ser la causa del predominio o diseminación de las infecciones micóticas y presentan un caso de endocarditis producida por Candida albicans en un niño de siete meses, con el que se suman ya veinticinco casos que de estas endocarditis micóticas se recuerdan. Graig y Farber (11) presenta trece casos de micosis viscerales aparecidas en un grupo de niños (175) a los que se practicó necropsia a su muerte, diagnosticada por leucemia aguda; todos habían recibido fuertes dosis de penicilina, aureomicina y estreptomicina, y las levaduras encontradas fueron un Cryptococus, un Mucor y once Candida. Al mismo tiempo estos autores citan en este trabajo nueve casos de infección intestinal por levaduras y veintidós casos localizados en lengua y exófago, post-antibioterapia.

También Lelong y cols. (26) advierten la posibilidad de infección generalizada de muguet al estudiar el caso de un niño de dos meses que, padeciendo de esta enfermedad bucal, murió al mes de una septicemia producida por C. albicans y desencadenada posiblemente por una prolongada medicación con elevadas dosis de penicilina, estreptomicina, cloromicetina y aureomicina; se encontraron células y formas filamentosas de la levadura en miocardio, diafragma, exófago e incluso encéfalo y se demostró la diseminación sanguínea por la aparición de filamentos y esporas en algunos capilares.

De expectoraciones pulmonares también se han aislado levaduras: Zahawi y Semah (49) describen un caso clínico de moniliasis pulmonar en el que la lesión se confirmó por imagen radiológica y el agente causal —Candida albicans— se aisló de esputos que no presentaban bacilos; estos autores, sin embargo, obtuvieron mejoramiento visible del enfermo por terapéutica estreptomicínica durante dos meses, en contra de la mayoría de los investigadores, que responsabilizan a la antibioterapia de la aparición de hongos levaduriformes. Brygoo (7) encontró en los esputos con baciloscopia positiva de cien enfermos tuberculosos, veinte cepas de Candida albicans, ocho de C.tropicalis, tres de C. parapsilosis, tres de C. Guillermondii y tres del grupo azymatique. También tres casos más de moniliasis bronco-pulmonar difusa, son citados por Caffarena y Durand (9) a la vez que consideran de interés señalar la existencia previa de antibioterapia.

Brown (5) publica un caso de hepatitis aguda que a los diez días de tratamiento con 6.500.000 unidades de penicilina intramuscular desarrolla una moniliasis broncopulmonar típica.

Portella (38) estudia las características de una Torulopsis neoformans aislada del líquido cerebroespinal de un enfermo de meningitis, tratado con estreptomicina.

Por último son varios los autores (4, 12, 27, 31, 44) que citan cuadros infecciosos intestinales producidos por la Candida albicans, por lo que no es de extrañar que Pesle y Labaguerie (37) consideren que está por estudiar aún como patología derivada del tratamiento con antibióticos el papel que representa la C. albicans. Y más recientemente aún (1955), Fischer (15) pone de manifiesto esta frecuencia de aparición de levaduras, incluyendo la moniliasis de órganos internos subsiguientes a la antibioticoterapia; investigando sobre 577 productos patológicos con una positividad de carácter posiblemente patógeno en 131 casos; de ellos, el 51,1 por 100 eran del género Candida, un 28,2 por 100 de Torulopsis y Geotrichoides, un 14,5 por 100 de levaduras ascosporógenas (especialmente Saccharomyces) y un 6,1 por 100 de cepas no identificadas. Otros autores (Biank) han comprobado algunos casos de doble infección por levaduras o infecciones mixtas de hongos levaduriformes y dermatofitos.

Post-antibioterapia.—De lo hasta aquí expuesto, surge el interrogante de si será responsable el uso prolongado de antibióticos del aumento en frecuencia y gravedad de las infecciones fúngicas o, como trataba de aclarar Kligman (23), ¿están incrementadas las infecciones por hongos como resultado de la terapéutica de antibióticos? Este autor discute el problema de las superinfecciones micóticas en relación con el problema general de la resistencia microbiana a los antibióticos, ya que si por una parte aparece regularmente C. albicans en la boca y trayecto gastrointestinal de aquellos que reciben grandes cantidades de antibióticos, por otra, describe la complejidad de diagnóstico para reconocer la moniliasis pulmonar verdadera, comprueba que «in vitro» los antibióticos no aumentan el desarrollo de la C. albicans y que no se potencializan las enfermedades fúngicas en animales infectados experimentalmente. Estas dudas se mantienen también en los trabajos de Moore (33) porque aunque observa que a una mujer de cuarenta años con afección pulmonar subfebril se la declara una micosis pulmonar por C. albicans, subsiguiente a la administración de aureomicina, y que fué curada al cabo de seis meses

de tratamiento con yoduro potásico, no obtiene, sin embargo, resultados confirmadores para sus experiencias «in vitro», pues la aureomicina en cristales depositados sobre el medio de crecimiento inhibe temporalmente el desarrollo de C. albicans y a concentraciones débiles en medio líquido tiene una ligera acción estimulante. También sigue existiendo el interrogante para Lelong (25), que señala subinfecciones fúngidas durante el curso del tratamiento con antibióticos, principalmente por cloromicetina, aureomicina y terramicina, aunque también con estreptomicina y penicilina; clasificándolas en varios grupos: las localizadas en piel, boca y faringe, cuya frecuencia es indiscutible y generalmente de escasa gravedad; las formas locales extensivas, rápidamente difusibles por las mucosas, y las de infección generalizada con localizaciones metastásicas, que son las más raras, pero muy graves. Este autor observa, sin embargo, que la experimentación no ha aportado aún la prueba de que los antibióticos son directa o indirectamente responsables de estas subinfecciones. Woods, Manning y Patterson (48) citan 21 casos clínicos de subinfección por C. albicans después de tratamientos con penicilina, cloromicetina o aureomicina. Sharp (42) analiza y ensaya en 174 enfermos pneumónicos la presencia de levaduras antes, en y después del tratamiento con oxitetracilina o sulfadiazina, observando que, efectivamente, la primera droga aumenta los porcentajes de frecuencia en la aparición de especies de Candida en esputos, garganta y recto (sobre todo en este último), aunque no establece correlaciones entre la presencia de esta levadura y los síntomas clínicos de moniliasis, ni tampoco con los valores del pH de la saliva. Finalmente, Van Breuseghen, Balsacq y Bertrand (47) son concluyentes en su publicación sobre un caso de moniliasis generalizada en un niño de seis meses y medio, que fué hospitalizado por padecer ránula y que en poco más de un mes recibió 3.000.000 de unidades de penicilina, tres gramos de estreptomicina y cinco gramos de cloromicetina, sin resultado; practicada la autopsia se aisló C. albicans del riñón, observando en cortes histológicos de un fragmento de este órgano numerosas células levaduriformes y filamentos de pseudomicelio. Un año más tarde (1953), Duchesnay (14) nos habla sobre los accidentes terapéuticos de origen fúngico provocados por los antibióticos, considerándolos como reacciones cutáneo-mucosas, que pueden clasificarse en locales y extensivas, profundas y metastásicas, debidas en su mayoría a células de C. albicans y en las que una menor resistencia del terreno muestra decisiva actuación en su desarrollo.

Respecto a las experiencias «in vitro», se han efectuado varias para esclarecer el papel de los antibióticos en estos problemas, y, en 1951, Pappenfort y Sechnall (36), por una parte, y Moore (33), por otra, encuentran que la aureomicina en concentraciones de 0,2 mgm./c. c. ejerce acción estimulante sobre el desarrollo de células de C. albicans, y además Moore observa microscópicamente que las células levaduriformes crecidas alrededor de cristales de aureomicina depositados sobre medios sólidos son de gran tamaño, mientras que las células desarrolladas en medio líquido con diluciones mínimas de este antibiótico, son pequeñas y están dispuestas en cadena.

Más tarde, Hesseltine y colaboradores (21) ensayan cuatro especies de levaduras, entre las que se incluyen la C. albicans, que permanecen sin influenciarse en medios líquidos que contienen aureomicina y que esta indiferencia no se modifica aunque se agregue suero al medio líquido; solamente parece efectivo el empleo de aureomicina en el medio cuando se busca una ayuda en el aislamiento de levaduras a partir de muestras fuertemente contaminadas por las bacterias. Asimismo, Raubitschek (39) comprueba que la adición de penicilina y estreptomicina a medio de agar-maltosa-Saboureaud incrementa el rendimiento de cultivos positivos en dermatofitos a partir de muestras clínicas primarias y reduce en un 50 por 100 el período normal del desarrollo. Por el contrario, Guimaraes y Silva (19) aconsejan el empleo de terramicina en actinomicosis, por cuanto ellos han ensayado «in vitro», que soluciones al 1 por 1.000 de este antibiótico inhiben el crecimiento de Nocardia Brasiliensis y N. asteroides.

Los trabajos de Woods y colaboradores (48) muestran que la penicilina, aureomicina o cloromicetina no ejerce «in vitro» actividad inhibidora ni estimulante sobre cuatro cepas de Candida, a pesar de los casos clínicos de candidiasis por antibióticos que ellos mismos habían observado. Posteriormente, Huppert, Mc. Pherson y Cazin (22), por el contrario, comprueban el efecto estimulante de la aureomicina en el desarrollo de la especie de C. albicans, al mismo tiempo que observan que la penicilina, estreptomicina, cloromicetina y terramicina no ejercen efecto alguno. Y más recientemente, Lopes, Netto y cols. (28) comprobaron que la aureomicina añadida al medio de cultivo en dosis análogas a las utilizadas por vía oral, no muestra acción ninguna «in vitro» sobre el desarrollo de células de Candida albicans.

Mc. Neilli y Roth (29) dan cuenta de los resultados obtenidos por ellos

en la microflora fecal de polluelos y pavos tratados con dieta-tipo, añadidas con aureomicina o terramicina, concluyendo: que el establecimiento de las levaduras sobre el trayecto intestinal de las aves experimentadas es más rápido y numeroso para aquellos a los que se había administrado aureomicina oral; que el porcentaje de levaduras en heces es mayor para los lotes que reciben antibióticos; que la administración de estas drogas trae como consecuencia la aparición en heces de microorganismos (especialmente Proteus mirabilis) que muestran actividad antagónica contra la Candida albicans; y que disminuye la gravedad de las moniliasis experimentales en aves inoculadas con Candida albicans cuando se alcanzan ciertos niveles terapéuticos de aureomicina y terramicina. Es también Seligmann (41) el que experimenta con animales y afirma haber observado, con nueve cepas de C. albicans, que cuando se inocula intraperitonealmente a ratones con aureomicina o terramicina se produce una rápida y fatal infección, mientras que cuando estas inoculaciones se hacen por vía intravenosa tiene lugar un efecto protector con relación a la infección; sin embargo, con la penicilina G, estreptomicina, cloromicetina y bacitracina no se consiguen estos efectos.

De lo que pudiéramos considerar «relaciones levadura-bacteria» o influencias que unas tienen sobre otras al coexistir en el organismo, vemos que Brygoo y Seys (8) observaron en los productos del metabolismo de cepas virulentas del Mycobacterium tuberculosis la existencia de un factor activo hasta en diluciones de 10^{-5} que favorece el crecimiento de hongos del género Candida. Recíprocamente, Mankiewicz (30), al estudiar la posible asociación entre Mycobacterium tuberculosis y C. albicans en personas tuberculosas y acusar también en el bacilo de Koch el factor favorecedor del crecimiento de la levadura, demuestra mejor esta interdependencia al notar que, a su vez, la C. albicans contiene o produce un factor que mejora el crecimiento de este bacilo ácido-resistente, y que esta influencia se extiende a bacilos de coeficiente de viabilidad o multiplicación reducida, que ahora se encuentran tan frecuentemente en pacientes de tratamiento prolongado con estreptomicina o hidrazida del ácido isonicotínico. Sobre este mismo asunto trabajó también Carlson (10) practicando cultivos mixtos de bacilos tuberculosos y levaduras, y encuentra un antagonismo entre ambas especies, que parece ser no obedece a modificaciones de pH, ni al agotamiento del medio o aparición de substancias tóxicas del meta-

bolismo; este autor lo califica de «antagonismo de adaptación» que aumenta aún más al airear los cultivos. Así como también filtrados de un cultivo de quince días de Candida sobre Sauton modificado, más suero y tuberculina, inhibe el crecimiento del bacilo, aún diluído al décimo; hecho que fué comprobado también por las lesiones que una cepa humana (H37Rv) produce sobre membrana corioalantoidea sometiéndola o no, previamente, al cultivo indicado.

Akiba e Iwata (1, 2) citan el fenómeno de destrucción de algunas especies de células levaduriformes (C. albicans, C. tropicalis, Sacch. cerevisae y S. ellipsoideos) efectuado por el Bacterium cadidodestruens, aislado por estos mismos investigadores, a partir de esputos y órganos de enfermos con moniliasis generalizada subsiguiente a una infección paratífica A. Estos autores observaron microscópicamente que las bacterias invaden las levaduras, se multiplican intracelularmente, rompen la célula levaduriforme y se vierten al exterior, mientras que el contorno del organismo huésped permanece relativamente invariable; es decir, que es un fenómeno parecido al del bacteriófago, pero que no se produce con los filtrados de su cultivo en caldo; estudiando a continuación este mecanismo de destrucción mediante técnicas de contaje de cultivos mezclados (3) y comprobando que si bien el filtrado de bacilos no tiene efecto sobre la levadura, el filtrado de extractos de levadura ejerce acción estimulante sobre el crecimiento del B. candidodestruens.

2) Teorías.

Es difícil encontrar una explicación generalizada del proceso; son distintos los investigadores que lo han observado y por tanto varias las teorías. Así, en 1949, Harris (20) piensa que estos fenómenos resultan, efectivamente, de la presencia de aureomicina y deficiencias del complejo vitamínico B en el organismo; deficiencia que fué comprobada por Di Raimondo, Angarano, Mannimino y Trinchese (13) en la orina de hombres enfermos y sanos administrados con niveles terapéuticos de cloromicetina, aureomicina y terramicina. Opinión de la que no participan Woods y colaboradores (48), porque según ellos los estudios bioquímicos no permiten sacar conclusiones respecto a las modificaciones en la biosíntesis de las vitaminas o de otras reacciones fisiopatológicas que disminuyen la resistencia del organismo a la invasión micótica.

Mientras tanto, Foley y Winter (17) presentan como condiciones que han de intervenir en el fenómeno, las modificaciones de pH de los líquidos intestinales y la consiguiente destrucción de las bacterias del tubo digestivo. Tomaszenwski (46) y Muller (32) mantienen la teoría de «supresión por sustitución», es decir, qué los antibióticos rèducen o eliminan los organismos susceptibles a ellos y aparecen formas resistentes que reemplazan a la flora normal y empiezan a establecerse en el intestino, esto es, que se rompe el equilibrio de la flora intestinal normal. Reiches (40) piensa en posibles cambios en los tejidos, que inducen a reacciones de insensibilización para las levaduras. Y por último, Sieburth, Mc. Meill, Mc. Ginnis y Skinner (43) recuerdan la teoría de rotura del equilibrio de la flora normal, con la idea de que al administrar algunos antibióticos los organismos resistentes a éstos adquieren preponderancia y dominio al suprimir o eliminar las formas normalmente antagónicas a los antibiótico-resistentes con las que coexistían en el organismo.

Al sacar las conclusiones de las citas bibliográficas resulta que:

a) No hay concordancia entre los autores citados.

b) Que todos coinciden en apreciar el fenómeno, y

c) Las experiencias «in vitro» no corresponden con las hipótesis de los autores.

C) INVESTIGACIONES DE LOS AUTORES

Se recogen una serie de casos clínicos correspondientes a enfermos con infecciones antibiótico-resistentes, para lo que se verifican exámenes en frotis directo de los exudados o productos patológicos, teñidos por diversas técnicas, para después, mediante sucesivas siembras en distintos medios a diferentes temperaturas, ir controlando los microorganismos que alcanzan desarrollo patente. También se efectúan todas las técnicas bacteriológicas encaminadas a la identificación de los mismos.

1) Casuística ocasional.

* Un niño de ocho meses de edad, afecto de catarros continuos del tramo superior del aparato respiratorio, con síntomas asmáticos y fiebre. Fué tratado con penicilina y estreptomicina, que hicieron desaparecer la fiebre y remitieron los síntomas externos, mas sin lograr una plena curación. En los exámenes bacteriológicos de los exudados nasal y faríngeo

se aislaron un tipo de coco grande (2 μ de diámetro) gram-positivo, frecuentemente asociado en parejas, y una levadura; de ambos microorganismos se obtuvo intradermorreacción positiva, por lo que se preparó antovacuna mixta, con cuyo tratamiento resultó curado. La levadura aislada de garganta y nariz fué la Candida Guillermondii.

* Siete niños y una niña cuya edad oscila entre los cuatro y once años, presentan amigdalitis persistentes y exudado blanco discontinuo, de consistencia dura y fuertemente adherido a la mucosa. Todos ellos fueron tratados con penicilina o penicilina retardada en dosis que oscilan de 1.200.000 a 1.800.000 unidades, y lo único que se consiguió fué rebajar la fiebre a unas décimas, pero sin que terminara de desaparacer el proceso infeccioso, que además se hacía patente por la existencia de las placas blancas en la faringe. En su exudado faríngeo se encontró junto con organismos cocáceos (del tipo anterior) gram positivos, la levadura Candida albicans. A cinco de estos niños hubo ocasión de realizar examen bacteriológico antes de comenzar el tratamiento y tan sólo se encontraron gérmenes cocáceos gram positivos de tipo micrococo muy polimorfo.

* A diez niños de cinco a nueve años, que también padecieron amigdalitis, pero fueron tratados por supositorios de canfocarbonato de bismuto al confirmarse los primeros síntomas, se les practicó examen bacteriológico de faringe, no encontrándose organismos levaduriformes ni en los frotis ni en los cultivos.

* También se obtuvieron resultados negativos en el aislamiento o identificación de levaduras en trece niños cuya edad estaba comprendida entre los tres y once años, que padecieron de anginas, pero que respondieron bien al tratamiento penicilínico.

* Asimismo, con cinco casos de enfermos con bronquitis que fueron tratados favorablemente con penicilina retardada, no se aislaron levaduras de sus expectoraciones ni exudado faríngeo.

Antes de seguir adelante es preciso dejar bien sentado que no se obtuvieron levaduras de los cultivos procedentes de los casos antes citados, o sea: de los cinco niños con amigdalitis, antes de que tuviera lugar la antibiótico-resistencia; ni de los diez niños con los que no se practicó

antibioterapia; ni con los trece niños que sufrieron amigdalitis por gérmenes penicilin-sensibles; como tampoco en los cinco enfermos de bronquitis no resistentes a los antibióticos. Lo cual parece indicar la relación estrecha entre las especies fúngicas y las drogas antibióticas.

* A una joven de veintiún años que padecía anginas frecuentes, que nunca fueron sometidas a tratamiento alguno, se le hicieron un examen bacteriológico pre-operatorio y otro de las anginas extirpadas recogidas asépticamente, logrando aislar tan sólo gérmenes gram positivos de tipo micrococo muy polimorfo.

* Una joven de diecinueve años, que también tenía placas en faringe y fiebre, a la que se administraron 1.600.000 unidades de penicilina retardada, con lo que mejoró bastante, aunque persistiendo las placas y unas décimas de fiebre. De su exudado faríngeo se aisló C a n d i d a a l b i c a n s .

* Un joven de veinte años con afección rinofaríngea de manifiesta resistencia al tratamiento por antibióticos (penicilina, penicilina-estreptomicina), de cuyo exudado nasal se aisló C . a l b i c a n s .

* Un niño de dieciocho meses de edad a quien le observaron una infección de garganta subsiguiente a una varicela y que fué tratado por antibióticos, a los que mostró manifiesta resistencia; también se encontró en su faringe C . a l b i c a n s .

* Una joven de veintidós años que presenta cuadro febril intermitente, de la que se obtuvieron hemocultivos negativos y se practicaron diversos exámenes parasitológicos de sangre con resultado también negativo; fué tratada con penicilina, estreptomicina y cloromicetina sin resultado. Se le hicieron exámenes bacteriológicos de orina (microfot. 1) extraída asépticamente por cateterismo, y en sus cultivos se identificó la T o r u l o p s i s c a n d i d a .

* Un enfermo que padece infección de vesícula biliar por enterococo, que es tratado por antibióticos hasta que se cura clínicamente, pero después de dos meses presenta síntomas de colecistitis. Por sondaje aparecen piocitos y organismos levaduriformes solamente, que por cultivos resulta ser una R h o d o t ó r u l a .

* Otro enfermo que padece una cistitis por Escherischia coli y Corynebacterium pseudiphtericum, se trata con penicilina-estreptomicina y parece quedar curado clínicamente (orina normal); al cabo de una semana le aparecen nuevamente molestias y se aisla como único microorganismo la C. albicans. Practicada la prostatectomía, queda, como episodio final, una fístula en la que solamente se aisla esta levadura.

* Enfermo que padece infección subsiguiente a prostatectomía, se le trata con penicilina, estreptomicina y terramicina sin resultado. Al cabo de un mes se practicó análisis bacteriológico de orina (microfot. 2) y se encuentra un colibacilo resistente y C. albicans.

* Enfermo afecto de gripe que se le trata por antibióticos; se le produce una complicación de tipo renal, por lo que se continúa la administración de antibióticos (penicilina-estreptomicina y terramicina) con escaso resultado. Al cabo de veinte días, se aislan del sedimento urinario, grandes cocos gram positivos y la Rhodotórula mucilaginosa.

* Enferma de setenta años de edad que a consecuencia de una colitis pertinaz se la produce una cistitis. En su orina se aislan mediante cultivo sobre medios adecuados dos gérmenes: E. coli y un corynebacterium; se trata por penicilina-estreptomicina y siguen los síntomas, encontrándose en su orina tan sólo E. coli; se le administra aureomicina y terramicina y a los doce días, en el análisis bacteriológico de la orina, se encuentra E. coli y una Rhodotórula rubra.

* Paciente de treinta y un años de edad que padece infección rinofaríngea desde hace varios años, que se ha tratado con penicilina y estreptomicina con resultados de mejoría pasajera; al practicar análisis bacteriológicos de senos nasales, se aislan: enterococo, carynebacterium y Cryptococus albidus.

* Dos enfermos de cistitis, uno tratado con penicilina, estreptomicina y terramicina, y del que se aisla un corynebacterium y una Rhodotórula rubra; y otro tratado con penicilina retardada, del que se aisla E. coli y Candida albicans (microf. 3).

* Un niño que a consecuencia de una varicela sufre de nefritis, se le trata con penicilina y estreptomicina, y en su orina se aisla mediante cultivos enterococo y Candida albicans.

* A fin de una comparación de estos casos con niños normales, se han efectuado exámenes bacteriológicos de faringe a treinta y un niños de diferentes edades, sexo y ambiente social, no encontrando en ninguno de ellos presencia de organismos levaduriformes.

2) Casos investigados.

A la vista de cuanto llevamos expuesto decidimos estudiar más detenidamente los futuros casos que se nos presentasen. Así fué como estudiamos cuatro casos en los que después de la administración de antibióticos hubo aparición de levadura: uno de faringitis crónica, otro de pielonefritis y dos de cristitis rebeldes a la terapéutica de antibióticos.

* Enfermo con faringitis crónica producida como consecuencia de violento ejercicio y corriente de aire muy frío, caracterizada por grandes molestias e intensa afonía, que se mantuvo durante ocho días; al cabo de dos meses continúan las molestias y la irritación es tan intensa que aparece sangre en el exudado; y estas molestias, que se agudizan en épocas de cansancio o debilidad física, se caracterizan por irritación, dolorimiento y producción de exudado. Fué tratado con pastillas de antibióticos y gargarismos con antisépticos débiles. Al continuar estas molestias se verifica un estudio bacteriológico del exudado faríngeo, del cual resulta positiva la presencia de una Debariomyces Hansenii.

Procedimiento: de la parte más interna de la faringe se sembró en placas de distintos medios y a diferentes temperaturas para conseguir el crecimiento de todos los microorganismos que allí pudieran encontrarse; asimismo se practicaron frotis del exudado y se colorearon por distintas técnicas.

En los frotis se observa la presencia de algún espirilo gram negativo, bacilos grandes y otro fino (a veces ramificado), gram negativos, diplococos y estafilococos gram positivos, cuerpos levaduriformes gram negativos y levaduras gram positivas, algunas de las cuales presentaban granulaciones; también se observaron células epiteliales de faringe, que incluían algunas sombras levaduriformes intraprotoplásmicas e intranu-

cleares gram negativas, así como también algunas sombras y granulaciones intranucleares gram positivas (microfots. 4, 5, 6). En un campo se pudo observar la liberación de estas granulaciones por rotura del núcleo celular.

