

VOLUMEN 9

ENERO-MARZO 1956

NUM. 1

---

# *Microbiología Española*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
MADRID



## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socias Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

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

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

---

## SUMARIO

	<u>Páginas</u>
Posibilidades de obtención de sueros hiperinmunes de cobayo con los virus de las encefalitis de San Luis y Japonesa B, por <i>E. Gallardo Martínez</i> y <i>A. P. García Gancedo</i> ... ..	1
Observaciones sobre los cortes histológicos de los tumores producidos en el olivo por el <i>Ps. savastanoi</i> , por <i>R. Beltrá</i> ... ..	29
El <i>Sporobolomyces Hispanicus</i> , nueva especie de <i>Sporobolomycetaceae</i> aislado de extracto de corteza de encina, por <i>Fernando Peláez Campomanes</i> y <i>Carlos Ramírez Gómez</i> ... ..	37
La neurovacuna conserva siempre sus primitivas afinidades dérmicas, por <i>E. Gallardo Martínez</i> y <i>A. P. García Gancedo</i> ... ..	45
Estudio con el microscopio electrónico de algunas estirpes de <i>Pseudomonas savastanoi</i> , por <i>R. Beltrá</i> .	61
El aspecto estructural, bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto (continuación), por <i>Federico Beato y González</i> ... ..	77

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

POSIBILIDADES DE OBTENCION DE SUEROS HIPERINMUNES  
DE COBAYO CON LOS VIRUS DE LAS ENCEFALITIS DE SAN  
LUIS Y JAPONESA B

POR

E. GALLARDO MARTÍNEZ y A. P. GARCÍA GANCEDO.

DATOS PRELIMINARES

La encefalitis de San Luis es una meningoencefalitis endémica y epidémica en las regiones Centro y Oeste de los Estados Unidos. Tiene una sintomatología variada, suele manifestarse en el verano y está originada por un virus específico. La enfermedad es semejante en muchos aspectos a la encefalitis equina tipo Oeste y a la Japonesa B.

Son susceptibles a este virus los animales de experimentación siguientes: mono (*Macacus Rhesus*), ratones blancos, ratones domésticos, ratas muy jóvenes. Los cobayos, conejos y otros vertebrados pueden sufrir una infección inaparente. Los caballos y los hamsters sólo son susceptibles a ciertas cepas.

La encefalitis Japonesa B., junto con la de San Luis, forman el grupo de las llamadas encefalitis de verano. Prevalece en el Lejano Oriente, especialmente en el Japón. Está originada por un virus semejante en algunos aspectos al de la encefalitis de San Luis.

Son susceptibles a este virus los animales siguientes: ratón, mono, caballo, conejo, rata y hamster. El cobayo es parcialmente resistente, presentando sólo una reacción febril.

Según Bergey, ambos virus son del género *Erro*, familia *Erronaceae*, suborden *Zoophagineae*, grupo Virales. El virus de San Luis es *Erro scelestus* y el japonés *Erro japonicus*.

Casals obtuvo sueros de las encefalitis de San Luis y Japonesa B, inocu-

lando material virulento de cerebro de ratón a cobayos, pero indica que sólo los utilizó en la investigación de anticuerpos neutralizantes.

Los cobayos fueron inmunizados por repetidas inyecciones intraperitoneales de material cerebral virulento de ratón a diluciones  $10^{-3}$  ó  $10^{-2}$  en dosis de 4 c. c. Alrededor de cinco semanas después de la vacunación, cuando los animales han recibido de cuatro a seis inyecciones, se sangran por primera vez.

Hammon y colaboradores parten de cerebro virulento de hamster y hacen dos inoculaciones intracerebrales de 0,15 c. c. cada una, de una suspensión al 10 por 100, con intervalo de diez días. Los animales se sangran de diez a quince días después de la última inyección.

#### RESUMEN DE LO REALIZADO ANTERIORMENTE

Nosotros, en un trabajo anterior, ensayamos la posibilidad de obtener en los cobayos, partiendo de suspensiones de cerebro virulento de ratón, sueros con niveles apreciables de anticuerpos fijadores de complemento, para ambas encefalitis.

Hemos utilizado los siguientes virus: San Luis, cepa Webster, aislada por el Dr. L. T. Webster de un cerebro humano; Japonesa B, cepa Nakayama.

Para la obtención de los sueros hemos ensayado cuatro pautas diferentes, que son las siguientes:

Pauta 1.<sup>a</sup>—Inoculación intracerebral de 0,15 c. c. de suspensión de cerebro virulento de ratón al 1/10, seguida de dos inoculaciones intraperitoneales de 0,50 c. c. y 1 c. c., respectivamente, de la misma suspensión. Las tres inoculaciones separadas por intervalos de siete días.

Pauta 2.<sup>a</sup>—Inoculación intracerebral de suspensión de virus al 1/10 en la cantidad de 0,20 c. c.

Pauta 3.<sup>a</sup>—Inoculación intracerebral de suspensión de virus al 1/10 en la cantidad de 0,15 c. c., seguida de dos inoculaciones intraperitoneales de la misma suspensión en las cantidades de 1 c. c. la primera, y 2 c. c. la segunda, con intervalos de siete días.

Pauta 4.<sup>a</sup>—Cinco inoculaciones intraperitoneales de suspensión de virus al 1/100, en la cantidad de 4 c. c. cada una y a intervalos de siete días.