Las siembras efectuadas en los diferentes medios produjeron colonias cuyas características se controlaron perfectamente, observando su naturaleza mediante preparaciones o siembras según se indica en el siguiente esquema:

De donde se deduce que en los cultivos sucedió lo siguiente:

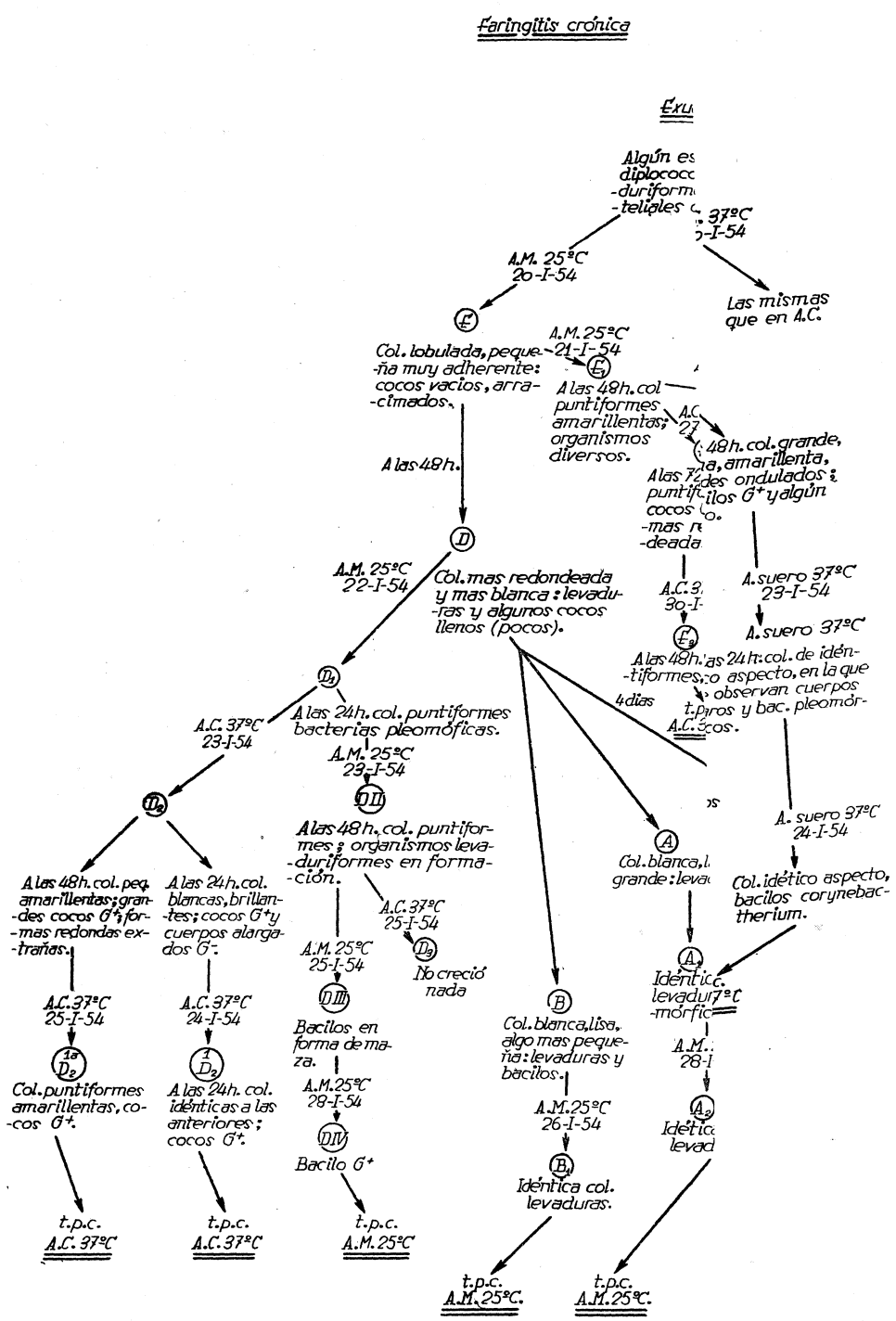
Agar común.—A las veinticuatro horas de incubación a 37° crecieron colonias redondas, blancas, brillantes, convexas y de borde liso, que estaban integradas por cocos gram positivos agrupados en racimos.

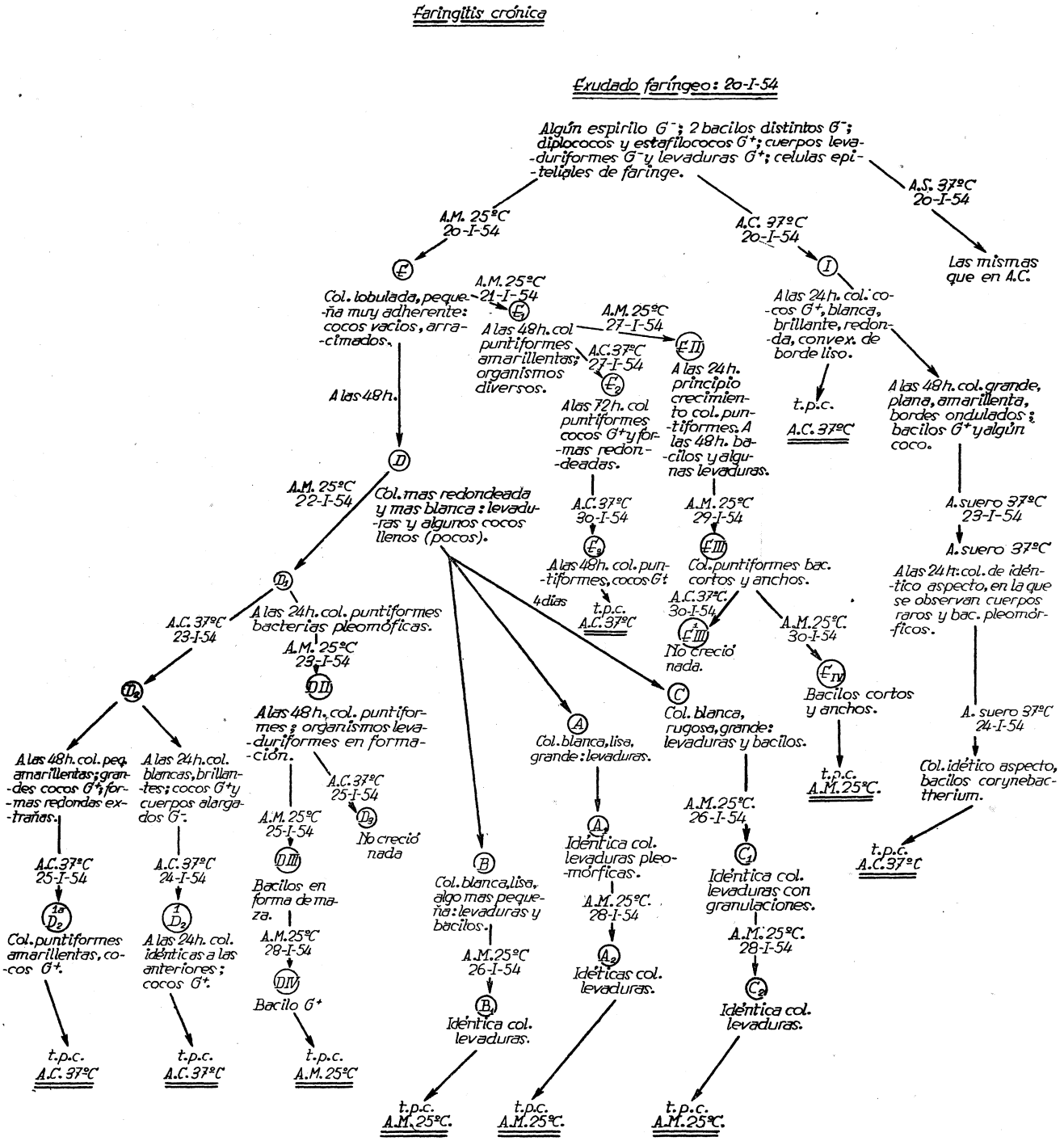
A las cuarenta y ocho horas empezaron a crecer colonias más grandes, planas, con carácter invasor, de color amarillento y bordes ondulados; en ellas se encontraron bacilos de aspecto parecido a los Corynebactherium y alguna forma de coco. Estas colonias se resembraron a placa de agar suero, y a las veinticuatro horas aparecen colonias de idéntico aspecto, cuyos frotis presentan unos cuerpos de forma variable y bacilos pleomórficos (microfot. 7).

Agar sangre.—Crecieron también dos colonias de idénticas características que las anteriores, pero de aparición más rápida.

Agar malta.—En este medio, cultivando a 25°, se observa que a las veinticuatro horas crecen algunas colonias (E), pequeñas, convexas, amarillo sucio, de bordes lobulados, muy adherentes y elásticas (microfot. 8), en las que se observan organismos cocáceos teñidos en los bordes, dispuestos en grupos y, a veces, en siluetas que recuerdan a levaduras; estas colonias, en un desarrollo posterior de veinticuatro horas, modifican su aspecto (D), volviéndose más redondas, blancas (microfot. 9), encontrándose en ellas algunos cocos con tendencia levaduriforme ya perfectamente teñidos en toda su superficie (microfot. 10); al continuar su incubación en agar malta, las colonias aumentan de tamaño (A), se hacen más convexas y más blancas. Simultáneamente se forman dos tipos de colonias, unas muy parecidas a las anteriores, pero un poco más pequeñas (B), en las que se observan levaduras y bacilos (microfot. 11), y otras (C) más grandes, blancas, convexas y rugosas, en las que también se observan levaduras y bacilos (microfot. 12).

Por siembras oportunas se lograron separar cada una de estas colonias, cuyas modificaciones son como sigue: de la colonia E se sembró a placa de agar malta, incubando a 25°, y a las cuarenta y ocho horas aparecieron unas colonias puntiformes (microfot. 13), amarillentas, algo convexas y de bordes enteros (E_1), en las que se observó la presencia de organismos de variable morfología; parece como si se tratara de un momento pleomórfico en el que todavía no se ha determinado qué forma es la dominante. De aquí se sembró a placa de agar común (E_2), incubando a 37°, tardando setenta y dos horas en crecer colonias puntiformes parecidas a las anteriores, y en las que se observan cocos gram


Faringitis crónica
Exu
Algún es
diplococc
-duriform
-teliales
37ºC
-I-54
A.M. 25ºC
20-I-54
Las mismas
que en A.C.
E
Col. lobulada, peque-
-ña muy adherente:
cocos vacios, arra-
-cimados.
A.M. 25ºC
21-I-54
E1
A las 48h. col
puntiformes
amarillentas;
organismos
diversos.
A las 48h.
D
A.M. 25ºC
22-I-54
Col. mas redondeada
y mas blanca: levadu-
-ras y algunos cocos
llenos (pocos).
D1
A.C. 37ºC
23-I-54
A las 24h. col. puntiformes
bacterias pleomóficas.
A.M. 25ºC
23-I-54
D II
D2
A las 48h. col. peq.
amarillentas; gran-
-des cocos G+; for-
-mas redondas ex-
-trañas.
A las 24h. col.
blancas, brillan-
-tes; cocos G+ y
cuerpos alarga-
dos G-.
A las 48h. col. puntiformes
y organismos leva-
-duriformes en forma-
-ción.
A.C. 37ºC
25-I-54
D3
No creció
nada
A.M. 25ºC
25-I-54
D III
Bacilos en
forma de ma-
za.
A.M. 25ºC
28-I-54
D IV
Bacilo G+
A.C. 37ºC
25-I-54
1a
D2
Col. puntiformes
amarillentas, co-
-cos G+.
A.C. 37ºC
24-I-54
1
D2
A las 24h. col.
idénticas a las
anteriores;
cocos G+.
t.p.c.
A.C. 37ºC
t.p.c.
A.C. 37ºC
t.p.c.
A.M. 25ºC
B
Col. blanca, lisa,
algo mas peque-
-ña: levaduras y
bacilos.
A.M. 25ºC
26-I-54
B1
Idéntica col.
levaduras.
t.p.c.
A.M. 25ºC.
A
Col. blanca, l
grande: leva
A1
Idéntica
levadura 37ºC
-mórfica
A.M.
28-I
A2
Idétic
levad
t.p.c.
A.M. 25ºC.
A las 72
-des ondulados;
puntif
-ilos G+ y algún
cocos
-mas r
-deada
A.C. 3
30-I-
E2
A las 48h. las 24h: col. de idén-
-tiformes, o aspecto, en la que
observan cuerpos
t.p. ros y bac. pleomór-
A.C. cos.
4dias
A. suero 37ºC
23-I-54
A. suero 37ºC
A. suero 37ºC
24-I-54
Col. idético aspecto,
bacilos corynebac-
therium.


Faringitis crónica
Exudado faríngeo: 20-I-54
Algún espirilo G⁻; 2 bacilos distintos G⁻; diplococos y estafilococos G⁺; cuerpos levaduriformes G⁻ y levaduras G⁺; celulas epiteliales de faringe.
A.M. 25ºC 20-I-54
A.C. 37ºC 20-I-54
A.S. 37ºC 20-I-54
Las mismas que en A.C.
E
Col. lobulada, pequeña muy adherente: cocos vacios, arracimados.
A las 48h.
A.M. 25ºC 21-I-54
E1
A las 48h. col puntiformes amarillentas; organismos diversos.
A.M. 25ºC 27-I-54
E III
A.C. 37ºC 27-I-54
E2
A las 72h. col puntiformes cocos G⁺ y formas redondeadas.
A las 24h. principio crecimiento col. puntiformes. A las 48h. bacilos y algunas levaduras.
A.C. 37ºC 30-I-54
E3
A las 48h. col. puntiformes, cocos G⁺
4días
t.p.c. A.C. 37ºC
A.M. 25ºC 29-I-54
E III
Col. puntiformes bac. cortos y anchos.
A.C. 37ºC. 30-I-54
1 E III
No creció nada.
A.M. 25ºC. 30-I-54
E IV
Bacilos cortos y anchos.
t.p.c. A.M. 25ºC.
I
A las 24h. col. cocos G⁺, blanca, brillante, redonda, convex. de borde liso.
t.p.c. A.C. 37ºC
A las 48h. col. grande, plana, amarillenta, bordes ondulados; bacilos G⁺ y algún coco.
A. suero 37ºC 23-I-54
A. suero 37ºC
A las 24h. col. de idéntico aspecto, en la que se observan cuerpos raros y bac. pleomórficos.
A. suero 37ºC 24-I-54
Col. idético aspecto, bacilos corynebactherium.
t.p.c. A.C. 37ºC
D
Col. mas redondeada y mas blanca: levaduras y algunos cocos llenos (pocos).
A.M. 25ºC 22-I-54
D2
A.C. 37ºC 23-I-54
D2
A las 48h. col. peq. amarillentas; grandes cocos G⁺; formas redondas extrañas.
A.C. 37ºC 25-I-54
1ª D2
Col. puntiformes amarillentas, cocos G⁺.
t.p.c. A.C. 37ºC
A las 24h. col. blancas, brillantes; cocos G⁺ y cuerpos alargados G⁻.
A.C. 37ºC 24-I-54
1 D2
A las 24h. col. idénticas a las anteriores; cocos G⁺.
t.p.c. A.C. 37ºC
A las 24h. col. puntiformes bacterias pleomóficas.
A.M. 25ºC 23-I-54
D II
A las 48h. col. puntiformes y organismos levaduriformes en formación.
A.M. 25ºC 25-I-54
D III
Bacilos en forma de maza.
A.M. 25ºC 28-I-54
D IV
Bacilo G⁺
t.p.c. A.M. 25ºC
A.C. 37ºC 25-I-54
D2
No creció nada
B
Col. blanca, lisa, algo mas pequeña: levaduras y bacilos.
A.M. 25ºC 26-I-54
B1
Idéntica col. levaduras.
t.p.c. A.M. 25ºC.
A
Col. blanca, lisa, grande: levaduras.
A1
Idéntica col. levaduras pleomórficas.
A.M. 25ºC. 28-I-54
A2
Idéticas col. levaduras.
t.p.c. A.M. 25ºC.
C
Col. blanca, rugosa, grande: levaduras y bacilos.
A.M. 25ºC. 26-I-54
C1
Idéntica col. levaduras con granulaciones.
A.M. 25ºC. 28-I-54
C2
Idéntica col. levaduras.
t.p.c. A.M. 25ºC.

pleomórficas, y de aquí se pasó a otra placa en idénticas condiciones, donde ya se obtuvieron levaduras normales (A_2), aunque algunas de ellas con gránulos refrigentes en su periferia (microfot. 21).

La colonia B de levaduras y algunos bacilos, se pasó a agar malta a 25° y se obtuvieron colonias (B_1) de levaduras idénticas a las anteriores.

De la colonia C, integrada también por levaduras y bacilos, se obtuvo la C_1 en agar malta a 25°, que tenía levaduras con granulaciones (microfot. 22), y de aquí en idénticas condiciones a otra placa, donde se consiguieron levaduras normales (C_2), pero en fase rugosa (microfot. 23).

Todas estas colonias de levaduras, tanto las lisas como las rugosas, resultaron ser de la especie Debariomyces Hansenii.

De cuanto llevamos dicho señalaremos sobre todo que en la colonia D es donde se presenta un momento pleomórfico del que han de salir cocos, bacilos y levaduras. Las dos primeras formas surgen al resembrar (D_1) y pasar a agar común (D_2) y agar malta (D_{II}), que fijan estas formas, mientras que en la placa origen las células pleomórficas evolucionan hacia la formación de levaduras a los cuatro días.

Por otra parte, en la D_2 sigue este pleomorfismo, ya que en las microfotografías 15 y 16 se observa cómo las pequeñas formas que parecen derivarse de los cocos grandes, que se ven en casos de penicilin-resistencia, manifiestan en su origen siluetas distintas; coco y coco-bacilo que, posiblemente, darían origen después a las dos formas distintas que se han de encontrar, corynebacterium y staphylococcus junto con el Debariomyces.

Al intentar interpretar lo anteriormente descrito surge como hipótesis, la de que se recogen levaduras capaces de originar gérmenes, que es lo que sucede en agar común a 37° y mucho más fácilmente en agar sangre; sin embargo, en agar malta a 25°, que es más propicio al crecimiento de levaduras, y sin el factor que debe existir en faringe, intenta producir gérmenes, pero las condiciones son disgenésicas para ello y da lugar a levaduras, al cabo de cinco días, forzadas por el medio y las condiciones de cultivo.

Todo esto puede suceder en el organismo en el interior de las células epiteliales (capaces de rápida regeneración); así, hemos visto levaduras aisladas gram positivas que pueden sufrir cambios metabólicos y convertirse en levaduras aisladas gram negativas, que a veces aparecen como incluídas en el protoplasma de las células epiteliales de faringe (sombras

levaduriformes gram negativas intraprotoplásmicas) o en el núcleo (sombras levaduriformes gram negativas intranucleares) y allí transformarse en gránulos gram positivos que por destrucción de la célula y rotura del núcleo quedan en libertad, según se ha visto en todas estas formas que se han encontrado en un mismo frotis tomado directamente de faringe.

* Un niño de un año, afecto de lesión aparentemente renal, que en el análisis de orina se encuentran 0,5 0/00 de albúmina, intensísima piuria y cilindros granulosos. Se le diagnostica de pielonefritis y se le trata con penicilina-estreptomicina, consiguiendo una mejoría aparente; a los ocho días vuelve a recaer y se le administran de nuevo antibióticos, observándose algo de mejoría; al iniciarse esta segunda época de tratamiento, se hace el estudio bacteriológico, en el que se encuentra para el examen de los frotis practicados por el sedimento que no hay gérmenes, mientras que entre abundantes piocitos gram negativos y cuerpos redondos grandes, densos, de naturaleza desconocida, se encuentran campos con gran número de cuerpos levaduriformes alterados (microfot. 24 y 25) y otros ovoides grandes, fuertemente gram positivos, que parecen liberar corpúsculos más pequeños (microfot. 26).

En los cultivos se observa lo siguiente:

En agar común a 37° crecieron a las veinticuatro horas dos colonias de distinto tamaño, pero de características parecidas, redondas, blanco-amarillentas, de bordes enteros, convexas, que se aislaron en placas de agar común: la (IIa), integrada por colonias de cocos grandes gram positivos, en los que se aprecian organismos más pequeños (microfot. 27) que parecen salir de ellos (lo mismo que se vió en la colonia D_2 del caso ya citado en faringe), y que resembrada en agar común a 37° dió la colonia (IIIa), formada por cocos gram positivos. La otra colonia (IIa_1), formada por estafilococos gram positivos, aunque con algunas formas sospechosas, se resembró en agar común y dió la ($IIIa_1$) de estafilococos gram positivos.

En **agar sangre** a 37° crecieron también dos colonias aisladas, la primera (1b), en agar común (microfot. 28), resultó formada por estafilococos gram positivos, son colonias grandes, blancas, brillantes, etc.; las otras, que eran más pequeñas y más planas, estaban integradas por cocobacilos unidos colateralmente en cadenas, que se resembraron a agar suero, donde se obtuvieron colonias amarillentas, planas, de bordes no

perfectamente lisos integrados por bacilos gram positivos parecidos a los corynebacterium.

En **agar malta** a 25° crecieron a los tres días escasas colonias puntiformes integradas por racimos de formas cocáceas grandes gram positivas con tendencia levaduriforme, como los observados en el caso anterior (microfot. 10).

Para un mejor entendimiento indicamos esto según el siguiente esquema:

En el sedimento se observan abundantes piocitos Gram negativos, cuerpos redondos grandes, densos (sospechosos como en tracoma). No se encuentran gérmenes y sí una serie enorme de cuerpos levaduriformes alterados.

↓ A. C. : 37° C. 27/5/54

I a

Col. grande. ↓ A. C. : 37° 28/1/54

II a

Cocos grandes gram positivo de los que salen organismos. ↓ A. C. : 37° 29/1/54

III a

Cocos gram positivos ↓ t. p. c. A. C. : 37°

Col. pequeña. ↓ A. C. : 37° 28/1/54

II a,

Estafiloc. gram positivos, aunque con algunas formas sospechosas, de mayor tamaño. ↓ A. C. : 37° 29/1/54

III a,

Estafiloc. gram positivo. ↓ t. p. c. A. C. : 37°

↓ A. S. : 37°

I b

Col. grande estafiloc, gram positivo. ↓ A. C. : 37°

II b

Estafiloc. gram positivo. ↓ t. p. c. A. C. : 37°

Col. pequeña cocobacilos en cadenas unidas lateralmente, gram positivas. ↓ A. Suero - 37°

II b,

Bacilos gram positivos. ↓ t. p. c. A. C. : 37°

↓ A. M. : 25°

I c

Hasta los tres días no aparecieron escasas colonias puntiformes integradas por racimos de formas cocáceas grandes, gram positivas.

Con el tratamiento anteriormente citado al principio de este caso pareció lograrse la curación, pero a los ocho días sobreviene una recaída, por lo que se le administra terramicina, con lo que se consigue su curación clínica, desaparece la albuminuria y en los cultivos no aparecen cocos, sino tan sólo un bacilo; en agar malta crecen a los cinco días colonias sin aspecto de levaduras, pero que resultan ser el *Cryptococus laurentii* (microfot. 29). A los treinta días se practicó un nuevo análisis, viendo en él que la orina no contiene albúmina ni otros elementos anormales, mientras que en su sedimento se observa la presencia de algún piocito, escasos diplococos gram positivos, bacilos grandes gram positivos y levaduras abundantes que presentan granulaciones (microfotografía 30).

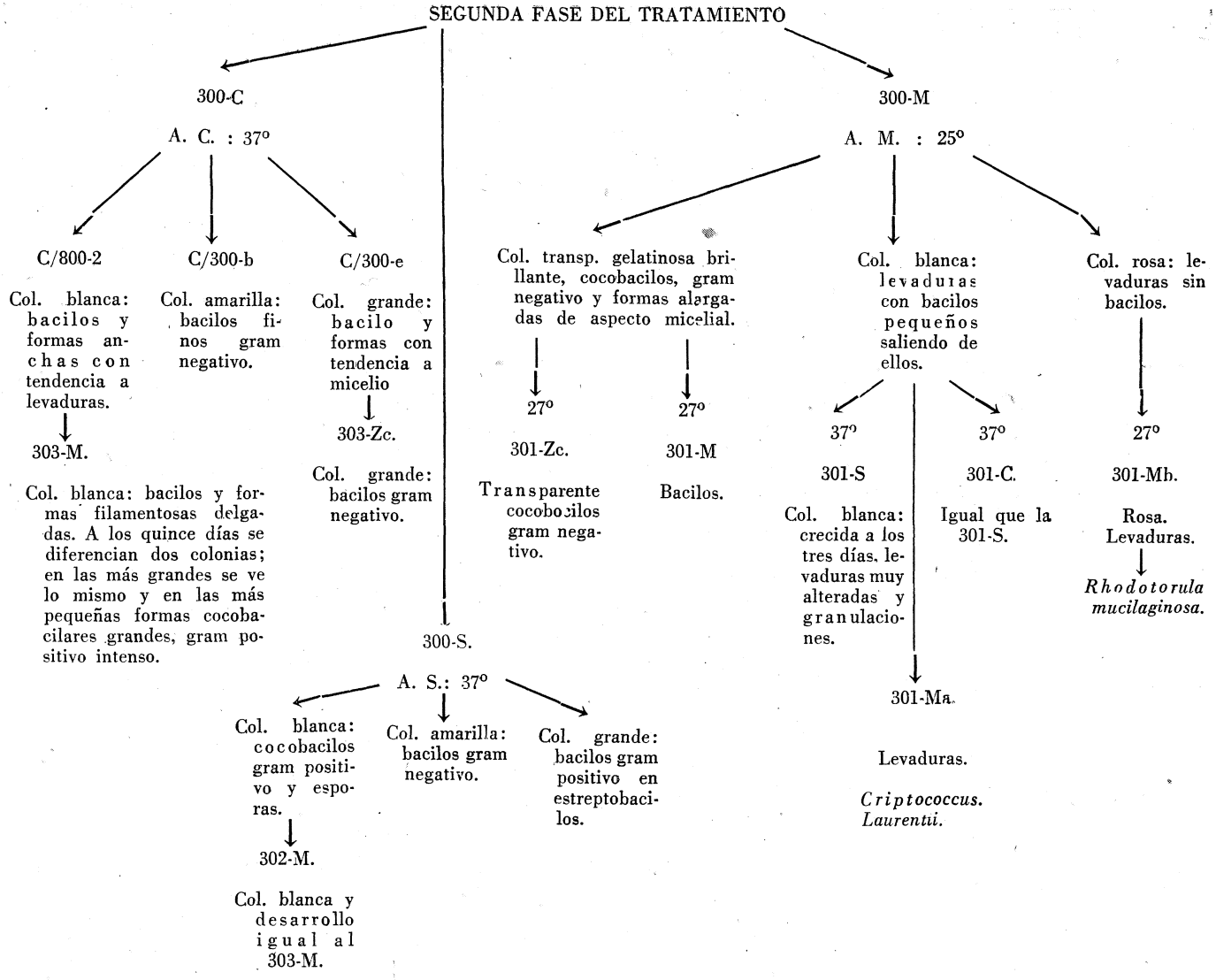
Emprendemos una nueva investigación bacteriológica mediante cultivos y tenemos que:

En **agar común** (C/300) crecen tres colonias: la (C/300 a) blanca, formada por bacilos y formas anchas con tendencia a levadura, por lo que se siembra en agar malta, obteniéndose a los diez días dos colonias: unas, pequeñas (M/303a), con formas bacilares cortas, gruesas, fuertemente gram positivas (microfot. 31), y otras, algo más grandes (M/303b), con bacilos y formas filamentosas delgadas; ambas se resembraron a placa de agar común para fijar las formas y después a tubo para clasificarlas; otra colonia, la (C/300b) amarilla, de bacilos finos gram negativos perfectamente definidos; y otra (C/300c), grande, en la que se encuentran un bacilo grueso y formas con tendencia a micelio (microfotografía 32), por lo que se resiembra a Czapeck-maltosa al 3 por 100, obteniéndose a las cuarenta y ocho horas una colonia grande (Cz/303) formada por bacilos gram negativos que no sufren variación al resembrarlos a agar común.

En **agar sangre** (S/300) crecen también tres colonias: la S/300 blanca, formada por cocobacilos gram positivos y algunas formas bacilares no teñidas que se resiembran a agar malta, donde se producen dos colonias: la (M/302a), de pequeño tamaño, blanca, con bacilos gram negativos, formas filamentosas y cocobacilos gram positivos fuerte, y otras colonias (M/302b) más grandes, formadas por cocobacilos gram positivos fuerte. Por otra parte, tenemos la colonia (s/300b) amarilla, formada por bacilos gram negativos, y la colonia grande (s/300c), de bacilos gram negativos en estreptobacilos, que se corresponden con las (C/300b) y (c/300c), respectivamente.

En **agar malta** (M/300) crecen tres colonias: la (M/300a) transparente, gelatinosa y brillante, formada por cocobacilos gram negativos y formas alargadas de aspecto micelial que se resiembran a Czapeck-maltosa (Cz/301), donde forman colonias transparentes de cocobacilos gram negativos, y en agar malta (M/301), donde a las veinticuatro horas aparecen bacilos gram negativos sin variación. Por otra parte, la colonia (M/300b) blanca está formada por levaduras y bacilos que a veces parecen salir de ellas y que se resiembran en agar sangre (S/301), donde hasta los tres días no crecen colonias formadas por levaduras algo alteradas y con granulaciones; en agar común (C/301) crecen también a los tres días colonias formadas por levaduras alteradas con granulaciones extracelulares y algún bacilo, para al cabo de cuarenta y ocho horas encontrar las mismas levaduras pero con más bacilos, mientras que en agar malta (M/301a) aparecen levaduras con granulaciones (microfotografía 33). Para terminar, hablaremos de la tercera colonia a que hicimos referencia (M/300c), que es de color rosa y está formada por levaduros y granulaciones extracelulares; se resiembran a agar malta, obteniéndose las colonias (M/301b) de levaduras normales.

En este caso, como se puede ver, intervienen cocos, bacilos pleomórficos gram variables, que recuerdan a los corynebacterium, y dos levaduras perfectamente clasificadas, Cryptococcus Laurentii y Rhodotórula mucilaginosa, según todo queda indicado esquemáticamente a continuación:


SEGUNDA FASE DEL TRATAMIENTO
300-C
A. C. : 37°
C/800-2
Col. blanca: bacilos y formas anchas con tendencia a levaduras.
303-M.
Col. blanca: bacilos y formas filamentosas delgadas. A los quince días se diferencian dos colonias; en las más grandes se ve lo mismo y en las más pequeñas formas cocobacilares grandes, gram positivo intenso.
C/300-b
Col. amarilla: bacilos finos gram negativo.
C/300-e
Col. grande: bacilo y formas con tendencia a micelio
303-Zc.
Col. grande: bacilos gram negativo.
300-S.
A. S.: 37°
Col. blanca: cocobacilos gram positivo y esporas.
302-M.
Col. blanca y desarrollo igual al 303-M.
Col. amarilla: bacilos gram negativo.
Col. grande: bacilos gram positivo en estreptobacilos.
300-M
A. M. : 25°
Col. transp. gelatinosa brillante, cocobacilos, gram negativo y formas alargadas de aspecto micelial.
27°
301-Zc.
Transparente cocobacilos gram negativo.
27°
301-M
Bacilos.
Col. blanca: levaduras con bacilos pequeños saliendo de ellos.
37°
301-S
Col. blanca: crecida a los tres días, levaduras muy alteradas y granulaciones.
37°
301-C.
Igual que la 301-S.
301-Ma.
Levaduras.
Criptococcus. Laurentii.
Col. rosa: levaduras sin bacilos.
27°
301-Mb.
Rosa. Levaduras.
Rhodotorula mucilaginosa.

Una vez más se sigue comprobando el manifiesto pleomorfismo, observando en estos casos: cocos grandes, de los que parecen salir formas más pequeñas, cocobacilos o formas bacilares cortas que tienden a ensancharse, cocobacilos con tendencia a dar formas miceliares y levaduras coexistiendo con bacilos; todo ello ya observado en el caso precedente.

Interpretando lo anteriormente descrito podemos hacer resaltar lo curioso del hecho de que en el sedimento no aparezca en principio ningún germen cocáceo, y, sin embargo, este mismo sedimento, sembrado en agar común y agar sangre, provoque la formación de colonias de cocos, que, por otra parte, son de los que no resisten, o lo hacen muy débilmente, la penicilina, y menos aún cuando ésta se asocia a la estreptomicina. Al mismo tiempo, en contra de lo que sucedió en el otro caso de la faringe, y de lo que se esperaba de los organismos levaduriformes aparecidos en el sedimento, no hubo crecimiento de levaduras en agar malta, y tan sólo a los tres días un débil desarrollo de formas grandes, cocáceas, gram positivas.

Esto se puede explicar como si en el caso de la faringe partiéramos de levaduras que eran capaces de engendrar gérmenes, lo mismo que en este caso, que también había levaduras, según observamos en el frotis, pero que estaban en una fase de alteración o desintegración que no las permitía regenerarse en el primer cultivo. Pero, sin embargo, basta la administración de terramicina en la otra recidiva para que las levaduras presentes en el frotis sean de tal naturaleza o estén en tal estado metabólico que sean capaces de desarrollarse en los medios indicados.

* Una señora de unos sesenta y cinco años, diagnosticada de cistitis rebelde, que presenta molestias más o menos localizadas con retención de orina, que analizada contiene 0,1 0/00 de albúmina y en el sedimento abundantes células epiteliales y numerosísimos piocitos, bacilos y formas difícilmente identificables (microfot. 34).

Se la trató con penicilina y penicilina-estreptomicina, fué disminuyendo esta piuría, pero sin llegar a desaparecer, y como las molestias no remiten, se practica análisis bacteriológico sembrando el sedimento de la orina recogida asépticamente en placas de agar común, agar sangre y agar malta, de las que se aislaron gérmenes cocáceos pleomórficos y de aspecto idéntico al aparecido en otros casos de antibiótico-resistencia.

La marcha seguida en los cultivos la podemos ver en el adjunto esquema, que no precisa un mayor desarrollo teórico:

FROTIS: Piocitos gram negativo, diplococcos gram positivo, formas cocáceas grandes aisladas gram positivo, grandes bacilos gram positivo de aspecto esporulado y células epitelias pavimentosas.

↓ En A. C.: 37° a las 24 h. crecen col. blancas, brillantes convex. de bordes enteros. Cocos gram positivo en racimos; formas de mayor tamaño (antibiótico - resistencia).

↓ En A. S.: 37° crecen dos col.: una grande parecida a la de A. C., formada por cocos de tamaño más uniforme gram positivo fuerte y otra pequeña de coco - bacilos gram positivo y sombras levaduriformes.

↓ En A. M.: 25° a las 48 h. empezaron a crecer colonias que a las 72 h. eran blancas, convex. integradas por formas cocáceas grandes, en paquetes, gram positivos. Se observa pleomorfismo y variación en la tinción.

Al cabo de ocho días comienzan de nuevo las molestias, lo que indica que no se ha logrado la perfecta curación, por lo que se la administran cuatro gramos de terramicina, que hacen desaparecer casi totalmente los piocitos y las molestias durante una temporada, al cabo de la cual, por tener una nueva recaída, se practica otro análisis, apareciendo en los frotis del sedimento piocitos, alguna célula epitelial, bacilos delgados gram negativos y organismos levaduriformes teñidos periféricamente.

Se realiza según costumbre el análisis por medio de cultivos sembrando sobre distintos medios y aparecen los mismos gérmenes que aparecieron en agar común y en agar sangre anteriormente, pero creciendo además en agar malta a 27° junto con formas cocáceas grandes gram positivas, colonias levaduriformes que resembradas a agar malta crecen de nuevo y se identifican como de *Cryptococcus albidus*.

* En otra enferma, también de cistitis, cuando se presentaron las molestias se realizó análisis bacteriológico de la orina, encontrando gérmenes del tipo escherichia y un *Corynebacterium pseudodiphtéricus*, bien identificados ambos mediante las pruebas necesarias. Entonces, se practica tratamiento de estreptomicina y, durante una corta temporada, desaparecen aparentemente los síntomas clínicos hasta que de nuevo vuelven las molestias; entonces se repite el análisis bacteriológico, que es el que transcribimos a continuación:

En el frotis del sedimento aparecen, junto con células epiteliales pavimentosas de vías bajas (algunas presentan abundantes granulaciones gram positivas en sus núcleos), piocitos, cocos, bacilos pseudodifté-ricos y organismos levaduriformes gram positivos.

La marcha de los cultivos se desarrolla seguidamente, y así tenemos que:

En **agar común** (DS) crecen dos colonias: una, grande, difusa, con cocos y bacilos, que, de nuevo en agar común (DSa), produce colonias de idéntico aspecto formadas por bacilos cortos y alguna forma redondeada, así como también cocobacilos ensanchados con aspecto ovoideo (microfotografía 35); resembrada a agar suero (DSa_1) producen colonias grandes, amarillentas, integradas tan sólo por bacilos gram positivos; la otra colonia, más pequeña, está integrada por cocos gram positivos, que, resembrados a agar común (Dsb), producen cocos de distinto tamaño, aunque las colonias parecen idénticas, una de las cuales se pasó a agar suero (DSb_1) para fijar mejor la especie microbiana.

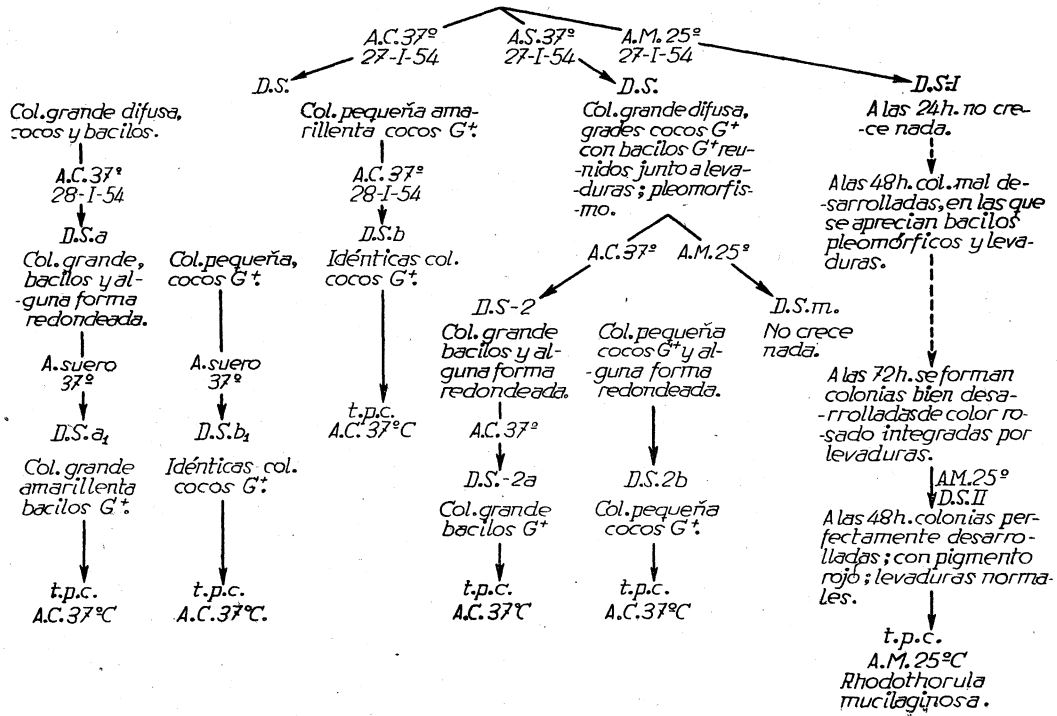
En **agar sangre** (DS/1) se obtiene un solo tipo de colonia, grande, difusa, y en la que aparecen grandes formas cocáceas gram positivas, con bacilos gram positivos agrupados y organismos levaduriformes; en estas colonias se aprecia intenso pleomorfismo. De aquí se siembra a agar malta (DS/m), donde no crece nada, y agar común (DS/2), donde crecen dos colonias que siguen las mismas vicisitudes que las procedentes de agar común citadas anteriormente, con la aparición de un coco y un bacilo gram positivo.

En **agar malta** (DS/I) no se observa crecimiento hasta las cuarenta y ocho horas a 25º en que aparecen colonias más desarrolladas integradas por bacilos algo pleomórficos con tendencia a formar micelio (microfotografía 36); estas colonias ya están desarrolladas bien veinticuatro horas más tarde y producen un pigmento rosado; resembrados a agar malta (DS/II) producen, a las cuarenta y ocho horas, colonias de levaduras normales con abundante pigmento rojo, que es la *Rhodotórula mucilaginosa*.

Así se puede ver esquemáticamente a continuación:

Sedimento de orina

Frotis: Células epiteliales de tipo pavimentoso, alguna de las cuales presenta abundantes granulaciones gram-positivas en sus núcleos, piocitos, cocos, bacilos y organismos levaduriformes gram-positivos.



Aquí también aparecen conjuntamente cocos y bacilos cortos (colonia DS), así como también las otras imágenes pleomórficas ya observadas anteriormente, que nos demuestran el paralelismo de los casos estudiados, pese a su diferente origen patológico.

Además, en este caso hemos determinado el espectro de resistencia a los antibióticos de los gérmenes aislados y comprobamos que eran resistentes a la penicilina y débilmente sensibles a la estreptomicima y a la asociación penicilina-estreptomicina, un poco más a la terramicina y más al sulfatiazol, droga que no había sido empleada.

Hemos de consignar también que la Rhodotórula mucilaginosa, aislada de esta orina y mantenida en tubo de agar malta herméticamente cerrado con tapón de goma, sufrió transformación espontánea, de la que damos una imagen (microfot. 37); lo que prueba que estas células ya poseían un factor metabólico especial procedente quizá del organismo enfermo.

3) Cuadros y resultados.

Para una más fácil comprensión expondremos los resultados obtenidos en cuadros resumidos que aclaren sinópticamente los datos finales a que se hará referencia.

Casos citados	Núm. de muestras	Levaduras encontradas
Análisis bacteriológicos efectuados	86	27
Enfermos tratados por antibióticos { esistentes ...	26	27 (1)
Enfermos tratados por antibióticos { no resistentes	18	0
Enfermos no tratados por antibióticos	11	0
Sujetos sanos examinados	31	0

(1) En un caso se aislaron dos especies.

ENFERMEDADES, LEVADURAS Y LOCALIZACION

Enfermedad	Tratamiento	Levadura aislada	Localización
Bronquitis asmática.	Pen. estr.	*Cand. Guillermondii.*	Nariz y garganta.
8 amigdalitis.	Penicilina.	*Cand. albicans.*	Garganta.
Infec. rinofaríngea.	Pen. estr.	*Cand. albicans.*	Nariz.
Varicela - Infec. garganta.	Penicilina.	*Cand. albicans.*	Garganta.
Lesión renal.	Pen. estr. clor.	*Torulopsis candida.*	Riñón.
Infec. vesícula biliar.	Pen. estr.	*Rhodotorula.*	Vesícula.
Cistitis.	Pen. estr.	*Candida albicans.*	Vejiga.
Infec. próstata.	Pen. estr. terr.	*Candida albicans.*	Prostata.
Nefritis.	Pen. estr. terr.	*Rhod. mucilaginosa.*	Riñón.
Faringitis crónica.	Penicilina.	*Debariomyces Hansenii.*	Garganta.
Pielonefritis.	Pen. estr. terr.	*Cryp. laurenti* y *Rhod. mucilaginosa.*	Vejiga.
Cistitis.	Pen. estr.	*Cryp. albidus.*	Vejiga.
Cistitis.	Estreptomicina.	*Rhod. mucilaginosa.*	Vejiga.
Cistitis.	Pen. estrep. aureom. terr.	*Rhodotorula.*	Vejiga.
Infección rinofaríngea.	Penic. estrep.	*Cryptococcus albidus.*	Nariz.
Cistitis.	Pen. estrep. terramicina.	*Rhodotorula.*	Vejiga.
Cistitis.	Penicilina.	*Candida albicans.*	Vejiga.
Nefritis.	Penici. estrep.	*Candida albicans.*	Riñón.
Faringitis.	Penicilina.	*Candida albicans.*	Garganta.

MICROORGANISMOS AISLADOS

Bacterias	Levaduras
Cocos.	*Candida albicans.*
Escherichia coli.	*Candida Guillermondii.*
Corynebacterium pseudodiftérico.	*Torulopsis candida.*
Corynebacterium xerose.	*Cryptococcus albidus.*
Enterococos.	*Cryptococcus laurentii.*
	Rhodotorula mucilaginosa.

SENTIDO EN LAS FRECUENCIAS DE APARICION

Géneros bacterianos:
Cocos > *Corynebacterium* > *Escherichia* > *Enterococo*
Géneros micoides:
Candida > *Rhodotorula* > *Cryptococcus* > *Torulopsis*

D) CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

De todo cuanto anteriormente hemos expuesto deducimos que en ciertos casos de enfermedad producida por infección bacteriana, y que es de esperar obedezca a la terapéutica de los antibióticos, no sucede así, sino que muestran resistencia al agente terapéutico y es frecuente entonces la presencia de levaduras. Esto no puede explicarse solamente por destrucción de bacterias intestinales, ya que la antibióticoterapia se

ejerce parenteralmente y no por vía oral. Pudiera pensarse entonces en la citada teoría del desequilibrio en la flora normal, por haberlo observado siempre en los casos de resistencia a los antibióticos, pero como en los últimos enfermos analizados nos encontramos con un denominador común muy significativo, que es la tendencia pleomórfica de los microorganismos aislados, que consideramos consecuente a la actividad de las substancias antibióticas o productos con ellas relacionadas, capaces, por lo visto, de originar una manifiesta variación de levadura ⇄ bacteria, suponemos que ésta es la causa.

Es muy significativo, además, que en el caso de faringe, tan a fondo analizado, no estuvieran presentes en los frotis levaduras típicas y características, sino tan sólo organismos con tendencia levaduriforme que probablemente dieron lugar a las levaduras que se formaron tras las diversas vicisitudes de la serie de cultivos. Y, por otra parte, en el caso de pielonefritis rebelde, cuyos frotis de sedimento se presentaron aparentemente abacterianos y tan sólo con siluetas o sombras de organismos con aspecto levaduriformes alterados o destruídos, y que, sin embargo, en los cultivos aparecieron gérmenes de pleomorfismo más o menos acusado y crecieron también levaduras.

Cuando en los frotis de los exudados o productos patológicos hay aparición de levaduras con granulaciones intracelulares, es más frecuente el proceso de variación o transformación —según ya hemos comprobado en experiencias in vitro—, al mismo tiempo que las colonias que se originan de ella son de aparición tardía y siguen estados intermedios en los que se encuentran junto con levaduras, gérmenes y formas de transición como los ya señalados, y de los que presentamos fotomicrografías.

También es preciso señalar que las colonias puntiformes que tardan en crecer, son propicias al pleomorfismo, transmitiendo esta característica durante dos o tres resiembras, donde ya se fijan, preferentemente, en cocos gram positivos (para las resembradas en agar común), aunque excepcionalmente pueden seguir apareciendo colonias de este tipo (D_{II} y E_{III}) que no crecen en agar común y sí lo hacen, aunque lentamente,

en agar malta, donde siguen sin definirse exactamente; y que las colonias grandes, planas, difundidas, contienen formas distintas, aunque preferentemente son bacilares, formas que acaban dando a su paso por agar suero. De mucho interés son también los gérmenes cocáceos gram positivos pleomórficos encontrados en todos los casos analizados, y en los que en algunas ocasiones hemos podido observar la existencia, entre éstos, de microorganismos más pequeños, esféricos o cocobacilos, que parecen salir de ellos, existiendo en su proximidad figuras o siluetas microscópicas gram negativas que simulan paredes celulares vacías o destruídas; esto explica quizá el que de estas colonias de grandes cocos se deriven colonias con morfología y coloración característica de estafilococo, a la vez que se forman otras de bacilos que en su evolución llegan a los corynebacteriaceae.

Los medios con sangre o suero son propicios al crecimiento de colonias con formas bacilares, mientras que en el medio de malta a 25-27º se presta al desarrollo de colonias de levaduras, pasando previamente por colonias más o menos pleomórficas o de organismos levaduriformes alterados por granulaciones.

Es preciso destacar que las distintas especies de levaduras aisladas muestran una cierta preferencia en su localización, siendo las especies encontradas en nariz y garganta del género Candida, menos en un caso que era un Debariomyces; en riñón, una Torulopsis, y en cistitis y pielonefritis aparecen Cryptococus y Rhodotórula.

E) RESUMEN

1. Se resumen los datos bibliográficos que hasta la fecha han aparecido sobre estos problemas.
2. Se han realizado 86 investigaciones bacteriológicas, de las cuales 55 corresponden a personas enfermas y 31 a niños sanos.
3. Se aislan levaduras en los 26 casos en que hubo procesos infecciosos resistentes a los antibióticos, quedando estas especies micóticas localizadas en el foco de infección.
4. Cuando la enfermedad es sensible a la terapéutica antibiótica no se encuentran levaduras. Tampoco se aislan organismos levaduriformes en faringe de los niños sanos examinados.
5. Las especies fúngicas encontradas son: 15 de Candida albi-

cans; una de Candida Guillermondii; una de Torulopsis candida; tres de Rhodotórula mucilaginosa; dos de Rhodotórula rubra; una de Rhodotórula no clasificada; dos de Cryptococcus albidus; una de Cryptococcus laurentii y una de Debariomyces Hansenii.

6. Los gérmenes clasificados a los que en principio se atribuye la enfermedad y que aparecen asociados a las levaduras son: estafilococos, enterococos, especies de Corynebacterium y Escherischia coli.

7. Se cree que esta aparición de levaduras es debida a los antibióticos o substancias derivadas de su metabolismo, que intervienen enérgicamente en el desarrollo de las especies resistentes, mediante un proceso de inducción a la variación o transformación levadura ⇄ bacteria.

F) BIBLIOGRAFIA

(1) **AKIBA** e **IWATA.**—1953. Japanese Jour. Bact., 8 (9), 951-960. Biol. Abst., 28, 18.963 (1954).

(2) ——— 1954. Japanese Jour. Bact., 9 (1), 1-4. Biol. Abst., 28, 26.345 (1954).

(3) **AKIBA, TOMOICHIRO, IWATA** y **MOCHIZUKI.**—1954. Japanese Jour. Bact., 9 (10), 895. Biol. Abst., 29, 19.135 (1955).

(4) **BIERNAN** y **LAWETZ.**—1951. Jour. Lab. Clin. Med., 37, 394.

(5) **BROWN.**—1954. Lancet., 266, 393.

(6) **BRYGOO.**—1951. Ann. Inst. Pasteur, 81, 676.

(7) ——— 1952. Ann. Inst. Pasteur, 83 (6), 818.

(8) **BRYGOO** y **SEYS.**—1951. Ann. Inst. Pasteur, 81, 107.

(9) **CAFFARENA** y **DURAND.**—1953. G. Mal. infett. parassit., 5, 57. Bull. Inst. Pasteur, 53 (4), 992 (1955).

(10) **CARLSON.**—1954. Arch. Hyg. Bakt., 138, 252. 137, 345 (1953). Bull. Inst. Pasteur, 53 (6), 1.540 (1955).

(11) **CRAIG** y **FARBER.**—1953. Am. J. Path., 29, 601.

(12) **DEARING** y **HEILMAN.**—1950. Gastroenterology, 16, 12.

(13) **DI RAIMONDO, ANGARANO, MANNINO** y **TRINCHESE.**—1952. Internatl. Zeistsch. Vitaminforsch, 24 (3), 302. Biol. Abst., 28, 14.158 (1954).

(14) **DUCHESNAY.**—1953. Therapie, 8, 632.

(15) **FISCHER.**—1955. Schw. Zeit. Für Allgem. Pathol. und Bakt., 18 (1). Laboratorio, 20 (115), 78 (1955).

(16) **FLOCH.**—1952. Bull. Soc. Pathol. Exot., 45 (5), 620.

(17) **FOLEY** y **WINTER.**—1949. J. Infections Diseases, 85, 268.

(18) **GOURTOIS, SEGRETAIN, MARIAT** y **LEVADITI.**—1955. Ann. Inst. Pasteur, 89 (1), 124.

(19) **GUIMARAES** y **SILVA.**—1951. An. Brasil de Dermatol. e Sifilogr., 26 (4), 203.

(20) **HARRIS.**—1950. J. Am. Med. Assoc., 142, 161.

(21) **HESSELTINE, HANCK, TEN** y **BOHONOS.**—1952. Jour. Bact., 64 (1), 55.

(22) **HUPPERT, MC. PHERSON** y **CAZIN.**—1953. J. Bacteriology, 65, 171.

(23) **KLIGMAN.**—1952. J. Am. Med. Assoc., 149 (11), 979.

(24) **KUNSTADTER, MC. LEAN** y **GRENGARD.**—1952. J. Am. Med. Assoc., 149, 829.

(25) **LELONG.**—1952. Antibiot. Malad. Enfance, 293.

(26) **LELONG** y **Cols.**—1953. Ann. Med., 54, 5.

(27) **LIPMAN, COSS** y **BOOTS.**—1946. J. Bact., 51, 594.

(28) **LOPES NETTO** y **Cols.**—1952. Rew. Inst. Adolfo Lutz, 12, 173. Bull. Inst. Pasteur, 53 (4), 993 (1955).

(29) **MC. NEILI** y **ROTH JR.**—1954. Jour. Bact., 67 (4), 460.

(30) **MANKIEWICZ.**—1954. Canadian Jour. Microb., 1 (2), 85.

(31) **MARSHALL, PALMER JR.** y **KIRSNER.**—1950. Jour. Am. Med. Assoc., 144, 900.

(32) **MILLER.**—1951. Ann. Internal. Med., 35, 763.

(33) **MOORE.**—1951. J. Lab. Clin. Med., 37, 703.

(34) **NIÑO, URZUA** y **NOLTE.**—1951. Mycopath. Mycol. Appl., 5, 250.

(35) **ORMEROD** y **FRIEDMANN.**—1951. Brit. Med. Jour., 15 dec. p. 1.439.

(36) **PAPPENFORT** y **SCHNALL.**—1951. Arch. Internal. Med., 88, 729.

(37) **PESLE** y **LABEGUERIE.**—1953. Rev. Tuberc., 17 881.

(38) **PORTELLA.**—1953. Rev. Ist. Sieroterap. Ital., 28 (6), 524.

(39) **RAUBITSCHERK.**—1953. Jour. Invest. Dermatol., 20 (6), 401.

(40) **REICHES.**—1951. Arch. Dermatol. and Syphylol., 64, 604.

(41) **SELIGMAN.**—1953. Proc. Soc. Exptl. and Med., 83 (4), 778.

(42) **SHARP.**—1954. Lancet, 226 (6.808), 390.

(43) **SIEBURTH, MC. NEILL, MC. GINNINS** y **SKINNER.**—1952. J. Bac., 64, 163.

(44) **SPAULDING, MADAJEWSKI, ROWE** y **BACON.**—1949. J. Bacteriol., 58, 279.

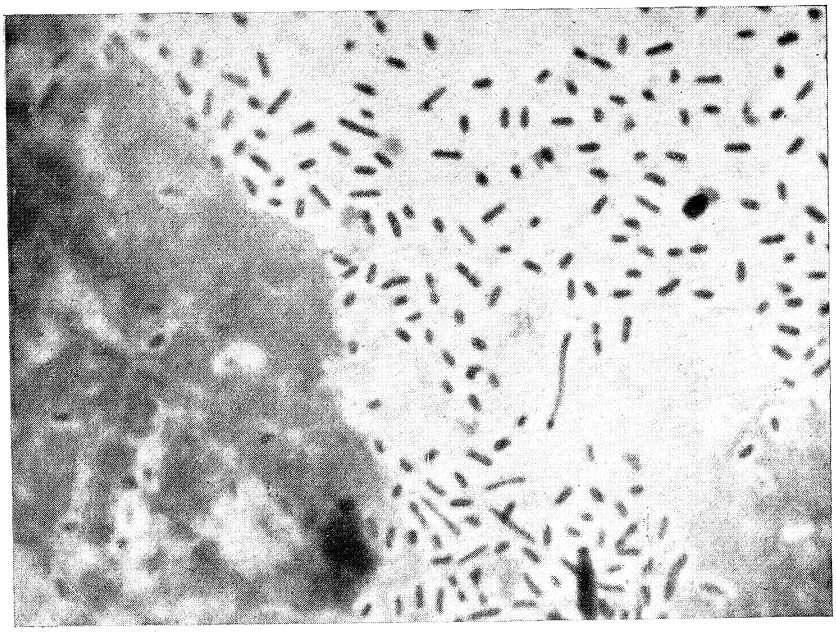
(45) **STUBBEN.**—1952. Arch. Hyg. Bakt., 136, 67.

(46) **TOMASZAWSKI.**—1951. Brit. Med. J., 4.703, 388.

(47) **VAN BREUSECHEM, BALSACQ** y **BERTRAND.**—1952. Ann. Soc. belg. Med. Trop., 32, 513.

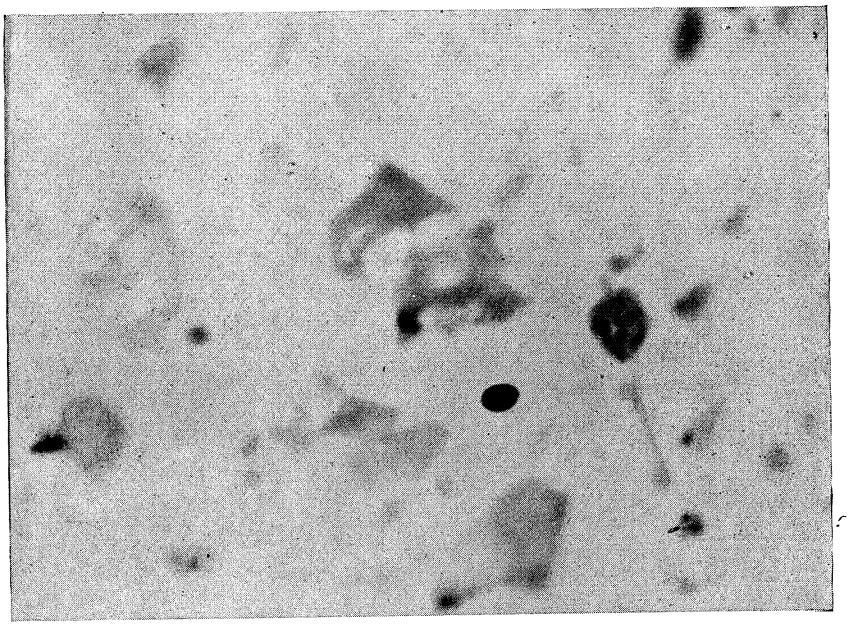
(48) **WOODS, MANNING JR.** y **PATTERSON.**—1951. Jour. Am. Med. Assoc., 145, 207.

(49) **ZOHAWI y SEMAH.**—1951. Transact. roy Soc. trop med. Hyg., 44, 551.

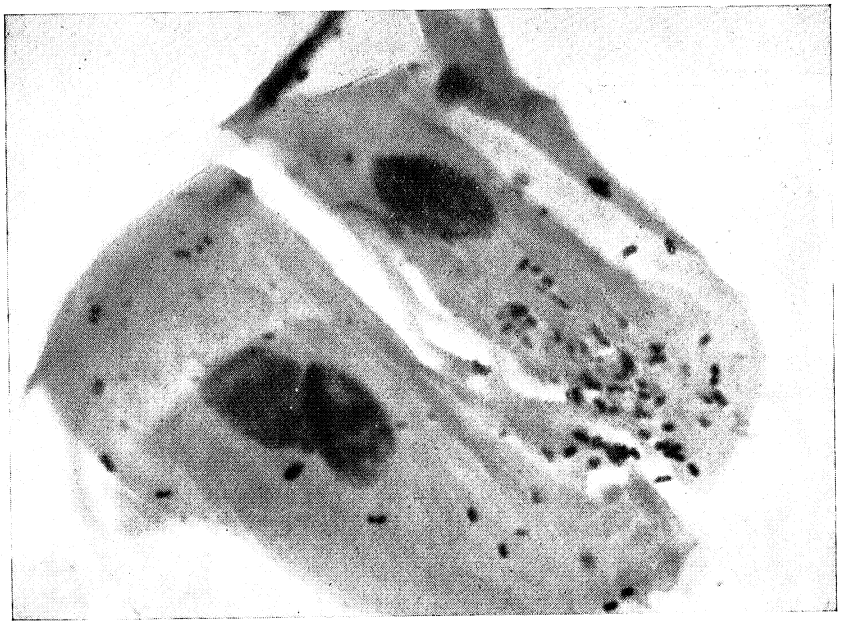


Microfot. 1.—Frotis de sedimento urinario en uno de los casos de lesión renal.

Microfot. 2.—Frotis de sedimento urinario de enfermo de próstata.

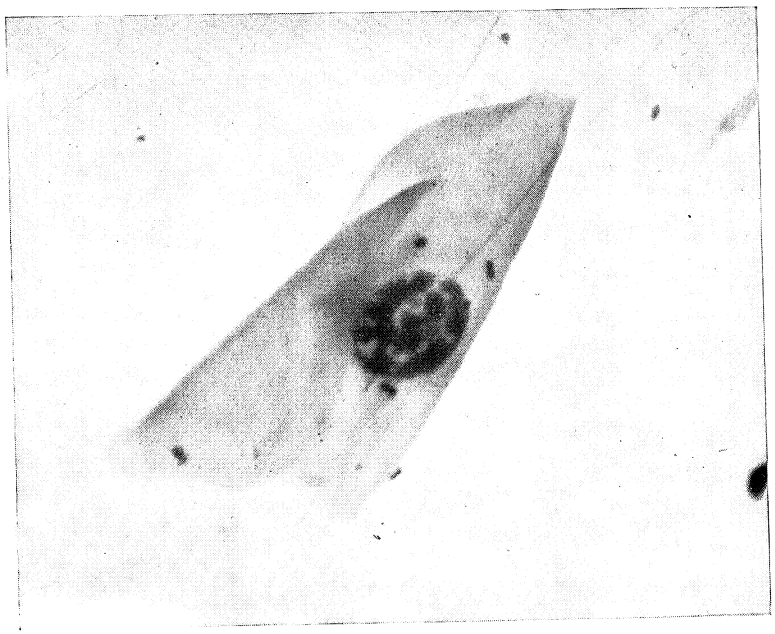


Microfot. 3.—Frotis de sedimento urinario de enfermo de cistitis.

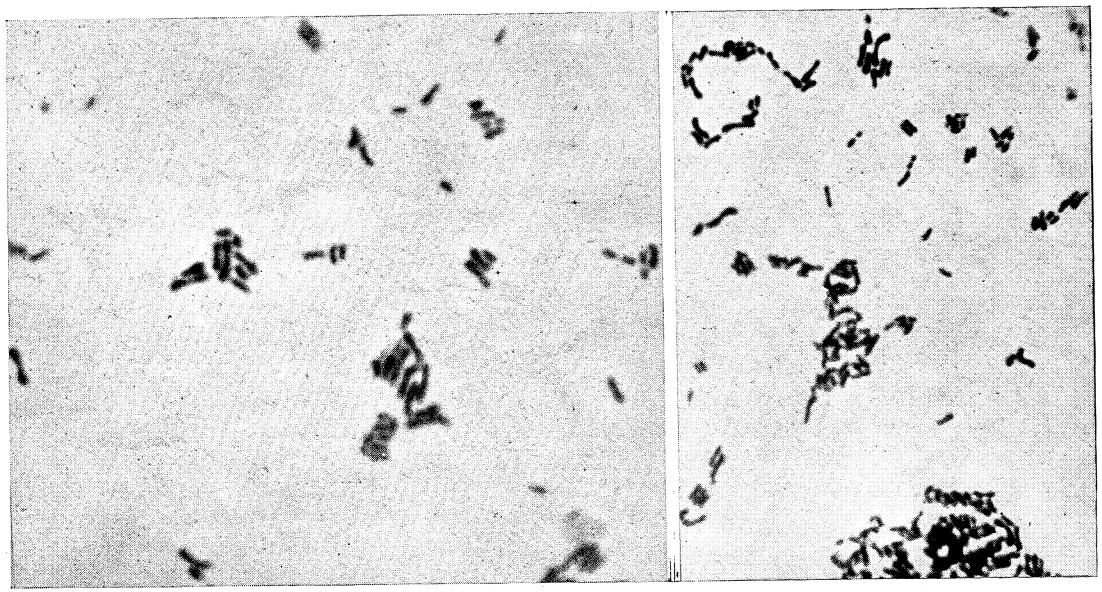


Microfot. 4.—Marcado pleomorfismo en los gérmenes que aparecen en el frotis de faringe.

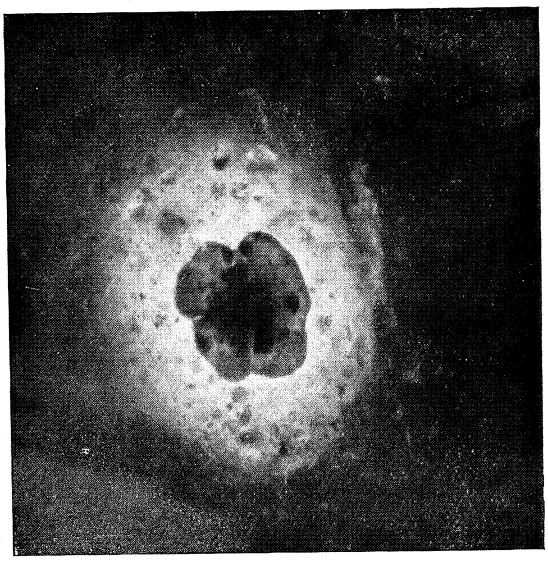
Microfot. 5.—Células pavimentosas de faringe, entre las que se observa una levadura.



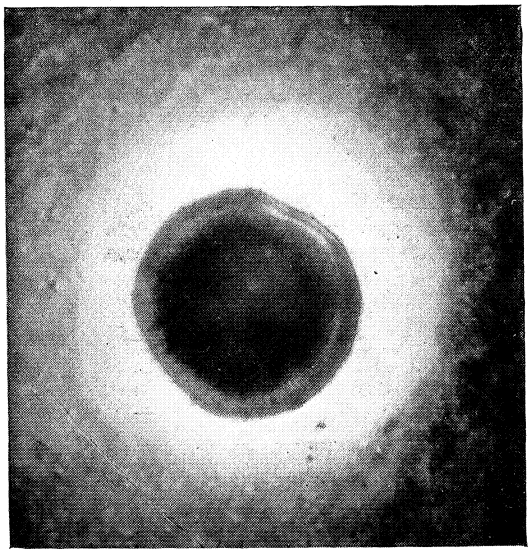
Microfot. 6.—Sombras levaduriformes gram positivas intranucleares.



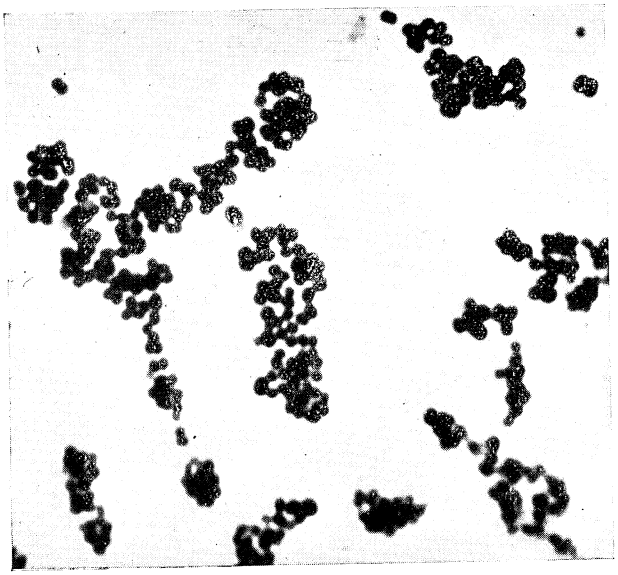
Microfot. 7.—Bacilos marcadamente mazudos.



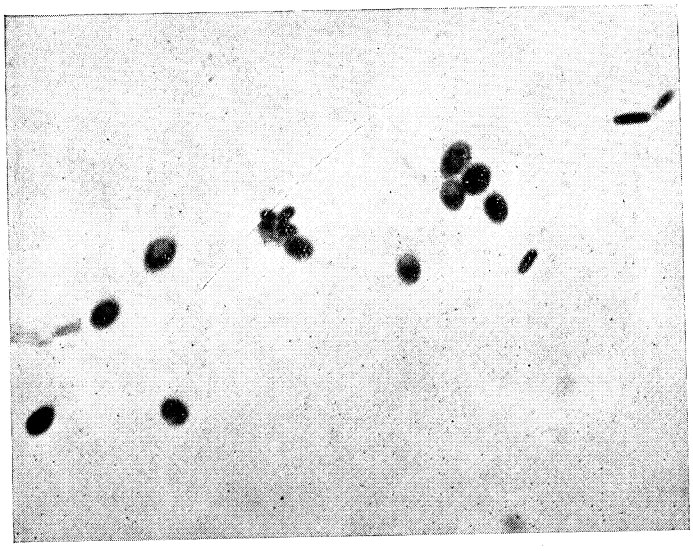
Microfot. 8.—Aspecto de la colonia E. sobre agar malta.



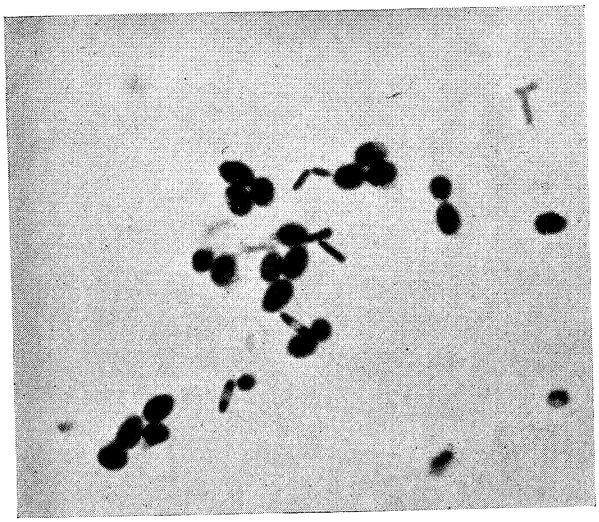
Microfot. 9.—Aspecto de la colonia D. en agar malta a las cuarenta y ocho horas.



Microfot. 10.—Colonia D: cocos fuertemente teñidos, pleomórficos, con tendencia levaduriforme.

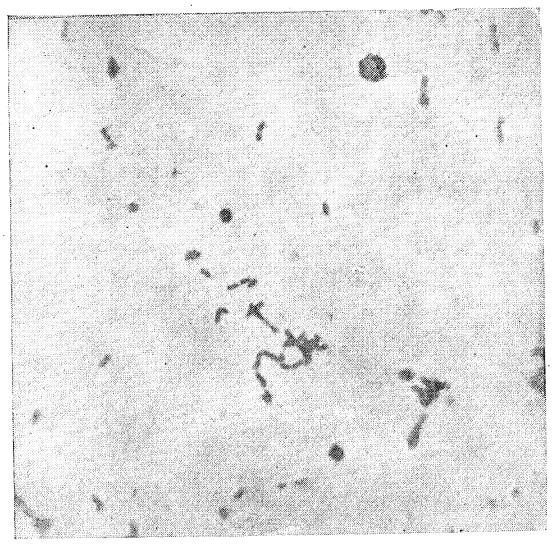


Microfot. 11.—Colonia B: levaduras y bacilos pleomórficos que parecen relacionados con ellas.

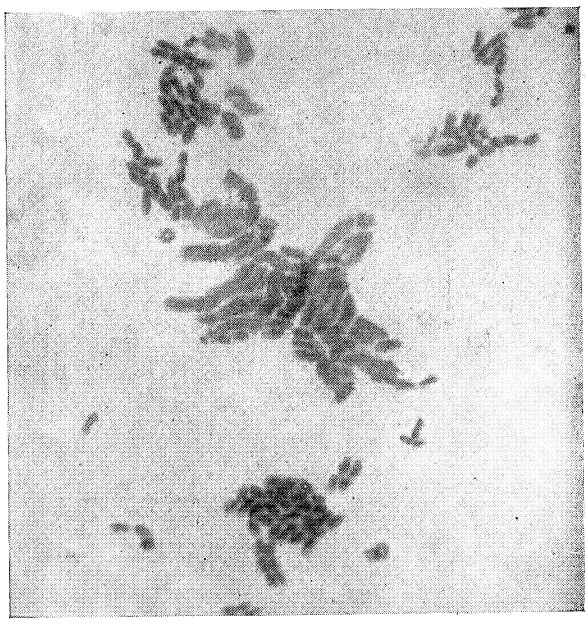


Microfot. 12.—Colonia C: levaduras y bacilos.

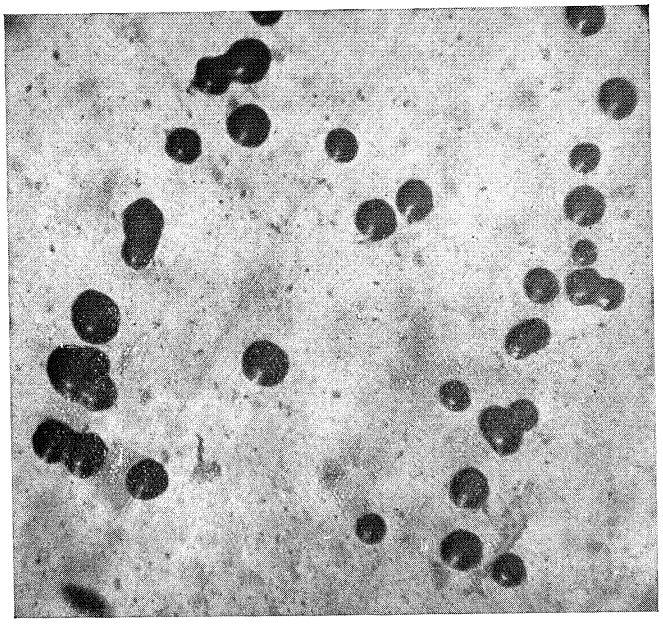
Microfot. 13.—Placa de las colonias E_1.



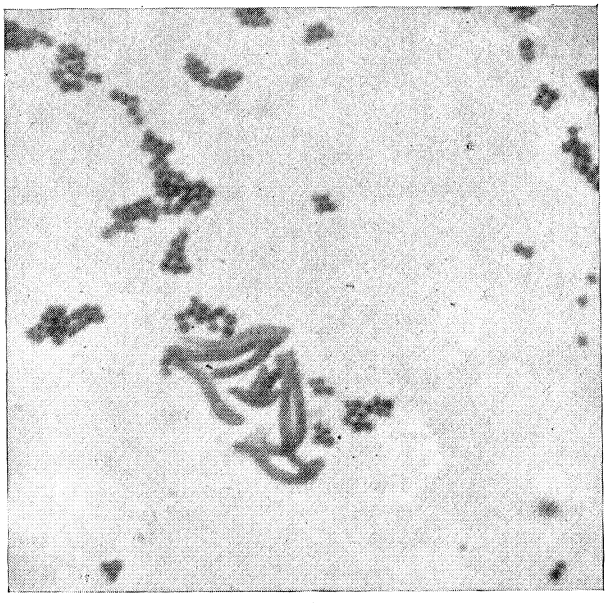
Microfot. 14.—Colonia $E_{..}$: Bacilos gram positivo y alguna forma redondeada.



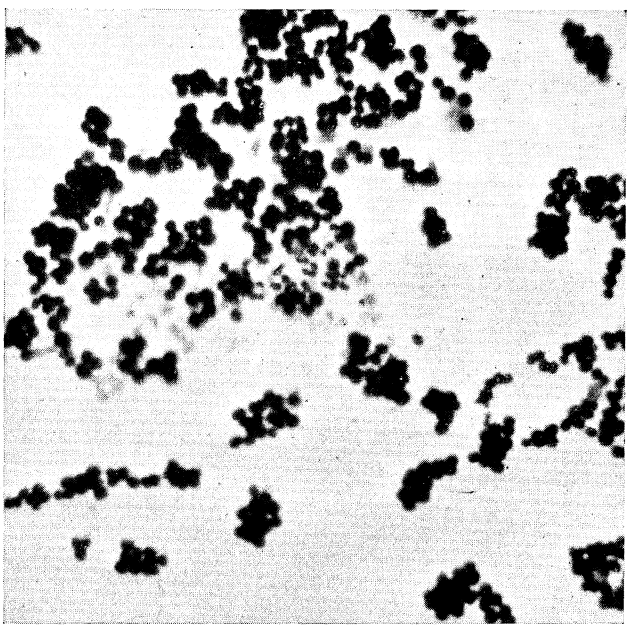
Microfot. 15.—Colonia $E_{...}$: Bacilos deformados, cuyo aspecto es parejo del de los cocos deformados.



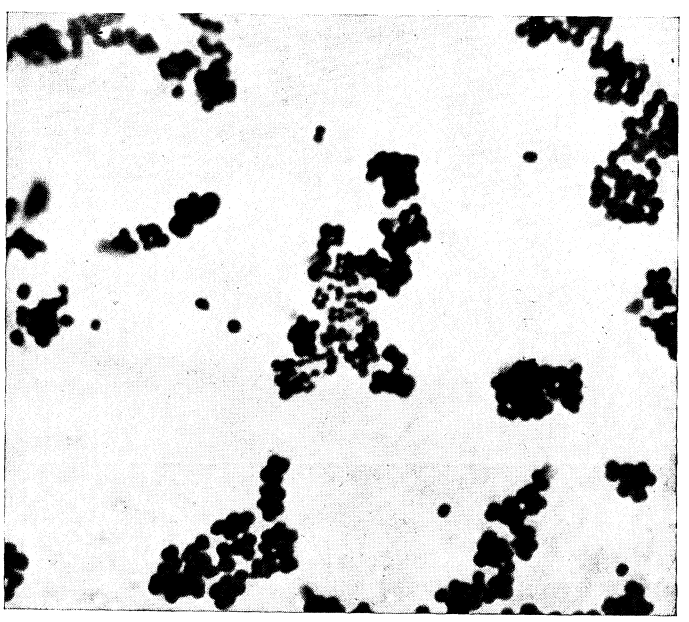
Microfot. 16.—Colonias D_1 sobre agar malta a 25º.



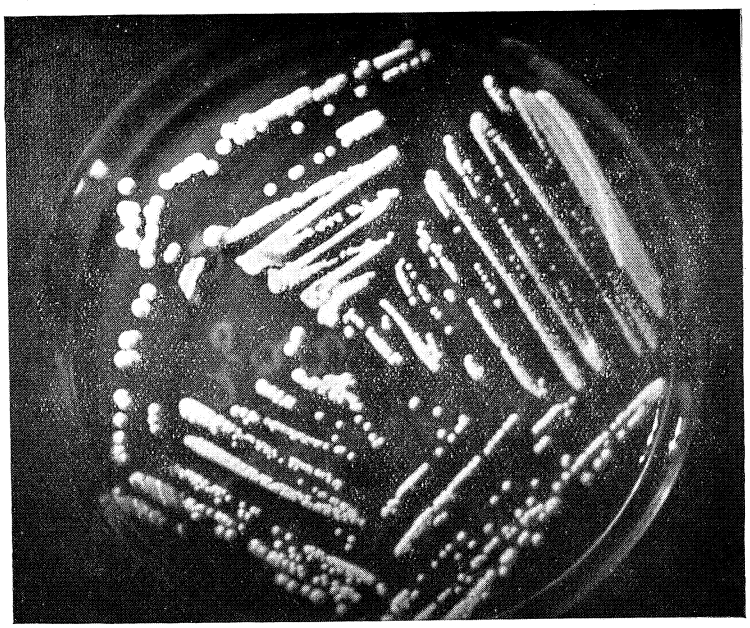
Microfot. 17.—Cocos gram positivos con formas alargadas de significación desconocida.



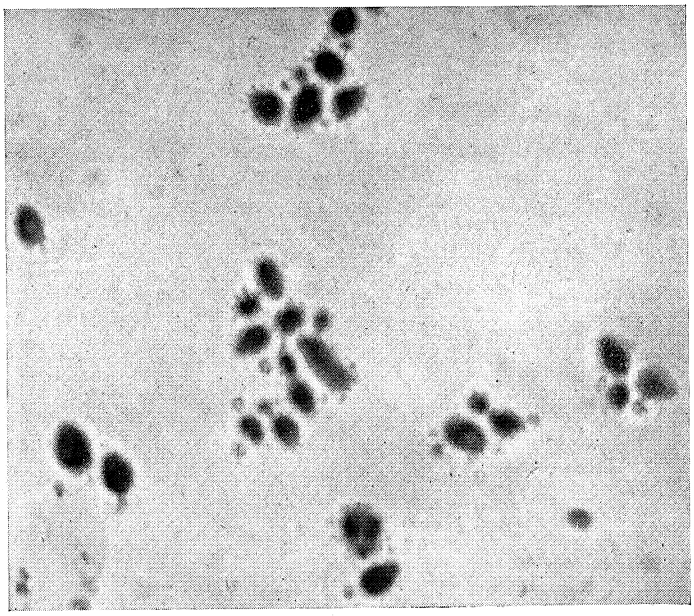
Microfot. 18.—Colonia D_2: formas cocáceas grandes, de las que parecen salir gérmenes cocobacilares más pequeños.



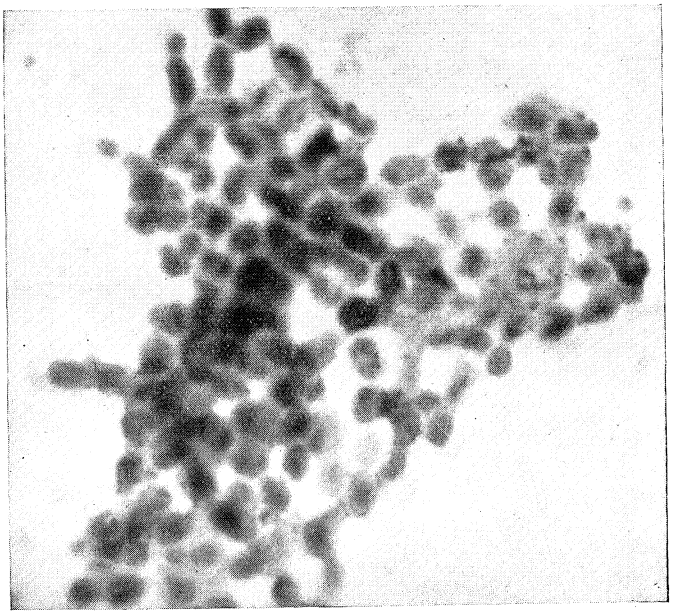
Microfot. 19.—Formas cocáceas grandes, de las que parecen derivarse pequeños cocos.



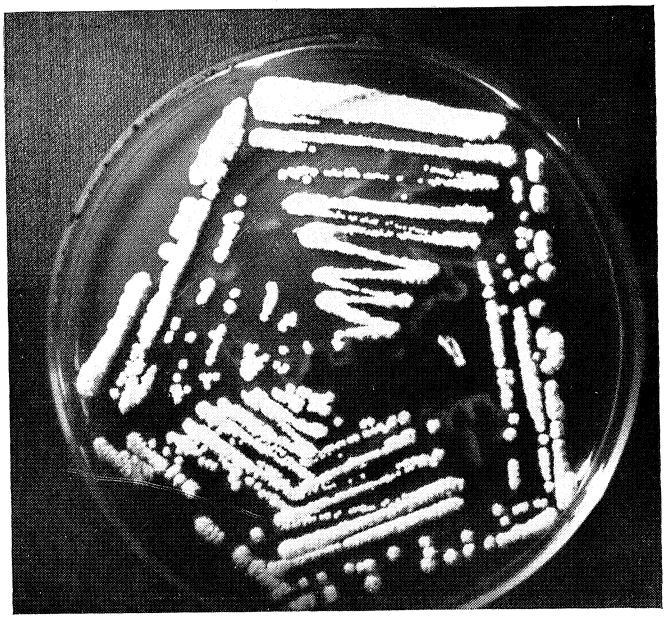
Microfot. 20.—Placa de colonias A_1 de levaduras.



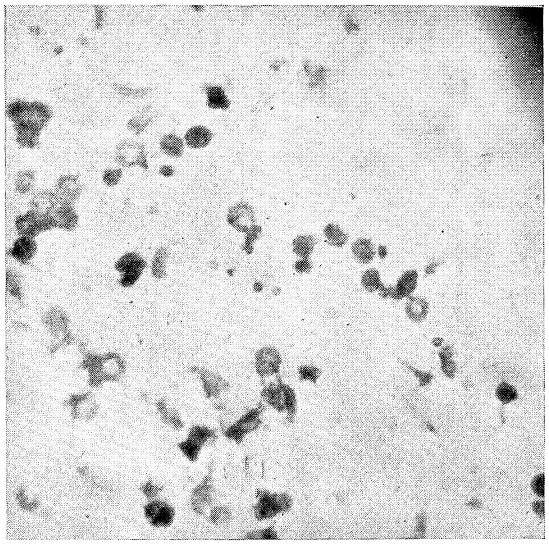
Microfot. 21.—Levaduras A_2 con gránulos refringentes en la periferia.



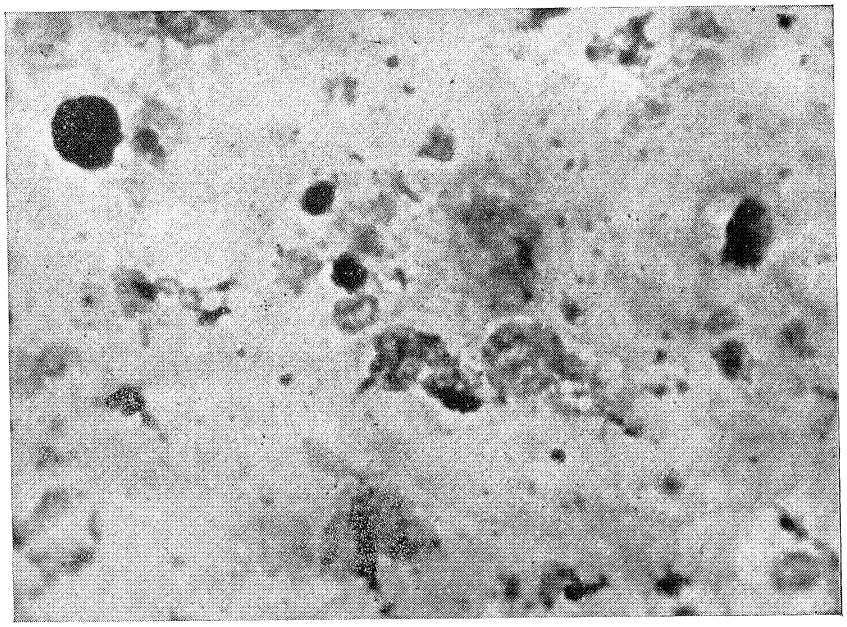
Microfot. 22.—Colonia C: levaduras con gránulos intracelulares.



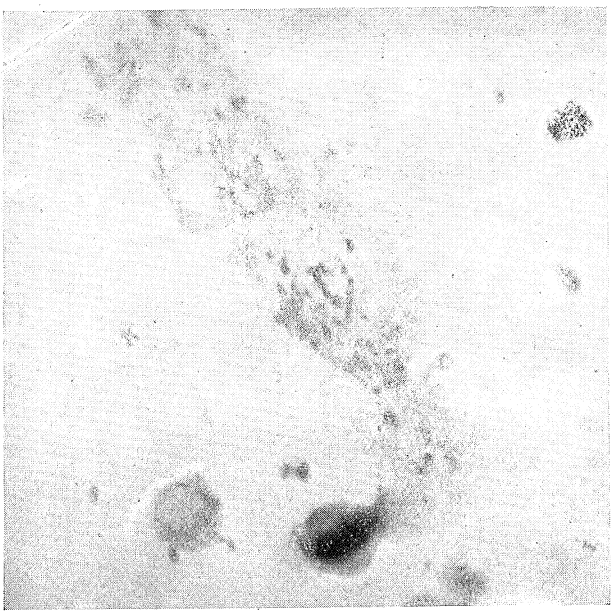
Microfot. 23.—Placa C: colonias de levaduras en fase rugosa.



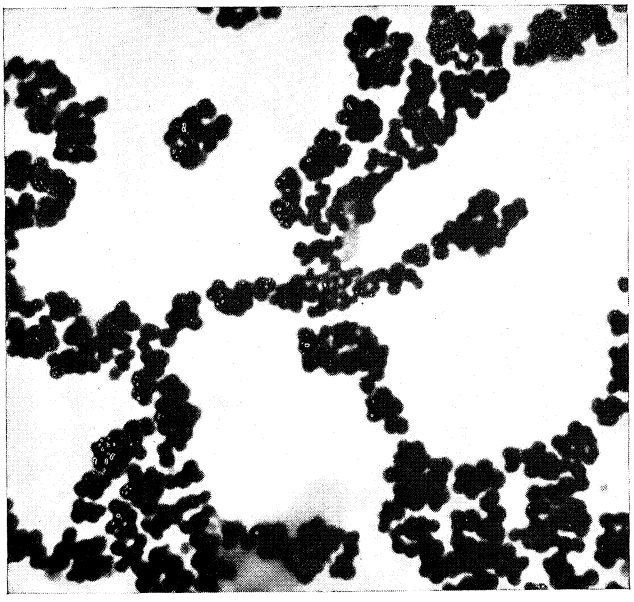
Microfot. 24.—Frotis de sedimento de orina: cuerpos levaduriformes alterados.



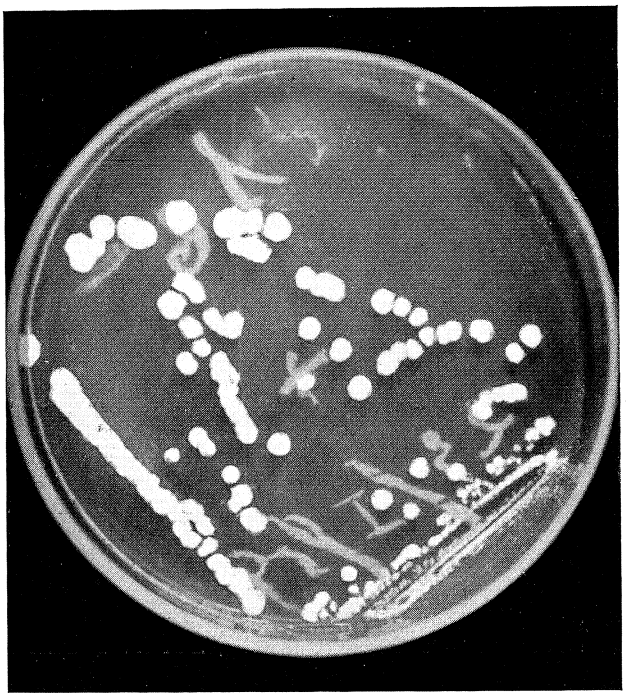
Microfot. 25.—Frotis de sedimento de orina sin gérmenes, con levaduras y piocitos.



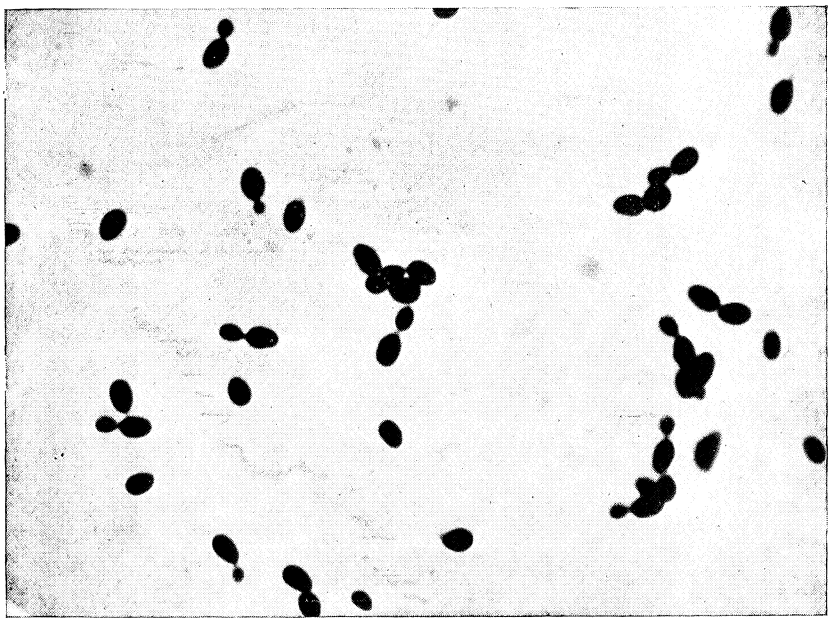
Microfot. 26.—Frotis de sedimento de orina: cuerpos ovoides que parecen liberar corpúsculos más pequeños.



Microfot. 27.—Col. IIa: cocos grandes y formas más pequeñas.

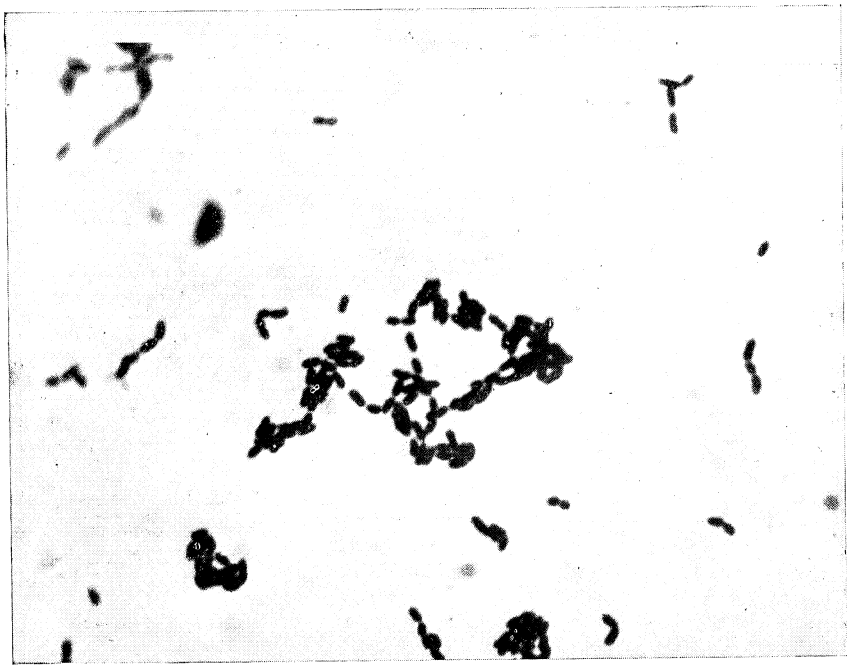


Microfot. 23.—Placa 1 b sobre agar común a 37°.

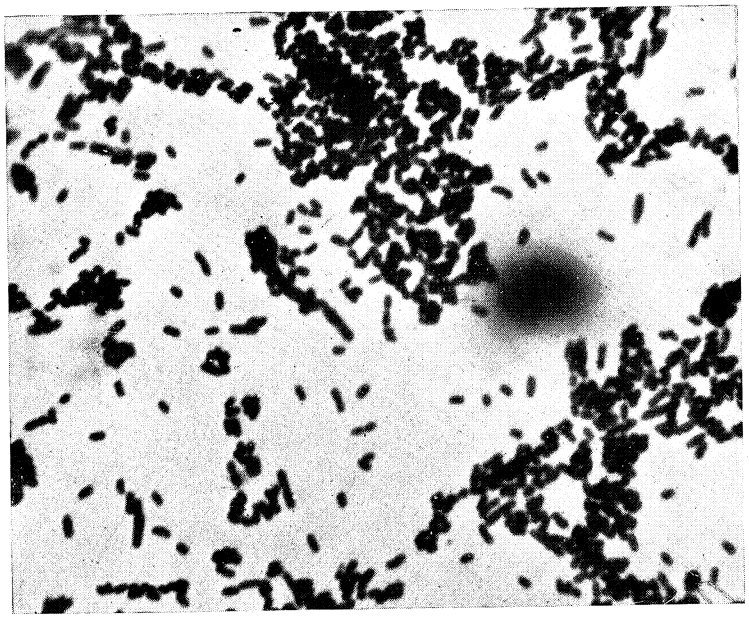


Microfot. 29.—Levaduras normales perfectamente desarrolladas de Cryptococcus Laurenti.

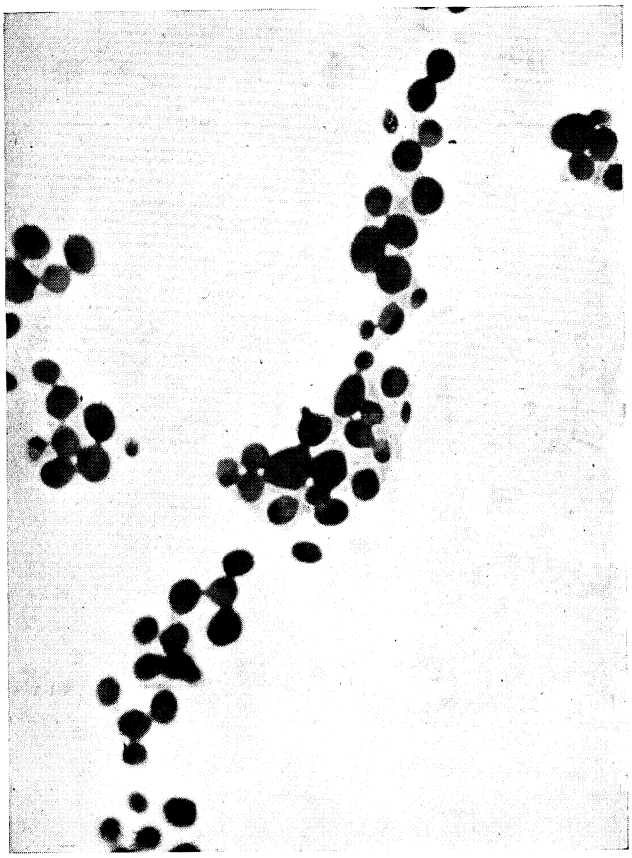
Microfot. 30.—Frotis de sedimento de orina, piocitos, levaduras y algún cocobacilo.



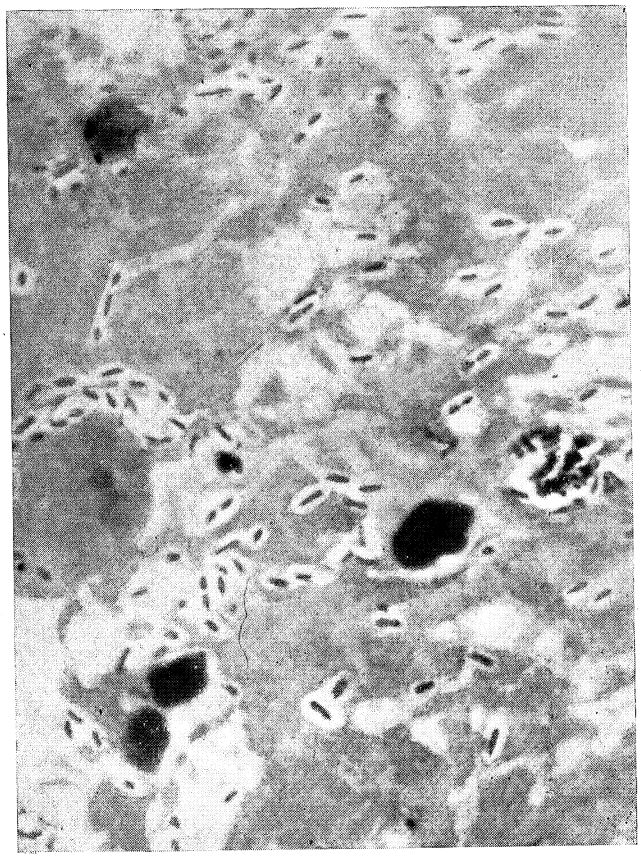
Microfot. 31.—Col. m./303 a, bacilos cortos que empiezan a ensancharse.



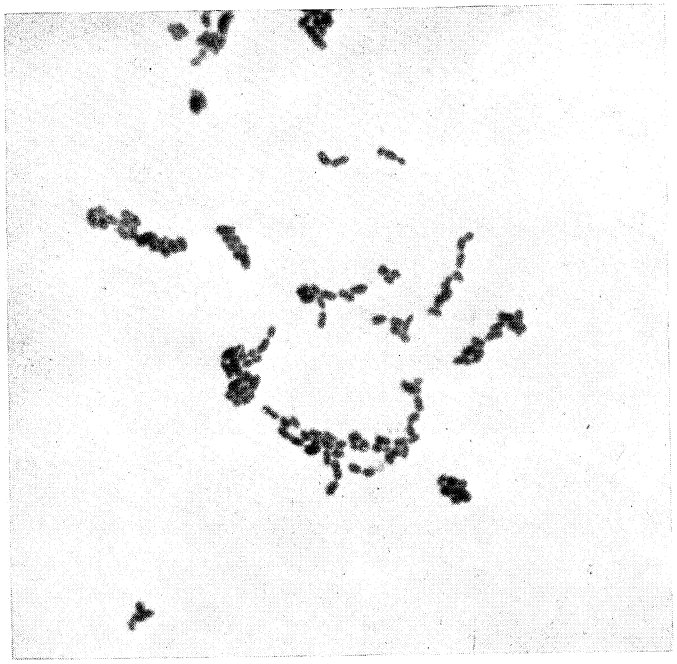
Microfot. 32.—Col. C/300 c. Bacilos con manifiesta tendencia a micelio y otros que parecen más anchos.



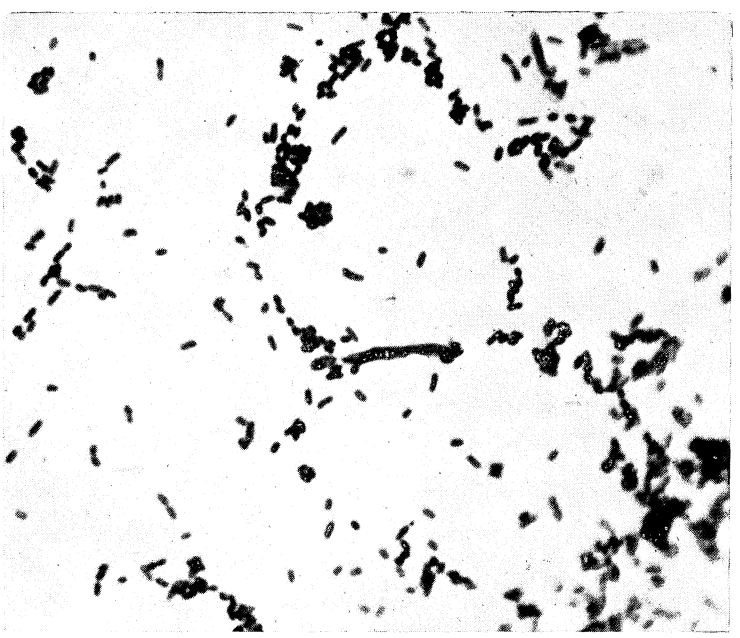
Microfot. 33.—Col. M/301 a: Levaduras de tamaño algo anormal, con granulaciones.



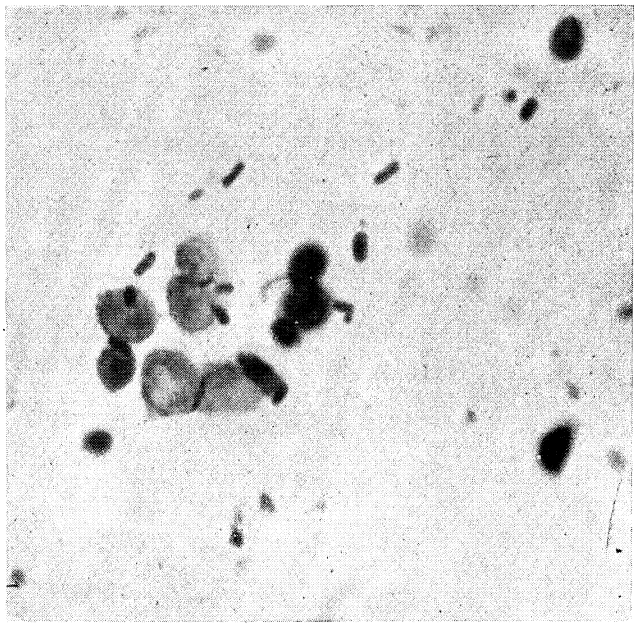
Microfot. 34.—Frotis de sedimento de orina: bacilos, piocitos y formas difíciles de identificar.



Microfot. 35.—Col. DSa: algunas formas redondeadas y otras cocobacilares, que a veces se ensanchan en tendencia levaduriforme.



Microfot. 36.—Col. DS/I: Bacilos con tendencia a micelio y alguna sombra con aspecto levaduriforme.



Microfot. 37.—Transformación espontánea a los quince días de Rh. mucilaginosa *sobre agar malta.*

INSTITUTO PROVINCIAL DE SANIDAD DE LA CORUÑA
SECCION DE BACTERIOLOGIA

EL ASPECTO ESTRUCTURAL, BIOQUIMICO Y GENETICO DEL BACTERIOFAGO. REVISION DE CONJUNTO. (Continuación.)

por
Federico Beato y González.

III. EL SISTEMA FAGO-BACTERIA

El ciclo evolutivo del bacteriófago. Su metabolismo.

A) Introducción.

Hasta ahora hemos estudiado las características de las partículas fágicas en su aspecto extracelular, estático. En esta forma, los virus están en situación de reposo, no se reproducen, no sufren un proceso metabólico. Ahora nos corresponde estudiar el ciclo evolutivo del bacteriófago, es decir, cómo el virus actúa y cómo él se comporta frente a su huésped donde se reproduce. Nosotros desconocemos hasta qué punto las características del fago en su evolución intracelular se parecen a las partículas de virus extracelular. En el interior de las bacterias el virus se comporta como un componente celular y poco sabemos en relación con la estructura de cualquier componente celular presente en la célula en su estado nativo. Sabemos que la célula no es meramente un recipiente conteniendo una mezcla de componentes, pero perfectamente integrados y organizados en su totalidad. Todos los que el mecanismo de organización e integración pueda conferir a las características de los constituyentes individuales, ellos son perdidos e inobservables después de la extracción y aislamiento de cada componente.

En la interacción entre el fago y la bacteria se pueden distinguir una serie de fases que fundamentalmente son tres: absorción y penetración del virus; síntesis de sus componentes; lisis y liberación de virus, finalmente su transmisión al nuevo huésped. Desde el punto de vista biológico, cada

una de estas fases del ciclo nos plantea problemas en relación con las características específicas de los virus. Conocemos cómo las partículas virales actúan sobre la superficie de la célula sensitiva que parte del virus, y cómo penetra, qué efectos ejerce sobre las propiedades de la célula, cómo el virus se reproduce y cuál es el mecanismo de su liberación. Sin embargo, nosotros nos preguntamos qué es lo que determina el hecho de que un virus se desarrolle en un determinado tipo de célula y no en otra, y nos preguntamos también qué tipo ecológico de relación existe entre el virus y su huésped que permite la continuada propagación y supervivencia del virus en la naturaleza. La interacción fago-bacteria puede ser considerada como un modelo más simple a consecuencia del carácter unicelular de su huésped. No obstante, aun entre virus activos sobre el mismo huésped, existen fundamentales diferencias; así resulta que aun dentro del grupo de los fagos es imposible generalizar de un virus a otro, si bien son reconocidos dos tipos principales de las relaciones huésped-virus: el lisogénico y el lítico. En relación al lisogénico será estudiado en capítulo aparte. Sólo diremos que, en este caso, el fago es portado por la célula bacteriana de generación a generación sin visible lisis y es ocasionalmente liberado dentro del medio. Nosotros podemos poner de manifiesto este fago utilizando un tipo bacteriano capaz de reaccionar con él, con la producción de una lisis visible, de manera que las placas o aclaramiento del cultivo sea observado. El tipo lítico es aquel en que el fago, después de infectar una bacteria, es capaz de causar lisis dentro de un período corto de tiempo, generalmente antes que él vuelva a dividirse con liberación de nuevo fago. Los tipos de fago capaces de establecer una relación lisogénica con la bacteria son denominados fagos moderados. Razas incapaces de establecer la lisogenicidad, pero que regularmente lisan las bacterias que ellos infectan, son denominadas virulentas. La condición lisogénica es probablemente la más importante en la perpetuación de fagos en la naturaleza y también en proveernos de información sobre el origen de los fagos y de las relaciones entre el fago y los constituyentes de la célula bacteriana. Como hemos de ver en el curso de esta revisión, una gran parte de nuestros conocimientos sobre fagos virulentos ha sido obtenida del estudio del sistema de los siete fagos, todos activos sobre un común tipo de bacteria Esch. coli raza B.

Ahora bien; desgaciadamente, la definición del carácter virulento es puramente negativa. Si después de la acción de un fago moderado muchos supervivientes no son lisogénicos, los escasos supervivientes lisogénicos, a

causa de su escasa proporción, son prácticamente imposible de aislar. Es, pues, muy importante conocer si el carácter de moderado o virulento está relacionado con otras características específicas que no sea la lisogenia. Por lo pronto, hemos de hacer resaltar que las propiedades fisiológicas de distintos fagos virulentos pueden ser completamente diferentes; así, un fago débilmente virulento puede ser uno moderado que posea probabilidades muy bajas de reducción del profago; por el contrario, un fago fuertemente virulento que induce al desarrollo de profagos relacionados está exento del poder a lisogenizar. Pero no debemos olvidar que se trabaja con un sistema en el cual interviene el material genético de la bacteria y es concebible pensar que en tanto que un fago se reconduce como muy virulento frente a un determinado germen, este mismo, frente a otro, puede ser reducido a profago. Debemos, pues, tener en cuenta dos características: la estructura del material genético y los fisiológicos efectos de las proteínas del fago. Por último, hay otras características que diferencian un fago virulento del moderado. En relación con la morfología, el fago moderado del b. cereus tiene, según Kellembergers (55 c), un tallo que está singularmente hinchado. La constitución química, las diferencias, son mínimas; algunos fagos moderados contienen menos fósforo que los virulentos. En el aspecto genético, los fagos virulentos se conducen como otros marcadores genéticos del fago. La esencial diferencia entre ambos tipos de fago parece estar ligada a la estructura del material genético del fago, que no está necesariamente relacionada con características morfológicas y bioquímicas de otros fagos. Si nosotros ponemos en contacto una mezcla de fagos moderados y una población de bacterias no lisogénicas, una bacteria puede o no ser infectada; si la bacteria ha sido infectada, puede sobrevivir o no. Si la bacteria sobrevive, puede dar lugar a un clone lisogénico. La infección ha sido reductiva. Si la bacteria ha sido lisogenizada puede dar lugar a un clone no lisogénico; si el fago infectante desaparece, la infección ha sido abortiva. La bacteria se reconduce como no infectada. La bacteria es muerta. Puede o no producir fago. Si produce fago, la infección ha sido productiva. Si no produce fago, ha sido abortiva. Si la bacteria no ha sido infectada, o se conduce como no infectada, los supervivientes pueden dar lugar a clones no receptivos, no lisogénicos. También los supervivientes pueden dar lugar a clones cuyos componentes se conducen como los de la población original. En este caso, las bacterias pueden no haber sido infectadas, o si lo han sido, el fago ha desaparecido.

Ahora bien; los estudios cuantitativos de la interacción fago-bacteria han recibido un gran impulso por la utilización de la técnica introducida por Ellis y Delbruck (56) denominada «one step growth experiment»; con ello se intenta determinar el tiempo entre la infección y la lisis y el promedio de fago producido por una o múltiples células infectadas. Este proceder ha sido ampliamente utilizado por Delbruck y Luria (54) en sus trabajos sobre interferencia de virus, y, para ello, un concentrado de bacterias sensitivas, obtenido de un cultivo en condiciones tipo, es mezclado con fago y su fijación permitida por un breve período de tiempo más corto que el intervalo mínimo entre la absorción y la lisis (período de latencia); entonces la mezcla es diluída en tal extensión que la absorción es prácticamente detenida por el frecuente descenso de la colisión fago-bacteria. Se hacen siembras para el recuento de placas en distintos períodos de tiempo. El intervalo entre la infección y comienzo de la lisis es llamado período de latencia. El tiempo entre el comienzo y final de la lisis se denomina período de alza y la relación del contaje final con el del comienzo se llama tamaño del paso. De este último es fácil de calcular el promedio del volumen de ruptura de una bacteria infectada. El total del experimento puede ser trazado sobre un papel gráfico. Durante el período de latencia no se presenta la lisis y los recuentos permanecen constantes, ya que cada bacteria infectada y sembrada produce únicamente una placa sobre medio sólido, todo lo que su fago intracelular contiene en el momento de la siembra. Durante el alza el fago aumenta rápidamente, y el aumento en el número de placas corresponde a la lisis, y la caída final sería debida al hecho de que los fagos nuevamente liberados dejan de encontrar bacterias en la mezcla diluída, en la cual quedan libres y no se reproducen. Con esta técnica aislamos un tramo en el ciclo de crecimiento; si las diluciones no fueran hechas, ello daría lugar a una serie de indistintas fases, debido a ciclos repetidos y no sincronizados de absorción y liberación, hasta que la lisis es completada y el crecimiento bacteriano detenido y con ello la reproducción del fago. Sabiendo cuántas bacterias estaban presentes inicialmente, y descontando el número de partículas de virus, añadidas originalmente pero no absorbidas, se computa el promedio de partículas de fago por cada bacteria. Este número, llamado volumen de ruptura, es de unas 180 partículas de fago T1 por bacteria. Los volúmenes de ruptura de otros fagos del sistema T fueron alrededor de 30, excepto el T2, que fué alrededor de 120. Hemos de indicar que este volumen de ruptura puede ser hasta de 1.000. Según Delbruck (56 a), parte de esta variabili-

dad puede ser debida al tamaño de la bacteria. Los estudios llevados a cabo por este autor con el microscopio a fondo obscuro parecen demostrar que las bacterias mayores liberan un promedio de partículas mayor que las pequeñas. Esta técnica nos da información sobre la duración del desarrollo fágico intracelular y de la cantidad de fago producido.

Una muy importante modificación del método descrito «one step-growth experiment» es el denominado por Elis y Delbruck (56) «single-burts experiment». En esta técnica, después de que el fago ha sido absorbido por la bacteria, la mezcla es diluída hasta que su contenido en bacterias infectadas sea muy bajo: 2 por c. c.; entonces 0,2 c. c. de las distintas diluciones son distribuídos en distintos tubos antes de que la lisis comience. Muchos tubos no recibirán bacteria alguna infectada, algunos podrán contener una y otros, los menos, más de una bacteria infectada. Los tubos son entonces incubados, y después de que la lisis es completada, la totalidad de cada tubo es sembrada sobre una placa de petri para el contaje de zonas claras. En muchas de las placas o no se observan zonas de aclaramiento o presentan una o dos placas, representando ello partícula no absorbida que, sin duda, no se reprodujo. Los otros cultivos pueden presentar relativamente gran cantidad de placas y muchos de ellos el contenido de la ruptura de una sola célula. Sin estos métodos, el fago no absorbido puede ser eliminado antes de la lisis, bien lavando los gérmenes, libres del líquido sobrenadante, o mejor añadiendo a la mezcla determinada cantidad de suero antifago, que inactiva el fago libre, sin afectar el fago absorbido, según técnica de Delbruck (44).

B) Absorción y penetración.

La absorción inicial de la partícula fago sobre el huésped bacteriano supone una unión reversible entre los dos elementos reaccionantes y que es función no solamente de la configuración de su superficie, sino que supone la presencia de iones específicos en el medio y en ciertas ocasiones de determinadas substancias orgánicas como el triptofano y otros aminoácidos. Esta fase reversible es seguida por otra irreversible, durante la cual es imposible alejar el fago absorbido de la superficie bacteriana. El término absorción se refiere fundamentalmente al período del ciclo de vida en el que el fago y la bacteria se unen en forma irreversible. Es posible que la primera interacción entre la bacteria y el fago sea indispensable en el proceso de reproducción del fago y que la síntesis de la progenie

viral esté preacordada en esta reacción. Seguramente que este primer período en el proceso de absorción represente el mecanismo para la introducción de una porción efectiva del virus dentro del medio celular necesario para la propagación del fago. Ahora bien, la absorción de una o más partículas fago por una bacteria sensible es influenciada por las condiciones fisiológicas de las bacterias y también por la composición del medio. Así, en agua destilada o en una determinada solución de iones Na o K la absorción de fagos del grupo T fracasa. Al aumentar la concentración de cationes la obsorción se hace posible; el óptimo de concentración que permita la máxima absorción es característica para cada fago y cada ión. Esto es probablemente debido a una combinación entre el ión y la superficie bacteriana. La absorción en solución salina con baja concentración de cationes es reversible. Los trabajos de Garen y Puck (57) y Garen, Puck y Cline (58) demuestran que la obsorción reversible no conduce a cambios demostrables en la bacteria. En un medio buffer con óptima concentración de iones, la tasa absorción se aproxima a un valor de 4 a 5×10^{-9} c. c. en un minuto. La enorme eficacia de la reacción de absorción sugiere que la absorción del fago puede ocurrir por el subsiguiente contacto de el fago con cualquier lugar de la superficie bacteriana. Es notable el hecho de, aunque específico para cada fago, el requerimiento de iones para el proceso de absorción reversible no son específicos para la combinación fago-bacteria. Una situación análoga existe para otra clase de elementos requeridos para la absorción del fago, principalmente para los denominados por Anderson (31) cofactores orgánicos. Los fagos T4 y T6 entre las razas del grupo T existen en dos estados, activo e inactivo, dependiendo de la presencia de ciertos aminoácidos el ser o no ser absorbidos por bacterias cuyo medio de cultivo contenga determinados cofactores. L-triptofano es el más efectivo cofactor de absorción; otros aminoácidos son menos eficaces, como la fenil-alanina, de menor actividad. La sustitución en el anillo aromático del triptofano preserva su actividad. La sustitución en la cadena alifásica la anula. Los trabajos de Delbruck (59) demuestran que el indol análogo al triptofano es un competitivo inhibidor de la acción del triptofano. La acción del triptofano es compleja. El aminoácido se combina reversiblemente con el fago, siendo la reacción rápida en ambas direcciones. La influencia de la concentración sobre la activación y desactivación es mejor interpretada suponiendo que cada molécula de triptofano es absorbida independientemente por la partícula fago, y que la activación resulta de la formación sobre la superficie del fago de com-

plexos autoestabilizantes; cada complexo estaría constituído de cinco moléculas de un aminoácido (trabajos de Stent y Wallmann, 60). Ha sido estimado que el número de moléculas de cofactores asociadas con cada partícula fago es del orden de las 200. El fenómeno del cofactor es interpretado por Garen y Puck (57) (suponiendo que la superficie del fago, modificada por las moléculas del cofactor cuando éstos son necesitados, suministran una base en la cual los iones se enlazan y forman un cierto conjunto de cargas eléctricas que son precisas, a fin de permitir el contacto entre el fago y los receptores específicos bacterianos. La absorción irreversible o fijación puede entonces ocurrir interviniendo otro mecanismo de carácter enzimático (trabajos de Garen y Puck, 57), es decir, el fago incorporaría un enzima cuyo sustrato específico forma parte de la superficie de la célula huésped; el cofactor podía entonces actuar como coenzima o grupo prostético de esta enzima. La actividad del indol como inhibidor del triptofano es notable, pues resulta un ejemplo de la existencia de un mecanismo de defensa específico contra los virus. El indol es un producto del metabolismo del triptofano por el coli; la bacteria huésped para los fagos T4 y T6 que precisan del cofactor triptofano, si éste se encuentra en el medio en exceso, el indol producido puede actuar previniendo la absorción de estos fagos, y al lado de la raza original de fago T4 se han aislado un número de líneas que parecen requerir menos cofactor de activación; estas razas, aisladas por Anderson (60 a), a su vez tienen la particularidad de que son inhibidas únicamente utilizando grandes concentraciones de indol. Delbruck (59) ha aislado dos tipos adicionales, T4-11, que requiere L-triptofano y es inhibido por el indol, y T4-12, que requiere además de L-triptofano, el calcio y es más fuertemente inhibido por el indol. Se pueden observar, como dice Anderson (60 b), dos facetas metabólicas en la resistencia natural o sensibilidad de un huésped: 1, el huésped puede suministrar cofactores necesarios para ciertos virus y ser sensitivos a ellos; 2, él puede elaborar substancias, como el coli elabora indol, que bloquean la actividad de otros virus y lo hacen resistente a ellos.

Ahora bien; como regla general, diremos que únicamente aquellas bacterias en las cuales puede desarrollarse el fago son capaces de absorberlo. Ya en 1942, Delbruck (61) sugiere la idea de la absorción del fago por la célula bacteriana, por el encaje estérico de las estructuras específicas y complicadas de los virus en las estructuras complementarias de la superficie del huésped. Recordemos que éste es el mecanismo propuesto por Pauling y Pressman para la reacción igualmente específica an-

tígeno-anticuerpo. Pero, sin embargo, estos dos procesos son completamente diferentes: el anticuerpo meramente se combina; el fago penetra en la bacteria y convierte la célula huésped en productora de virus. Burnet (45) considera que la superficie polisacárida de la bacteria es fundamental en la absorción de extractos libres de células conteniendo estas substancias inactivan aquellos fagos que eran activos sobre las bacterias que habían producido el polisacárido inactivante. Se puede, pues, admitir que el fago se fija sobre un constituyente determinado de la bacteria, al cual se ha dado el nombre de receptor. Es, pues, la posesión del receptor apropiado lo que condiciona la sensibilidad de una bacteria a un fago dado y es la fijación del fago sobre el receptor que, permitiendo el acceso del germen, tolera eventualmente al agente lítico de utilizar para su beneficio el metabolismo de la bacteria y de reproducirse; sin embargo, esta última consecuencia no es fatalmente determinada por la realización de la condición inicial necesaria: la fijación. Por tanto, la extraordinaria especificidad que caracteriza la unión entre el fago y la bacteria susceptible debe ser gobernada por la estructura química precisa de las substancias distribuídas sobre la superficie del fago y del microorganismo que dicho virus ataca. Nosotros poco podemos decir con referencia a la naturaleza química de los componentes virales que entran en combinación específica con la célula bacteriana, pero hay evidencia de que es la superficie del antígeno con lo que se combina el virus cuando el proceso infectivo se ha iniciado. Un gran número de investigadores ha observado que los extractos bacterianos son capaces de inactivar in vitro aquellos fagos a los cuales la célula es susceptible. La naturaleza química del agente activo en tales extractos no ha sido plenamente determinada; sin embargo, como ya hemos indicado, parece ser que estas substancias pertenecen al grupo de los carbohidratos o compuestos de mayor complejidad molecular, a los cuales se ha incorporado un inmunológicamente activo polisacárido. Goebel y Jesaitis (62) llevaron a cabo en los laboratorios del Instituto Rockefeller sobre los antígenos somáticos, fase II del Sh. sonnei. Este germen es susceptible a cinco de los siete fagos T, al T2 y T6 y al T3, T4, T7. El antígeno de fase II Sh. sonnei era primeramente aislado de gérmenes que habían sido muertos por formol al 1 por 100. El material estudiado contenía 5 por 100 de N. y 3,1 por 100 de Ph. Por hidrólisis daba 24 por 100 de azúcar reductor y fué caracterizado como un complexo de lipocarbohidrato-proteína. Se pudo comprobar que este complexo era capaz de inactivar in vitro y en muy pequeñas cantidades los fagos T3, T4

y T7. Mejoraron la obtención del antígeno sonnei y obtuvieron un preparado menos degradado y que denominan lipo-moco-proteína, la cual retiene toda la especificidad serológica de la bacteria intacta e inhibe in vitro a los cinco fagos T, a los cuales es suceptible la fase II Sh. sonnei. Si la hipótesis de que la estructura química de la superficie del antígeno determina su habilidad a combinarse con la de los cinco virus T es cierta, entonces será posible demostrar diferencias en el conjunto químico de este antígeno y de los variantes fago resistentes derivados de la fase II del Sh. sonnei. En efecto, mientras que el compuesto purificado lipo-monoproteína obtenido de la fase II inactiva los cinco fagos T, el antígeno derivado de una variante fago resistente es capaz de inactivar el T2 y T6, pero no a los T3, T4 y T7. Un detallado estudio ha sido realizado de estos dos componentes lipocarbohidratos. Se comprueba que mientras la actividad antiviral hacia el T3, T4 y T7 es poco alterada en su tratamiento por el fenol, ella resulta destruída frente al T2 y T6. Parece, pues, que la inactivación de los virus T3, T4 y T7 es una función del lipocarbohidrato. La presencia del componente de la proteína residual en los antígenos degradados enzimáticamente parece ser esencial para la inactivación de T2 y T6. Hay, pues, una clara correlación entre la posesión de ciertos antígenos y la sensibilidad de los diferentes fagos. Así, un fago activo sobre una bacteria del género Salmonella puede ser dividido en varios grupos. Unos actúan exclusivamente sobre la forma lisa. Es natural que pensemos si la actividad de estos fagos está en relación con la presencia en la variedad lisa de los antígenos somático y flagelares o cápsulas y, por tanto, si se trata de fagos O, H o K. Pero lo que es evidente es que esta actividad está ligada a la calidad, puesto que la forma rugosa es refractaria. Otros bacteriófagos actúan sobre las dos formas lisa y rugosa; éstos son los fagos R de Félix (63). Los receptores bacterianos de estos fagos están probablemente constituídos por polisacáridos R específicos de grupo que están presentes a la vez en la forma lisa y rugosa o pueden ser receptores no antigénicos cuya existencia ha demostrado Beumer (64) y que serían comunes a las dos formas. Por último, una tercera categoría de fagos activos sobre la forma rugosa y totalmente desprovistos de acción sobre la forma lisa ha sido también observada. Algunos fagos frente al b. tífico son específicos para razas que portan antígeno Vi; estos fagos son utilizados en el método de fago-diagnóstico.

Parece, por tanto, evidente que la superficie antigénica de la bacteria es afectada en la absorción del fago. Una bacteria sensitiva contiene

fracciones que inactivan el fago homólogo. Sin embargo, el problema no es tan sencillo como parece, ya que, como hemos podido observar, mientras que unas veces el poder inactivador del fago radica en la fracción polisacárida, otras radicaría en el complexo carbohidrato-lipo-proteína en su forma nativa (trabajos de Miller y Goebel, 65). Por otra parte, los trabajos de Weildel (66) han demostrado que el fago se puede combinar específicamente con carbohidrato liberado de la pared celular obtenido por extracción de las bacterias. Esta membrana residual bacteriana es lentamente destruída al incubarse con el fago, pero el mecanismo de este proceso nos es desconocido.

Ahora bien; la fijación de las partículas fágicas en las bacterias susceptibles se puede poner en evidencia por medio del microscopio electrónico. Anderson (61 a) obtiene microfotografías electrónicas utilizando el fago T4 activado con triptofano, comprobando en las bacterias sensibles como una serie de fases en el proceso de absorción. Algunas partículas aparecen en contacto con la pared celular, pero otras visiblemente quedan inalterables. Otras presentan sus tallos mezclados con sus cabezas, descansando contra la célula huésped. En ocasiones aparecen como vesículas sobre la pared de la bacteria, y gran parte de su estructura interna ha desaparecido, probablemente en el citoplasma de la célula huésped. En algunos momentos del proceso la reacción se hace irreversible, el virus, al penetrar, forma un complexo virus-bacteria, del cual la partícula fago no puede ser recuperado y su función ahora es producir más partículas virus. Este es el punto en el cual se dice que el virus ha sido absorbido en un sentido fisiológico. En un gran número de bacterias las partículas virus envuelven la célula, muchas de las cuales son lisadas, pero algunas de ellas resisten y se multiplican formando colonias.

Resumiendo, el mecanismo de absorción del fago sobre su huésped parece ser mucho más complicado que lo que a primera vista parece. Es una colisión que ocurre entre dos cuerpos, uno de los cuales, la bacteria, excede en mucho en tamaño al otro. Pero esta colisión puede efectuarse con huésped sensitivo sin que se produzca la absorción, es decir, que en condiciones desfavorables el proceso de colisión que conduce a la absorción puede ser grandemente reducida y hasta anulada; por tanto, en lugar de considerar el proceso como un simple enlace estérico de estructuras complementarias y superficiales, nosotros debemos mirarlo como un proceso dinámico, implicando períodos enzimáticos de degradación y desíntesis.

C) El período de latencia en la multiplicación del fago.

Siguiendo a la absorción del fago hay un intervalo antes de que la lisis se produzca sin que normalmente sean producidos fagos. Es decir, al penetrar la partícula en la bacteria sufría ésta una profunda alteración, de tal magnitud, que ella sería incapaz de infectar nueva bacteria. A esta nueva situación de la partícula infectante se ha denominado f a g o v e g e t a t i v o, o sea, un fago no infectivo en la célula huésped, pero activo y en camino de transformarse en fago maduro (Visconti, 66 a); parece ser, y sobre ello hemos de insistir más adelante, que en una población formada de fago vegetativo existe una tendencia hacia el equilibrio genético. Por otra parte, el denominado período de latencia varía de un germen a otro, pero en mucho menor grado que el volumen de ruptura, y la medida, bajo específicas condiciones, a 37°, cultivo en caldo y con gérmenes en su fase de rápida división del crecimiento del virus en el período latente, ha demostrado ser una característica de los virus que pueden tener valor taxonómico. Para la serie de fagos T, el T2, T4 y T6, el período de latencia es de 21' a 25'; para el T1, T3 y T7, de 13,, y para el T5, de 40'. Un muy sorprendente aspecto acerca del mínimo del período latente es que es el mismo en caso de infecciones múltiples que en una única infección (Delbruck y Luria, 54). Un germen infectado con 10 partículas fago no parece presentar ninguna diferencia en este respecto que el infectado con una sola partícula. Pero si el medio en que crece es variado, el período de latencia cambia, si bien escasamente, aun en el caso en que el germen se desarrolle más lentamente en el nuevo medio. Así, por ejemplo, el período latente del T2 en caldo es de 21' y en este medio la bacteria se divide cada 19'. En un medio sintético glucosado, donde el germen se divide aproximadamente cada 40', el período latente del T2 sigue siendo de 21', mientras que el volumen de ruptura es más pequeño en un medio simple que en el caldo. Esto nos prueba que el período latente es determinado por factores internos, independiente de su proceso de asimilación. Por el contrario, un cambio en la temperatura cambia la marcha de todas las funciones bacterianas, y, entre ellas, la de su metabolismo; no es, pues, sorprendente encontrar que un cambio de temperatura afecte también al período de latencia. Esta influencia es escasa si la comparamos con la que ejerce sobre la multiplicación bacteriana en gérmenes no infectados (Ellis y Delbruck, 56). Cohen (67), estudiando los cambios químicos que se presentan en el T2 durante su período de latencia infectiva, encuentra que la síntesis de la proteína

se realiza inmediatamente después de la infección, la síntesis del DNA es dilatada por 7' a 10', la del RNA es detenida, mientras que en las bacterias no infectadas la síntesis del RNA excede al del DNA tres veces.

Doermann (68) y Anderson y Doermann (43) han medido el virus infectivo obtenido por ruptura de las bacterias infectadas con fago T2, T3 y T4. Encuentran que durante la primera mitad del período latente ningún aumento de virus puede ser recobrado. Durante la segunda mitad de dicho período el fago reaparece y aumenta en proporción lineal. En algunas formas no infectivas el fago se multiplica y se recombina durante el período latente en su primera mitad; este hipotético virus ha sido llamado por Herhey (69) virus vegetativo. La reaparición del virus infectante en la segunda mitad del período latente no sería el resultado de su multiplicación, sino por la conversión del denominado virus vegetativo en virus maduro. El virus maduro es evidentemente el duplicado del virus en reposo. Los trabajos que más adelante hemos de estudiar sobre lisis prematura representan un foco de atención sobre los modernos problemas de la transformación cualitativa intracelular del fago distinto del viejo problema de la multiplicación viral. Sin duda alguna que la evolución del proceso fago-bacteria en su período latente es muy complicada. Algunos estadios pueden ser reconocidos por la existencia de una situación anormal en que la evolución del sistema se detiene anticipadamente. Un fenómeno que contribuye, si bien indirectamente, a la comprensión de la normal evolución fago-bacteria es lo que Delbruck (70) ha denominado «lisis de fuera» (lysis from without) (LFW); ésta es provocada por una rápida absorción de un gran número de partículas fago activas o inactivas, 100 partículas por célula. El hecho de que esta lisis se presente sin desarrollo de fago es por lo que este fenómeno ha sido llamado lisis de fuera (LWF), en contraste con la lisis normal. Esta lisis es, en apariencia, una consecuencia de lesión masiva provocada en la superficie bacteriana; ningún fago activo es derramado y las células no sufren cambios citoquímicos específicos, que, como hemos de ver, muy a menudo están asociados con la integración bacteria-fago. El fenómeno es claramente independiente de la capacidad de absorción de la bacteria.

Recientemente la LWF ha sido observada en determinadas condiciones. Así, la infección de una bacteria, por escasas partículas de fago en presencia del cianuro, iodo acetato o dinitrofenol, da como resultado la LFW (trabajos de Cohen, 67), Doermann (70 a), Heagy (70 b). La falta de fuentes de C puede causar LFW. Esto sugiere que la LFW se presenta en

baja multiplicación cuando falta una conveniente fuente de energía. Bacterias fuertemente irradiadas con UV lisan prematuramente cuando son aisladamente infectados (trabajos de Anderson, 70 c). Esto también puede ser debido a una ruptura del suministro de energía normal por la irradiación de UV. Ahora bien, la rapidez con que se presenta la LFW (medida por la reducción en la turbidez bacteriana) aumenta con la multiplicación de la infección (Watson, 70 d). La LFW se presenta sin ruptura del núcleo bacteriano. Esto es una prueba de que la LFW es independiente de la multiplicación del fago. Por otra parte, el fago inactivado por los rayos X, pero no muerto, puede provocar LFW (Watson, 70 d), lo que indica que la LFW no es una consecuencia a la invasión del fago dentro de la bacteria. El nuevo fago no es visible con microscopio electrónico sobre la superficie bacteriana, no es accesible a la acción del suero antifago. El mecanismo de reproducción del fago se hace refractario a la acción del suero antifago a los pocos segundos de la absorción del fago. La directa observación del fago en el interior de la bacteria da resultados de difícil interpretación y de escaso valor; deben emplearse para ello métodos indirectos, y antes de entrar de lleno en el tema consideremos brevemente qué es lo que nosotros buscamos y qué es lo que pretendemos encontrar.

Una partícula virus infecta una célula y varios minutos más tarde cientos de partículas aparecen. ¿Cuál es la relación de la partícula inicial a la del final? La partícula inicial, ¿penetra en la bacteria como un todo o sólo en parte? ¿En qué forma la partícula inicial preside la formación y especificidad de las nuevas? La causa de la transformación, ¿es un precursor ya confeccionado o el virus se sintetiza utilizando para su constitución elementos no específicos? ¿Estos son suministrados por la bacteria, por el medio externo o por ambos? ¿Qué tipos de mecanismos actúan: el enzimático, el autocatalítico u otros? ¿De dónde procede la energía necesaria? Al desarrollarse las partículas fago y producir más material viral dentro de sus propios límites, ¿se dividen entonces en dos a más partículas? Hay también distintos grados de organización en que los elementos de formación todavía libres en la célula se van haciendo paulatinamente más semejantes a la partícula virus a través de una serie de fases de ascendente complejidad estructural y especificidad. Es claro que en estos problemas relacionados con la organización funcional del complexo virus-bacteria infectada poco puede enseñarnos acerca de ellos la analogía con otras situaciones, ya que en la organización funcional de la célu-

la, y en particular en lo referente al proceso de síntesis específica, queda todavía mucho campo donde la especulación es lo dominante.

A continuación hemos de revisar aquellos hechos que nos ponen en evidencia los distintos tipos de desarrollo intracelular del fago. Ello supone un proceso muy complicado, en que el fago, penetrando una parte específica de él mismo en la célula huésped, utiliza, al menos en parte, la maquinaria enzimática de la bacteria para obtener elementos de construcción sobre los cuales él imprime su propia especificidad viral. Mucho de este desenvolvimiento tiene lugar por etapas. La partícula infecciosa madura es formada únicamente como un producto final de la totalidad del proceso.

D) La lisis prematura.

La consecuencia de la multiplicación de la partícula fago no es revelada hasta que no se presenta la lisis celular, la cual no lo hace espontáneamente, en tanto que gran número de nuevas partículas sean formadas. Ahora bien, cabe una artificial y prematura ruptura de la célula infectada. Para ello son utilizados muy distintos métodos. Ruptura por vibraciones sónicas, utilizando para ello el fago T3, relativamente resistente a la inactivación sónica (trabajos de Anderson y colaboradores, 32); la denominada lisis de fuera (LFW); bacterias infectadas con el fago T4 son metabólicamente inhibidas con 5-metil-triftofano y provocada la lisis por medio de una alta concentración de T6. Lisis por adición de cianuro, que ejerce su acción en la última parte del período de latencia. Métodos de descompresión (Fraser, 71). Estos métodos revelan que el aumento de fago activo es obtenido de las bacterias infectadas en la segunda mitad del período latente; en la primera mitad hemos ya indicado que ningún fago activo es recuperado. Hay, pues, un eclipse del fago infectante, un fenómeno que probablemente se presenta en todas las infecciones por virus. El eclipse es indudable, y como hemos de ver, las primeras partículas vivas que aparecen después del eclipse no son las partículas infectantes; ellas son ya parte del nuevo virus. La proporción con que aparece el nuevo fago no representa, sin embargo, la proporción en que se sintetiza el fago, sino únicamente en la que las partículas del fago maduran, es decir, graduando el estado infeccioso.

Esto es observado, por ejemplo, por el efecto que la adición del colorante proflavina (diamino acridinium sulfato) ejerce sobre la bacteria infectada en el fago T2. Según trabajos de Foster (72), este colorante

conduce a la lisis de bacterias infectadas sin la liberación de fago infeccioso. La lisis no aparece si el colorante es añadido antes de la mitad del período latente. Si se examina el material liberado de estas bacterias utilizando el microscopio electrónico, se observará la presencia de partículas fago incompletas o «doughnuts» en número aproximadamente similar al de las partículas fago activas que podían haber sido producidas en ausencia de la droga (trabajos de Luria y colaboradores, 52). Los «donuts» no son encontrados en extractos hechos durante el tiempo inicial del período de latencia; ellos aparecen cerca de 3' antes de que las partículas fago maduren. Estos «donuts» no son absorbidos por las bacterias y aparecen redondos, de tamaño similar a la partícula fago madura. A menudo presentan una depresión central. Esta descripción se refiere a todas las partículas, igualmente a las que contienen tallo. Los «donuts» no contienen, o lo contienen muy escaso, ácido nucleico; ellos poseen una apreciable cantidad de S. Fijan, el complemento con el suero antifago, pero no se combinan con el anticuerpo neutralizante del fago. Los «donuts» producidos en proflavina son similares en morfología a las formas de fago inmaduro, que son vistas en bacterias rotas mecánicamente antes de que aparezcan partículas fago maduras. Levinthal y Fisher (73) comprobaron esto en un sistemático estudio de las partículas «donuts», que eran derramadas junto con partículas fago maduras de bacterias infectadas y rotas por descompresión bajo el óxido nitroso. El contaje de «donuts» y partículas con tallo de bacterias rotas en diferentes períodos de tiempo revelan un aumento de «donuts» que aumentan más rápidamente que las maduras, pero nunca exceden de 30 a 40 por bacteria, pero pronto la partícula con cola le sobrepasa en número. Esto sugiere una transformación de la partícula incompleta o «donut» en partícula con cola. Hemos de señalar que en presencia de la proflavina esta transformación no tiene lugar. Así, pues, los «donuts» parecen ser el elemento organizado precursor del fago, es decir, un fago inmaduro. No son, pues, artefactos debidos al tratamiento por la proflavina. Parece lógico suponer que esta droga detiene la producción del fago en un período en el cual los «donuts» han sido formados, pero que todavía no se han transformado en partículas maduras. Esto está de acuerdo con la conclusión alcanzada por Flaster (72) de que la proflavina previene uno de los períodos terminales de la producción del fago activo. Hemos de ver cómo una partícula fágica no se multiplica más que en la bacteria en que ella ha sido producida. La capacidad para infectar un nuevo

germen es aparentemente adquirida por transformación de la partícula, que detiene su reproducción dentro de la célula que infectaron. La proporción en que aparece el fago activo probablemente representa la proporción en que tiene lugar la maduración final.

¿Pero cuál es el lugar de los «donuts» en síntesis del fago? Ellos contienen una gran proporción de azufre del fago y algún fósforo, el os portan algunos de los antígenos del fago. Estas propiedades relacionan ios «donuts» con los «ghosts» o envolturas del fago, y esta relación la confirma el microscopio electrónico, que demuestra una gran semejanza entre los «donuts» y la cabeza vacía del fago. Los «donuts» no representan la envoltura en su totalidad, ya que ellas contienen todo el S. del fago, mientras que los «donuts» lo contienen en apreciable menor cantidad. Al «donut» le falta el antígeno que se combina con el anticuerpo neutralizante. Este antígeno está presente en la piel aislada del fago y se puede hacer evidente cuando la partícula adquiere un apéndice. Maaloe y Seymonds (74) han obtenido partículas incompletas en cultivos lisados prematuramente con cianuro, empleando bacterias infectadas por fago T4 tatuado con S^{35}. Ellos purifican la fracción conteniendo el fago por centrifugación diferencial, y encuentran que el material preparado de esta forma contiene un exceso de S. (proteína). Este exceso es absorbible por la bacteria sensitiva y precipitable por el suero antifago. Estas partículas son más pequeñas y menos densas que las infectivas y su contenido en S. corresponde a 25 ó 50 partículas por célula. A estas partículas le faltaría ácido nucleico (DNA) e infectividad. Maaloe y Symonds comprueban que si el S^{35} es añadido al cultivo 12' a 16' después de la infección, y el cultivo era llevado a lisar espontáneamente, el producto contenía partículas no infectivas tatuadas con el S^{35}. Se comprueba que 25 a 50 partículas no infectivas por célula se encontraban durante la última parte del período de latencia, lo cual representa una población cuyos individuos son continuamente reemplazados unos por otros. Actualmente dos alternativas tenemos en relación al origen de las partículas no infectivas. Ellas pueden ser partículas de fago inmaduras que aún no han recibido la totalidad de su DNA, o pueden derivar, como consecuencia de manipulaciones, de partículas que poseían membrana y DNA, probablemente inmaduras. La primera alternativa parece implicar funciones importantes del fago intracelular, a cuyo punto de vista se opone. En relación a la posibilidad de que las partículas incompletas sean artefactos, conviene recordar que el DNA del fago intracelular es fácilmente hecho sensi-

tivo a la desoxiribonucleasa y también los lisados por cianuros de cultivos infectados contienen algo que depolimeriza el DNA añadido en forma soluble. Estos trabajos conducen a la conclusión de que los elementos fago prematuros que pueden ser aislados de bacterias infectadas contienen S (proteína), pero poco o ningún Ph. (a. nucleico). Esto es sorprendente, ya que, como se sabe, el S. de la proteína de la partícula fago no juega ningún papel en la reproducción inicial de él y ni siquiera penetra en la célula huésped (trabajos de Hershey y Chase, 35).

Ahora bien, las partículas incompletas no son en el fago activo el único material fago específico obtenido del interior de la bacteria infectada. Un factor ultrafiltrable serológicamente específico, que se combina con el anticuerpo neutralizante del fago, puede ser obtenido por ruptura de bacterias infectadas durante su período de eclipse (trabajos de Luria y colaboradores, 52). Este factor aumenta paralelamente con la actividad del fago. Pequeñas porciones de él son liberadas en el fago maduro, en una lisis normal. El factor ultrafiltrable probablemente representa material propio del fago y contiene el antígeno responsable del anticuerpo neutralizante. El experimento de la lisis prematura nos dice que en la subsiguiente infección la partícula infectante se encuentra tan alterada como la no infecciosa. Después de un período de eclipse, casi a lo último del período de latencia, nuevos elementos fago específicos de variada complexidad pueden ser descubiertos en número creciente hasta que las partículas maduras son finalmente formadas.

E) El proceso metabólico del fago.

a) El destino intracelular de la proteína del fago.—Cuando una bacteria infectada con un fago isotópicamente marcado y posteriormente se aísla la progenie del fago por centrifugación, nos encontramos con fracciones variables de la célula madre marcada en su descendencia. Los primeros experimentos en este aspecto fueron llevados a cabo por Putmann y Kozloff (75), que utilizaron el P^{32}. Comprueban que el 30 por 100 de la radioactividad era transferida del fago infectante a su progenie durante un solo ciclo intracelular. Es verdad que la proteína de la membrana no juega ningún papel en el crecimiento intracelular del desarrollo del virus; el pase de una proteína marcada con S^{35} es pequeño, mientras que el del a. nucleico marcado con P^{32} es mucho mayor. Hershey y colaboradores (37) no encuentran diferencia alguna en la transferencia de la proteína y a. nucleico marcados. Mas recientemente, utilizando razas coli B infecta-

das por el fago T2 con empleo de isótopos, Harshey y Chase (35) han investigado la desaparición de las unidades del fago infectante y explicado el significado del período de eclipse. Ellos encuentran que la totalidad o mayoría del S^{35}, original que aparece en la progenie de fagos aislados, está constituído de restos de membrana de la célula madre. Este material no podía ser separado de la descendencia por centrifugación funcional, sino precipitados por suero antifago, el cual era identificado como bacterias infectadas con fago tatuado con S^{35}, que era artificialmente lisado antes de que la natural madurez de la progenia apareciera, suministrando un material marcado con S^{35}, indéntico en cantidad al que contamina la progenie originada. Secundariamente bacterias infectadas con fagos tatuados con S^{35}, y entonces agitadas violentamente en un agitador Waring, libera dentro del flúido pequeñas partículas marcadas, las cuales pueden ser sedimentadas o precipitadas por suero antifago. Ellas contienen S y escaso o nada de Ph y forman la membrana más o menos vacía e intacta del fago, portando su antígeno principal y una fracción de a. nucleico altamente polimerizado (trabajo de Herriot, 40). Por otra parte, la bacteria de la cual ha sido alejada la membrana de fago marcado produce un fago normal y esta descendencia puede ser fácilmente obtenida completamente libre de S^{35} original. Estas observaciones nos explican al mismo tiempo el eclipse de partículas infectivas recuperables subsiguiente a la infección y la incapacidad del suero antifago a detener la reproducción de él. El experimento confirma que la infección del coli por el fago T2 consiste en la penetración de la mayor parte del a. nucleico de fago en el interior de la célula, así como la escasez en que penetra la proteína de membrana. Muy recientemente, French (75 a) infecta un coli con T2 marcado con P^{32}, demostrando que el 30 a 50 por 100 del a. nucleico es incorporado a la progenie. El autor utiliza lisina en un medio lactato sódico con carbonxilo marcado o con C^{14}. El incorporado C^{14} era distribuído igualmente en la proteína y el a. nucleico del fago producido en el medio lactato, pero incorporado casi totalmente como lisina en la proteína del fago producido en el segundo medio. En un lisado obtenido de la proteína del fago marcado, el 83 por 100 de lo marcado se encuentra unido a los restos celulares. Resumiendo: esta serie de trabajos demuestra que es únicamente el amino ácido conteniendo S de la membrana del fago el que deja de penetrar en el interior de su progenie. La partícula fago completa deja de existir como unidad organizada, y la piel del fago, portando la mayoría o totalidad del antígeno fago, queda en el

exterior y no toma parte en el proceso de reproducción; es decir, cuando la partícula fago es específicamente absorbida por una bacteria susceptible, los componentes a. nucléico y proteína se engarzan separadamente; la proteína ancla sobre la superficie de la bacteria de estructura complementaria, mientras que el a. nucléico es liberado y penetra en la célula.

b) El destino intracelular del ácido nucleico del fago.—Putman y Evans (75 b) han medido la cantidad de P^{32} que aparece en la total progenie viral, después de infectar la bacteria con fago marcado. Ellos encuentran cerca de un tercio del fósforo original en la decadencia y parte de él queda en forma no sedimentable en el medio de cultivo. Ellos sugieren la idea de que el virus estaría constituído de dos clases de estructuras conteniendo fósforo, una que se conserva durante la multiplicación y otra no; Maaloe y Watson (76) utilizan fagos tatuados con P^{32} durante dos ciclos de crecimiento, infectando bacterias no marcadas. Ellos comprueban que un tercio del P^{32}, presente en el primer ciclo de su descendencia, se conservaba en su segundo ciclo de crecimiento. Observan que el fósforo penetra en el interior de la progenie viral y se conserva en la totalidad de él, no en partes especiales. Estos investigadores consideran que el mecanismo de transferencia del a. nucléico marcado de la célula madre a su progenie queda sin aclarar. Había que averiguar si las partículas fago son conservadas durante su multiplicación en forma de a. nucleico fago o como pequeños fragmentos y si son ciertamente conservadas en forma de fago vegetativo. Kozloff (77), de sus investigaciones, obtiene la conclusión de que la transferencia tiene lugar a través de una ruta metabólica indirecta. Este autor establece los siguientes cuatro puntos: 1.º, el fósforo y nitrógeno extracelular de origen viral aparece durante el período latente del crecimiento del virus. Técnicamente éste es de dudosa significación, ya que no conocemos con certidumbre qué cantidad de material extracelular es verdaderamente de origen viral y qué proporción de este origen procede de la bacteria. Por otra parte, la inyección de a. nucléico del virus dentro de la célula no es perfectamente eficaz, alrededor del 20 por 100 pasa al medio de cultivo; 2.º, el material derivado de la célula madre y que aboca a la formación del a. nucleico de su descendencia contiene un exceso de fósforo sobre el nitrógeno en la totalidad del a. nucleico viral. Kozloff (77), utilizando el método del doble tatuaje ($P^{35}N^{25}$), comprueba que determinada cantidad de P es transferido como fragmentos más pequeños que el de los polinucleótidos y que, desde luego, hay una parte especial de a. nucleico que es transferida; 3.º, la transferencia del N del

fago inactivado por la luz ultravioleta al a. nucleico de la progenie del fago activo en bacterias infectadas con fagos mezclados es tan eficaz como la correspondiente transferencia de la célula madre a su descendencia. Lo fundamental de este experimento es que los marcadores genéticos del fago irradiado no aparecen en la progenie. Se observa que el ácido nucleico viral no participa específicamente en el proceso de reproducción; el notable hecho de que su empleo es ni más ni menos eficaz que el uso del material maternal sugiere a primera vista la existencia de un común mecanismo de transferencia. El valor de esta coincidencia desaparece, sin embargo, cuando se tienen en cuenta algunos factores que verosímilmente limitan la eficacia. Si la transferencia es directa o indirecta, su eficacia está sujeta, por lo menos, a cinco factores (Hershey, 69), que son: la eficacia de la inyección de ácido nucleico viral dentro de la célula; la cantidad de elemento marcado que se derrama de la célula infectada antes de la lisis; la eficacia de conservación de elementos asimilados y marcados por el fago vegetativo; la proporción de células infectadas que producen escasa o nula progenie; la eficacia de conversión de fago vegetativo a maduro, y 4.º, progenie de un fago que procede de gérmenes infectados con el fago T7 no marcado; si 8' más tarde es superinfectado con fago T6 marcado con P^{32}, el 5 por 100 del total P^{32} está contenido en partículas sedimentables (posiblemente T7), ya que no pueden ser consideradas como partículas T6. Por lo que parece resultar evidente que el ácido nucleico extraño puede ser utilizado para la síntesis del virus. Las mismas conclusiones son derivadas de los trabajos de Weed y Cohen (78) al poner de manifiesto que el DNA bacteriano sirve como un substrato de la más alta eficacia para el crecimiento del virus. El hecho fundamental obtenido de estos trabajos es que el ácido nucleico marcado de la célula madre es transferido a la progenie con alta eficacia.

c) El origen de los componentes de la partícula fago en la bacteria infectada.—De la cantidad del nuevo fago producido en una bacteria, una décima parte o más procede de la masa bacteriana. ¿Cuál es el origen del material que ha de formar el nuevo fago? ¿Cómo él es sintetizado? ¿De dónde viene la energía para dicha síntesis? El fago parece contener únicamente proteína y DNA. Estas substancias pueden derivar o bien de constituyentes del protoplasma bacteriano presentes en la célula en el momento de su infección o ellos podían ser asimilados del medio después de la infección. Ahora bien, sin el empleo de isótopos sería muy difícil, si no imposible, el determinar el origen de los variados componentes de

la partícula fago. Los trabajos verdaderamente brillantes de Cohen (79) utilizando isótopos demuestran el doble origen, bacteriano y medio, de los componentes suministrados al fago para su síntesis.

Si hacemos crecer bacterias en un medio conteniendo compuestos de P. tatuado con el isótopo radioactivo P^{32} se comprueba que todos los componentes fosforilados de la bacteria contienen algún P. que se deja reconocer por su emisión radioactiva de rayos beta. Estas bacterias son lavadas y resuspendidas en medio no radioactivo, infectadas con fago y llevadas a lisar. El nuevo fago es purificado y su radioactividad por la proporción de P^{32} que contiene medida. El 25 por 100 del P. fago es derivado del material presente en la bacteria en el momento de la infección y el 75 por 100 procede del P. sustraído al medio después de la infección. La proporción P^{32}/P. en el nuevo fago será un cuarto de la proporción en el medio marcado en que la bacteria se ha desarrollado. Así, el contenido en P^{32} del nuevo fago puede ser una cantidad del P. que ha sido transferida de la célula bacteriana al fago. Sin duda, la contribución del medio no representa nada en relación a la contribución directa, si bien indirectamente contribuyen, ya que este material ha sido tomado por la célula después de la infección. Putmann y Kozloff (75) y Putmann, Kozloff y Evans (75 b) llevan a cabo un similar experimento con el T6 empleando bacterias diferencialmente marcadas en su fracción fosfato, sugiriendo que el DNA bacteriano era el principal origen del DNA de la progenie viral.

Ahora bien, Cohen (81) observa que el metabolismo de los fosfolipidos y del RNA parece cesar, ya que estos constituyentes de la célula huésped no son incorporados posteriormente al fago después de la infección. Mas recientemente, Koch (80) ha confirmado esto comprobando que la adenina y guanina del RNA de la célula infectada están como el P., inertes después de la infección. Pero el contenido en DNA aumenta y posiblemente que la cantidad total de DNA formado en el sistema infectado es mayor que la que eventualmente se encuentra en la progenie viral. En cualquier caso, con T6 u otro colifago con apéndice el contenido en DNA en la bacteria es insuficiente para las necesidades requeridas por los virus, y mucha cantidad de este elemento sintetizado es obtenido de los componentes del medio. Esto implica, sin duda, un aumento de síntesis de la desosipentosa, y Cohen ha observado que esto es afectado por una alteración en el metabolismo normal carbohidratado de la célula bacteriana. En un crecimiento normal de la célula, la ribosa es formada por

directa oxidación de la glucosa, mientras que la desosipentosa es derivada de la condensación del acetil aldehido con triosa-fosfato, originado de la glucosa por mecanismo anaeróbico. La triosa puede también ser formada por la oxidación de la ribosa-fosfato. En las bacterias infectadas con fago T6, el camino oxidativo es en apariencia reducido, y más grandes cantidades del triosa-fosfatos son convertidas en la necesaria desosipentosa siguiendo un mecanismo anaeróbico. Es indudable que otros cambios metabólicos se presentan, pero éstos nos son todavía desconocidos. La proteína es sintetizada más tempranamente que el DNA; antes de comprobarse aumento de este elemento, la síntesis de la proteína ha tenido lugar. El espectro enzimático de la célula infectada cambia. Kozloff (77) comprueba que la desoxiribonucleasa de la bacteria infecta aumenta y demuestra la existencia en la bacteria normal de un inhibidor específico frente a la DNAasa de la célula infectada.

Sin embargo, estos trabajos no son definitivos y han sido precisos otros más decisivos utilizando N^{15} y bacterias específicamente marcadas con purinas y pirimidinas conteniendo C^{14} radioactivo, así como P^{32} para establecer el hecho de que el volumen mayor del DNA de la progenie viral procede del DNA de la bacteria huésped, aunque pequeñas cantidades de la nucleoproteína del virus son derivadas también de los componentes ácido soluble y proteínas de la célula bacteriana. Siddigi y colaboradores (82) han presentado la evidencia de que la proteína bacteriana no es en forma alguna participante de importancia en la síntesis del DNA viral y llegan a la conclusión que en el caso del fago T6r (y posiblemente para otros fagos de este grupo) la mayor cantidad del DNA viral deriva del DNA huésped o sintetizado de constituyentes sencillos del medio. Kock (80) utiliza en sus trabajos una célula bacteriana doblemente tatuada. Cultiva el Ech. coli en un medio conteniendo purina radioactiva y encuentra que éstos son incorporados directa y exclusivamente en las purinas de la fracción de ácido nucleico. Es entonces posible por cultivo de gérmenes en un medio conteniendo N^{15} H_4, C1 y grandes cantidades de adenina libre de radioactividad (N^{15}) obtener bacterias en las cuales todas las purinas han sido derivadas de la adenina del medio. En estas circunstancias menos del 1 y 2 por 100, respectivamente, de átomos de N en el anillo de la adenina y la guanina han derivado del N^{15}, H_4 y C1 de el medio. Por otro lado, el grupo amino ha tomado N^{15}, y aproximadamente del 60 por 100 del grupo amino de la guanina y 6 por 100 del grupo amino de la adenina han sido derivados del N^{15} del medio. En

relación al carbón radioactivo, éste es presente exclusivamente en el anillo C de las dos purinas. Cuando estas bacterias doblemente marcadas son infectadas con T6rt, en el fago progenie, previamente purificado, se comprueba que la distribución del isótopo es la siguiente: en términos de guanina y adenina transferidas, el 34,6 por 100 y 23,5 por 100, respectivamente, de las purinas del fago se han originado de la bacteria huésped y resulta que considerables cantidades de estas substancias deben ser sintetizadas de materiales no marcados del medio. Por otra parte, parece ser que las purinas son transferidas intactas del huésped al fago, ya que los grupos aminos son transferidos sin cambiar; así pudo comprobarse cómo el N^{15} del grupo amino, tanto de la adenina; como de la guanina, eran diluídos por nuevas síntesis durante el curso del desarrollo del fago en la misma amplitud que el C^{14} del anillo. Si tenemos en cuenta que puede excluírse la participación del RNA en el proceso y que la cantidad del ácido soluble adenina (esencialmente no existe ácido soluble guanina en las bacterias) puede suministrar solamente 20 a 30 por 100 de la contribución del huésped, resulta que el compuesto ácido soluble del huésped no contribuye en forma significativa a la constitución del ácido nucleico del fago. Parece ser, pues, clara, que las purinas del huésped son utilizadas intactas con respecto al anillo del carbono marcado de los grupos aminos tatuados para la síntesis del DNA.

Weed y Cohen (78) han demostrado una directa transferencia de las pirimidinas del ácido nucleico viral por cultivo bacteriano en presencia de un precursor de la pirimidina. Bajo esta circunstancia se obtiene un huésped bacteriano en que las pirimidinas del RNA, que son uracil y citosina, y las del DNA, timina y citosina, eran exclusivamente marcadas. El fago que se desarrolla en tales células contiene grandes cantidades de pirimidinas del huésped (timina y citosina), mientras que las purinas y carbohidratos del fago estaban libres de radioactividad. Está, pues, claro que las pirimidinas del huésped son transferidas a la progenie viral. Estos autores utilizaron dos tipos de fago, el T6r+ (cepa de lisis inhibida) y T6r (cepa de lisis rápida). La progenie analizada fué la resultante de una lisis normal y la obtenida en una lisis prematura por cianuro. Maaloe y Stent (83) han estudiado la kinética de la asimilación del P. y S. por bacterias infectadas en forma distinta. Sus resultados podemos sintetizarlos como sigue: cuando el crecimiento del fago en una célula infectada es detenido por el cianuro y la producción de virus maduros es aislada, se encuentra que contienen átomos de P. más precoz-

mente, alrededor de unos 14' antes. Su azufre lo era únicamente 7' más temprano. De estos datos, los investigadores deducen que la síntesis de la proteína tiene lugar en el período latente, en su final, y dejan abierta la posibilidad de que la formación del DNA viral preceda a la síntesis de la proteína. Los trabajos enumerados parecen establecer el hecho de que la transferencia del DNA de la bacteria al virus es una característica del sistema bacteriófago.

Ahora bien, ya que el DNA del huésped y el virus difieren en su composición (el DNA de las bacterias contiene ligeramente más guanina que adenina, mientras que el DNA del virus contiene mucha más adenina que guanina), la transferencia debe suponer una fundamental alteración y reajuste. Estas diferencias en composición podían resultar del paso de grandes unidades polinucleótidas del ácido nucleico bacteriano enlazadas con la síntesis en variables cantidades de uno u otro componente del ácido nucleico viral, según los materiales del medio. Si es posible el paso directo del ácido nucleico intacto de la bacteria al virus, se podía esperar que el tanto por 100 de N. del ácido nucleico del virus derivado del huésped, al tanto por 100 del P. del ácido nucleico del virus derivado del huésped podía ser la unidad. En experimentos en que la bacteria era marcada con N. y Ph. isótopos, la proporción observada era de 1.3 a 1.4. Evidentemente alguna alteración del ácido nucleico en la bacteria existe. La observación de que la adición de purinas libres al medio no ejerce efecto alguno en la transferencia, aunque la bacteria utilice estas purinas, sugiere que algo más complejo que las simples bases es transferido. Los trabajos de Koch, Putmann y Evans (84) conducen a la misma conclusión; ellos marcan con isótopos únicamente la adenina y guanina del huésped. Si se compara la proporción de la actividad isotópica de la guanina a la de la adenina del huésped con la misma proporción del virus, se comprueba que para la síntesis del fago es utilizada relativamente más guanina que adenina del huésped. Esta asociación en la transferencia de adenina y guanina del virus podría favorecer la hipótesis según la cual el DNA bacteriano es químicamente degradado a oligonucleótido o mononucleótido antes de su utilización para la síntesis del fago. El Dr. Kock ha calculado el porcentaje de la purina transferida y encuentra aproximadamente que el 100 por 100 de la adenina del DNA bacteriano y el 75 por 100 de su guanina son utilizados para la síntesis del fago. Por último, Labaw (85) observa que la contribución del huésped en fósforo a la progenie viral es la misma para todos los colifagos estudiados.

El descubrimiento del hidrosilmetil-cytosina en fago del grupo T2 por Wyatt y Cohen (39) han hecho posible seguir la síntesis del DNA del fago en la bacteria infectada. Hershey, Dixon y Chase (86) han llevado recientemente a cabo una serie de experimentos verdaderamente interesantes. Cuando el DNA específico del fago y el DNA específico de la bacteria huésped son medidos a intervalos en cultivos infectados, el DNA del fago comienza a aumentar después de la infección, mientras que el DNA de la bacteria decrece. Cuando aparece el fago maduro, el DNA del fago continúa creciendo y está siempre en exceso en relación con el aumento observado en las partículas infecciosas. El exceso del DNA fago corresponde a la cantidad precisa para el suministro de 40-80 partículas fago. Si este DNA del fago está en la forma de núcleo fago inmaduro, podemos establecer que durante el desarrollo del fago T2 en una bacteria hay una población constituída de 40-80 partículas inmaduras. Esta población es posiblemente repoblada por multiplicación y vaciada por maduración y su tamaño queda más o menos constante.

Resumiendo: de el fósforo del fago infectante cerca del 30 a 35 por 100 aparece en el nuevo fago. El nuevo fago transfiere en la misma proporción su fósforo a la siguiente generación de fagos. Con una producción de 100 partículas por bacteria, la contribución de una partícula fago infectante no es más del 1/200 de el DNA del nuevo fago. Ningún azufre es transferible de la célula madre al fago progenie. Igualmente ningún significativo aumento de amino-ácido es aparentemente transferido del fago original al fago progenie. Cerca del 20-35 por 100 del N y Ph. en el DNA del nuevo fago es de contribución bacteriana, el resto (65-80 por 100) procede del medio, esto para los fagos T2, T4, T5 y T6; para el T3 y T7, cerca del 75 por 100 de Ph. viene del huésped, y para el T1, cerca del 55 por 100..

Las purinas y pirimidas presentes en el DNA bacteriano contribuyen con un 15 por 100 al correspondiente compuesto del nuevo fago. Cerca del 80-90 por 100 del N. de la proteína del fago procede del medio. El 10-20 por 100 del huésped y de fracciones nitrogenadas ado solubles y de bajo peso molecular presentes en la célula en el momento de la infección. El N. proteína del fago deriva de substratos en relativamente rápido equilibrio con el medio, mientras que el N. y Ph. del DNA fago son derivados de la mezcla de un conjunto de compuestos químicos (bases purina y pirimida, nucleótidos, polinucleótido). Esta mezcla se alimenta en parte por persistente protoplasma bacteriano o también por nuevas síntesis de

el medio. Las partículas fago producidas al principio contienen proporcionalmente una más alta cantidad de Ph. y pirimidinas de origen bacteriano que las partículas de fago elaboradas en los últimos momentos, a cuya formación contribuyen en mayor proporción los elementos de medio.

Si analizamos todo lo expuesto en relación con el ciclo de desarrollo del fago, es factible diseñar un breve sumario sobre las probables fases existentes en el desarrollo del fago, y en especial para algunos del grupo T (T2). Así, pues, tenemos que las partículas del virus son absorbidas y penetran en el interior de la célula huésped. La célula infectada rápidamente reorganiza su aparato nuclear y su metabolismo, aun cuando muchas de sus actividades enzimáticas no son afectadas. Estos enzimas, derivados en su mayor parte de la célula huésped, continúan operando sobre las fuentes de N. Ph. y C. Sin embargo, ellos no edifican estructuras bacterianas, sino que convierten los más pequeños bloques de metabolitos en substancias poliméricas DNA y proteínas que contienen las nuevas especificidades del virus. La maduración probablemente consiste en la adquisición de su citoplasma, en oposición al núcleoplasma o núcleo genético. El citoplasma incluye la cubierta (proteína), el tallo y probablemente otras partes de la partícula madura. Por otra parte, en tanto que se detiene bruscamente, al iniciarse la infección bacteriana, la síntesis del RNA, las proteínas son sintetizadas, la acumulación de DNA a los 7' a 10' completa la formación de una unidad genética, que no es una partícula de virus completa, posiblemente le falta la capacidad para su absorción o penetración, o alguna otra anticipada etapa. La partícula completa queda formada después de que la formación de la partícula genética queda terminada y son liberadas al sufrir lisis la célula. Podemos aún más sintetizar los efectos de la infección con un fago virulento. Por ejemplo, como resultado de la penetración del fago T2 en un coli es observado: bloqueo del crecimiento bacteriano; bloqueo de la síntesis del RNA; bloqueo de la síntesis de enzimas respiratorios; inhabilidad a sintetizar enzimas de adaptación; bloqueo en la síntesis del DNA bacteriano; ausencia del aumento total del DNA durante la primera parte del período de latencia, seguido de aumento rápido del DNA del fago.

d) Metabolismo del fago y actividad enzimática.—En el curso de esta revisión hemos desarrollado la tesis de cómo la célula infectada lleva a cabo los procesos metabólicos distintos que conducen a la formación del material específico de la partícula fago. Ahora bien, ¿en qué proporción contribuye en esta síntesis la maquinaria bacteriana y cuál

es la de la maquinaria del fago? ¿Cómo estas síntesis están dirigidas? Parece ser que en bacterias infectadas por el fago T muchos enzimas bacterianos que están presentes en el momento de la infección continúan en actividad y proveen de energía y sintetizan elementos no específicos, pero que son utilizados en la formación del protoplasma del fago más que en la del protoplasma bacteriano. En este caso especial, en la palabra protoplasma incluímos todo lo que es química y funcionalmente específico en la célula (enzimas, antígeno, material genético), aun cuando la base química de su especificidad se nos escapa.

Como es sabido, la cesación del desarrollo de la célula infectada supone un profundo disturbio en el metabolismo de la bacteria huésped. Si el consumo de O de un cultivo normal de coli es amparado en presencia o ausencia de virus T2 o T4 en un medio sintético conteniendo lactosa, se observa que en el cultivo infectado la respiración bacteriana continúa con la misma intensidad que en el momento inicial de la infección. Es decir, visto el consumo de O_2 como el R. Q. es el mismo que en un cultivo no infectado (trabajos de Cohen, 67). Puede ser concluído que mientras los enzimas respiratorios están sin afectar por la infección, la síntesis de los factores bacterianos (posiblemente estos enzimas), esencial para la incrementada oxidación, es totalmente inhibida. En confirmación con esta inhibición del aumento enzimático por la infección, Monod y Wollmann (87) han demostrado que razas de E. coli infectados por virus B_2 son incapaces de sintetizar enzimas adaptativos para la utilización de la lactosa. Por ello, bacterias no adaptadas a la lactosa son incapaces de sintetizar virus en un medio cuya única fuente de C. es la lactosa. Por el contrario, células en las cuales los enzimas de adaptación eran sintetizados antes de la infección mantienen su respiración en presencia de este substrato después de la infección y son capaces de mantener la reproducción del virus en medios cuya única fuente de C. sea la lactosa. Resulta, pues, que la energía suministrada, la cual es determinada por el consumo de O y el R. Q., es la misma en la célula infectada, y en la cual funciona todo el mecanismo que supone la síntesis del fago, que en la célula no infectada, esta energía, para dicha síntesis, es primariamente un producto de la actividad enzimática del huésped desviada de su uso normal en la síntesis bacteriana. Casi todos, si no la totalidad de los productos de la célula infectada, son componentes del fago; por ello la energía para la síntesis del fago es el elemento mayor de la energía total suministrada en la totalidad de la respiración.

Ahora bien, el problema a resolver es si la síntesis de la proteína y del DNA del fago es portada por el germen huésped o por el virus, o por ambos. El aumento de N. y Ph. en el C. coli infectado son del mismo orden que en las bacterias no infectadas. Podía, pues, suponerse que esta síntesis iría acompañada por una cantidad similar de equipo enzimático que el del organismo. Ya que una partícula T2 es de un peso del orden de 10^{-15} gr. y una bacteria pesa alrededor de 10^{-12} gr. parece razonable concluir que, a menos que el fago contenga enzimas 1.000 veces más eficaces que el promedio de los de la bacteria, el peso del fago es inadecuado para producir la cantidad de síntesis requerida en la elaboración del fago. Parece, pues, que la mayor parte del virus en su estructura polimérica de ácido nucleico y proteína es sintetizado por enzimas bacterianos. Sin embargo, recordemos cómo medios de cultivo muy apropiados para el desarrollo de bacterias no son buenos para la multiplicación del fago. Ha sido observado que el Ca. es esencial para la multiplicación de fagos sobre determinados gérmenes, y, sin embargo, no es indispensable para el desarrollo del huésped. Aunque una interpretación podía ser la posible existencia de un enzima fago activado por el Ca., esto no puede ser así, ya que el Ca. puede ser un esencial material estructural para estos fagos. Recientemente, Pardel y Williams (88), utilizando el E. coli infectado con el T2r, T2r+ y T3, comprueban después de la infección un aumento de la actividad de la desosiribonucleasa, dentro de los 10′ a 15′, del 70, 100 y 30 por 100, respectivamente. Esto puede reflejar un incremento en la cantidad de la enzima o, como asegura Kozloff (8), una disminución en una inhibición de la enzima. La DNAasa podía jugar un papel en el degradamiento del DNA de la bacteria y, probablemente, en la síntesis del DNA del fago. Es también posible que la DNAasa originalmente presente en la bacteria sea diferente de la DNAasa que aparece después de la infección. La primera enzima intervendría en la formación del DNA bacteriano y la segunda en la del DNA viral. De esta sugestión no hay prueba demostrativa alguna, pero Pardee y Williams (88) hacen notar que la proporción de la síntesis del DNA en células intactas y la tasa de polimerización del DNA in vitro son numéricamente muy similares (alrededor de 1 milig. DNA por minuto, por miligr. de proteína).

Pero, por otra parte, los trabajos de Grahan (90) han demostrado que el E. coli contiene un enzima que puede rápidamente degradar el DNA del fago T2; es probable, en este caso particular, que esta degradación

sea causada por una desosiribonucleasa presente en células normales, pero activada por las primeras partículas infectantes. De todo lo dicho parece deducirse que la partícula fago asume la dirección de la síntesis específica, conduce el mecanismo metabólico bacteriano a producir los elementos necesarios del complejo fago. El mecanismo por el cual se diseña el nuevo protoplasma lo desconocemos. La bacteria infectada por un fago puede, sin embargo, sintetizar determinadas substancias que no están presentes en las células no infectadas. Por ejemplo, el DNA de los fagos T2, T4, T6 contiene en lugar de citosina el 5-hidroxilmetil-citosina (trabajos de Wiatt y Cohen, 38). Este cuerpo, como ya sabemos, no está presente ni en la bacteria huésped ni en ningún otro material biológico. La síntesis del DNA del fago debe vincular una síntesis de esta pirimidina. Así el fago infectivo no solamente reajusta el conjunto de elementos de construcción producidos por los enzimas bacterianos, sino que determina la síntesis de compuestos específicos. Esta determinación puede o no requerir la intervención de enzimas introducidos por el fago. De esta sugestiva posibilidad, por el momento no hay comprobación experimental; pero claramente apunta a determinadas direcciones en la investigación que pueden demostrar o no esta hipótesis.

e) Requerimientos nutritivos para el crecimiento del fago.—Es de sumo interés determinar el valor de determinados compuestos en la síntesis del virus, así como el de otros productos derivados de su metabolismo. Por ejemplo, conocemos que la raza coli B/1, menos triptofano, requiere este aminoácido para la multiplicación del fago T2, así como para el desarrollo bacteriano. Aun cuando el triptofano puede, en algunos sistemas, ser convertido en ácido nicotínico, esta deficiencia es experimentada, pero no observada en el E. coli B infectado por el T2 (trabajos de Fowler y Cohen, 91). No teniendo otros datos sobre el papel metabólico del triptofano que ser uno de los metabólicos indispensables para la síntesis de la proteína, y conociendo el dato de que una célula infectada por T2 sintetiza solamente la proteína viral, se puede concluir que el triptofano es esencial para la síntesis de la proteína T2.

Ahora bien, si nosotros transferimos una raza de E. coli B de un medio a base de caldo común a un medio F, que contiene lactato amónico y sales inorgánicas, y es infectado por un fago T2, Fowler y Cohen (91) comprueban una marcada prolongación del tiempo de latencia y una reducción en el denominado volumen de ruptura en contraste con lo que se observa en el caldo común. La bacteria se desarrolla en este medio F

en la proporción de un cuarto menos que en el caldo. Por otra parte, si eliminamos del medio F las fuentes de C. y N. no permite que un fago sea sintetizado. Los autores estudiaron curvas de crecimiento en organismos transferidos del caldo al medio F, al cual un determinado aminoácido era añadido; tal estímulo se reflejó en una disminución del período de latencia o en un aumento del volumen de ruptura, o en ambas cosas; los compuestos añadidos fueron: L-fenilalamina, L-ácido arpástico, L-prolina, L-lisina, L-valina, L-ácido glutámico. Ninguno de los factores nutritivos ensayados —más de 60— reproducían el período de latencia y volumen de ruptura observado cuando eran incubados en el caldo común. El efecto inhibitorio era observado en el sistema con L-lisina, L-seria y L-cysteína, cuando estos aminoácidos eran añadidos al medio mínimo. La inhibición producida por el L-leucina podía ser contrarrestada por la simultánea adición de valina, isoleucina o norrleucina. Se pudo comprobar que una mezcla de aminoácidos, purina y pirimidinas, añadida al medio F, restauraba casi completamente el período de latencia y el volumen de ruptura que era observado en el caldo. Estas observaciones condujeron a Fowler y Cohen (92), en un posterior trabajo, al empleo de otro grupo de métodos para el estudio de mezclas que afectaran a la síntesis del virus. Observaron que la eliminación de algún aminoácido, como el triptofano y la leucina del medio completo, solamente aumentaba ligeramente el período de latencia, pero reducía en forma clara el volumen de ruptura. En un trabajo similar, pero utilizando bacterias infectadas en forma múltiple y en estos medios, observaron que la iniciación de la síntesis del DNA se retardaba cuando estos metabolitos eran eliminados, pero el volumen de síntesis del DNA, una vez iniciada, era igual al del control. En estos experimentos se comprueba que el L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-metionina, L-triftofano, L-valina y adenina son compuestos que deben estar presentes en el medio para que la producción de virus alcance su máximo. Spizizen (93) ha obtenido similares resultados sobre la importancia de aminoácidos y otras substancias para el desarrollo de determinados fagos. En los medios utilizados, la única fuente de C. eran los compuestos añadidos al medio. Infecta un cultivo en caldo nutritivo y los transfiere a variados medios, en los cuales utiliza solución buffer con distintos aminoácidos y observa que el ácido glutámico es el compuesto que más eficazmente permite el desarrollo del fago.

Más recientemente, Cohen (67) utiliza el E. coli creciendo en caldo, el cual es transferido a un buffer fosfato conteniendo 10 α g de distintos

aminoácidos, con o sin fago T2. La bacteria era separada del medio en distintos intervalos y el medio era analizado utilizando papel cromatográfico unidimensional tratado con ninhyrdrina. Se utilizaron siete aminoácidos. Mientras que las razas B. no infectadas alejaban el ácido dicarboxílico casi exclusivamente se comprueba una utilización más lenta de estos ácidos aminados por las bacterias infectadas.

Ahora bien, los datos útiles sobre la inhibición del crecimiento del fago por competidores antimetabolitos son muy escasos. Delbruck y Luria (94), en un breve reportaje, describen la reversión por el PABA de la inhibición del crecimiento del fago inhibido por la sulfatiazona. Cohen y Fowler (95) han aportado un detallado estudio sobre la acción inhibidora del 5-metil-triftofano (5MT) sobre la síntesis del T2. Este cuerpo es un competidor específico del triftofano en la síntesis de la proteína. El 5MT inhibe el desarrollo bacteriano sin inhibición del consumo de O., y no inactiva el fago T2r+. En una baja concentración bacteriana él puede prevenir el crecimiento del fago si la concentración molecular es también baja. Si este cuerpo es añadido antes de la contaminación del cultivo o en la primera mitad del período latente en un medio F. las bacterias no liberan virus si hay ausencia de triftofano en el medio. Si el compuesto es añadido a los 12' después de la infección se observa la liberación de virus. El fago inhibido en su multiplicación por el 5MT puede formar placas al ser sembrado en el medio apropiado; esto supone que esta inhibición ha sido revocada posiblemente por el triptofano contenido en el medio de agar caldo sembrado. En efecto, se ha observado que pequeñas cantidades de triptofano pueden anular esta inhibición permitiendo la inmediata recuperación del desarrollo del fago. De todo ello se deduce que el 5MT detiene un proceso que requiere triftofano en los primeros minutos de la infección. Si el 5MT es utilizado para interrumpir el período de latencia a los 12' de un período de 27', y el triftofano es añadido 15' más tarde, todo se desarrolla en forma normal. Muchos inhibidores del crecimiento de virus, como el 5MT, cianuro, proflavina, pueden causar la lisis de las bacterias infectadas, pero no las de las no infectadas, y de este modo provocan la esterilización con respecto al virus de una población que contiene células normales e infectadas.

F) La citología bacteriana y la infección por el fago.

Los trabajos de Luria y Human (96) y Murray y Gillen (97), llevados a cabo en el coli infectado con el T2, son muy demostrativos. Las observa-

ciones fueron hechas en bacterias teñidas con el método de Piekarski-Robinow. Antes de la infección se observaron dos a cuatro cuerpos nucleares coloreados en el interior de la célula. 5' después de la infección por el T2 se comprueba una alteración en la morfología del núcleo bacteriano y de su contenido en DNA. El núcleo aparece roto y desplazado, formando masas que se sitúan en la periferia de la célula. En el microscopio con campo obscuro, la célula viva no infectada aparece como un cuerpo alargado, cuyo contorno es lo único visible. El interior aparece completamente obscuro. En la infectada se observa la presencia en su superficie de desparramados gránulos, y el número de éstos parece ser similar a la intensidad de la infección. Por último, el interior de la bacteria se llena de pequeñas partículas en violento movimiento. Con fago T5, donde el período de latencia es más largo, hay un intervalo de tiempo entre el degradamiento nuclear y la aparición de la nueva cromatina. Durante este intervalo ninguna estructura celular da la reacción citoquímica del DNA, aun cuando el DNA está ya presente en la célula. La ruptura de la bacteria puede tener lugar de varias maneras. Las pequeñas partículas interiores se pueden congregar cerca de la zona media de la bacteria, que se hincha, adquiere un aspecto esférico y rompe, cientos de partículas se desparraman y estos fagos se difunden lentamente por la preparación. Una bacteria grande puede romperse en dos y una mitad engranada en la otra poco a poco se desenganchan, mientras que los fagos fluyen por la abertura. Algunas veces la bacteria infectada puede hincharse en su forma esférica, pero no romper, no liberando fagos. No cabe duda que las partículas que son identificadas como fagos emergen del interior de la bacteria rota. Estos cambios nos explican el porqué las bacterias muertas por el fago no pueden reproducirse. Ello también nos sugiere el que la redirección de la síntesis pueda ser debida a la eliminación de los genes bacterianos como determinantes de la especificidad protoplasmática con su reemplazamiento por los genes fago.

Recientemente, Beutner y colaboradores (98), utilizando el microscopio de luz y el electrónico, han estudiado la citología del coli B infectado con el fago T2. Colorean sus preparaciones según la técnica de Feulgen y la de De Lamater, confirmando los resultados obtenidos por Luria y Humann (96), Murray, Gillen y Heagy (97); la cromatina pierde su configuración y posición característica durante la primera mitad del período de latencia, y los corpúsculos nucleares Feulgen positivos de la bacteria son rotos y desplazados a la periferia de la célula, quedando, sin embargo,

ésta todavía intacta. La desintegración del núcleo está en concordancia con la degradación del DNA nuclear y el paso de sus constituyentes a los nuevos fagos. El relleno de las células por el material Feulgen positivo está de acuerdo con la síntesis del nuevo DNA por las células infectadas, síntesis que utiliza, según hemos ya revisado en capítulo anterior, materiales procedentes del medio ambiente; con el microscopio electrónico se comprueba en la primera mitad del período de latencia que el aspecto obscuro y claro de la célula se encuentra reemplazado por áreas vesicolasas al borde de las células. La segunda mitad del período de latencia está caracterizado por cambios manifiestos de la textura del protoplasma y por la formación gradual interna, primero por los «anlagen» del fago, después por el nuevo fago ya completo.

Ahora bien, en relación a la síntesis por la bacteria infectada de componentes específicos del fago, tal como el hidrosil-metil-citosina, el cuadro citológico sugiere que el papel del fago podría ser introducir determinantes genéticos específicos para la producción de los enzimas necesarios. Así, el virus podría introducir un nuevo sistema enzimático dentro de la célula huésped, no como enzimas fago preformados, sino como tipos genéticos para la síntesis enzimática. Una interesante confirmación de este punto de vista es la observación llevada a cabo sobre colis esterilizados por la mostaza nitrogenada. Los trabajos de Herriot (99) demuestran que estas células sintetizan no el DNA, sino el acumulado RNA. La infección con fago T2 causa una inmediata suspensión de la síntesis del RNA y una recuperación de la síntesis del DNA seguido por lisis con liberación de fago. Aquí el fago parece haber contribuído al necesario DNA para su propia síntesis. La sustitución de genes fago por genes huésped, como consecuencia de una infección, ha sido descrita por Luria (100) como parasitismo en el nivel genético. Los fenómenos citoquímicos observados en el sistema de fagos T no están presentes en todos los sistemas fago-huésped. En muchos otros sistemas, el RNA y su síntesis enzimática continúa hasta la lisis, y el único cambio comprobable en el sistema enzimático es un retardo de varios minutos en la síntesis del DNA (trabajos de Siminovicht y Rapkine, 101). Esto sugiere que el cambio del DNA del huésped al DNA del fago es el momento crítico, mientras que los otros cambios en la pauta de síntesis pueden ser restringidos a casos especiales.

(Continuará.)

INFORMACION

ACTAS DE LA SOCIEDAD

MADRID

Acta de la sesión celebrada el día 7 de marzo de 1955.

Bajo la presidencia de don Gerardo Clavero del Campo, y actuando como Secretario don Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las 20,15 horas en la sala de actos del Instituto «Daza de Valdés», de Optica, del C. S. I. C., Serrano, 121.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. Son admitidos como socios de número la Srta. Eulalia Cabezas de Herrera Sánchez, Farmacéutica, de Madrid, presentada por don Lorenzo Vilas, y la Srta. María Aparicio; Srta. Ramona Beltrá Martínez de Velasco, Farmacéutica, de Madrid, presentada por don Lorenzo Vilas y don Román Vicente; don Manuel Ribeiro Marques Gómes, Ingeniero Agrónomo, de Sacavem (Portugal), presentado por don Miguel Rubio y don Julio Rodríguez Villanueva; Srta. Elena Contrí Cruz, Farmacéutica, de Madrid, presentada por don Lorenzo Vilas y don Miguel Rubio.

Don Vicente Callao traza una semblanza del Dr. Antonio Ruiz Falcó, a cuya memoria se dedica esta sesión, destacando, junto a sus valores humanos, su paso por el laboratorio de Ramón y Cajal, donde inició su preparación microbiológica, y sus cualidades pedagógicas, puestas de manifiesto en el Instituto de Higiene Alfonso XIII y en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina. A continuación, son recordadas diversas facetas del que fué ilustre y querido Presidente de la Sociedad por los señores Urgoiti, Socías y Vilas. Cierra el acto el señor Presidente, haciendo resaltar las actividades sanitarias del Dr. Ruiz Falcó, Maestro cordial y sencillo de buen número de promociones de microbiólogos.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las 21,10 horas.