Los animales, en todos los casos, se sangran a los quince días de la última inoculación. Estos animales siempre deben ser machos.

Todas las inoculaciones se hicieron con suspensión de material virulento de cerebro de ratón. Cada pauta se ensayó simultáneamente para ambas encefalitis de San Luis y Japonesa B.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Encefalitis de San Luis.—Pauta 1.<sup>a</sup>: suero núm. 1, que dió un título 0. Pauta 2.<sup>a</sup>: suero núm. 2, que dió un título 0. Pauta 3.<sup>a</sup>: sueros números 3 y 4, que dieron un título de 0 y 1/4, respectivamente. Pauta 4.<sup>a</sup>: sueros núms. 5 y 6, que dieron un título de 1/8 y 1/4 respectivamente.

Encefalitis Japonesa B.—Pauta 1.<sup>a</sup>: sueros núms. 1 y 2, con títulos 1/256 ambos. Pauta 2.<sup>a</sup>: sueros núms. 3 y 4, con títulos 0 ambos. Pauta 3.<sup>a</sup>: sueros núms. 7, 8 y 9, con títulos 1/8, 1/32 y 1/64, respectivamente. Pauta 4.<sup>a</sup>: sueros núms. 10 y 11, con títulos 1/16 ambos.

Como ya indicamos en nuestro anterior trabajo, de estas experiencias destaca notablemente el hecho de que habiéndose efectuado los ensayos de inmunización al mismo tiempo y con las mismas pautas, en los correspondientes a la encefalitis Japonesa B, sólo muere un cobayo de los diez inoculados; en tanto que en los de la encefalitis de San Luis, de trece animales inoculados sólo cuatro llegan vivos al final de la experiencia, siendo todos los animales del mismo origen y viviendo todos en las mismas condiciones ambientales.

Con referencia a las fijaciones de complemento realizadas, hemos de indicar:

Que los antígenos utilizados para titular los sueros fueron preparados por nosotros según la técnica de W. Mc. D. Hammon y C. España, obteniéndose así en la forma avirulenta.

Los sueros obtenidos se inactivan en baño maría a 56 grados C., durante treinta minutos, y se añade como conservador, borato de fenilmercurio, de forma que éste quede diluído al 1/10.000.

Tanto los antígenos como los sueros se liofilizan inmediatamente después de su obtención y se mantienen en helera a -20 grados C., hasta su empleo.

## ULTIMAS EXPERIENCIAS

Obtención de sueros.

Hemos realizado nuevas experiencias para la obtención de sueros de ambas encefalitis, utilizando las pautas de inmunización 1.<sup>a</sup> y 4.<sup>a</sup>, y hemos obtenido 3 sueros para cada una, haciendo un total de 6 sueros para cada tipo de encefalitis.

Se han obtenido los siguientes títulos de anticuerpos fijadores de complemento:

Encefalitis de San Luis.—Pauta 1.<sup>a</sup>: sueros núms. 7, 8 y 9, con títulos 1/2, 1/4 y 0, respectivamente. Pauta 4.<sup>a</sup>: sueros, 10, 11 y 12, con títulos 1/2, 1/1 y 1/1.

Encefalitis Japonesa B.—Pauta 1.<sup>a</sup>: sueros 12, 13 y 14, con títulos 1/32 los tres. Pauta 4.<sup>a</sup>: sueros 15, 16 y 17, con títulos 1/16, 1/16 y 1/32, respectivamente.

Hemos ensayado también para la encefalitis de San Luis, otra pauta, la 5.<sup>a</sup>, que consiste en una doble inoculación simultánea de 0,15 c. c., intracerebralmente, y 0,50 c. c., intraperitonealmente de suspensión de cerebro virulento de ratón al 1/10, seguida a los siete días por otra doble inoculación de 0,10 c. c., intracerebralmente, y 0,50 c. c., intraperitonealmente, seguida a su vez a los siete días por otra inoculación igual, todas de la misma dilución de virus. Se sangran los cobayos a los quince días. Y se obtienen los sueros núm. 13 y 14 con títulos 1/2 y 1/1.

Se ha observado en cobayos inoculados con virus de la encefalitis de San Luis, la presencia de los síntomas paralíticos característicos de esta infección. En nuestro trabajo anterior, un cobayo sacrificado diez días después de la inoculación intracerebral, de 0,15 c. c. al 1/10, presentó parálisis. (Véase fotografía.)

Por otra parte, en varios cobayos inoculados con virus de este mismo tipo se ha observado una gran pérdida de pelo. (Véase fotografía.)

Sin embargo, todo esto no ha sido observado en los cobayos inoculados con virus de la encefalitis Japonesa B.



## OBTENCION DE

## ENCEFALITIS DE SAN LUIS

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Cobayo	Peso Grs.	Intracerebral Suspensión del virus	Cantidad	1. <sup>a</sup> Intraperit Suspensión del virus
1. <sup>o</sup>	470	1/10	0,15 c. c.	1/10
2. <sup>o</sup>	430	1/10	0,15 c. c.	1/10
3. <sup>o</sup>	380	1/10	0,15 c. c.	1/10

## ENCEFALITIS DE SAN LUIS

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Cobayo	Peso Grs.	Vía de inoculación intraperitoneal
1. <sup>o</sup>	390	1.a-2.a-3.a-4.a-5.a
2. <sup>o</sup>	500	1.a-2.a-3.a-4.a-5.a
3. <sup>o</sup>	500	1.a-2.a-3.a-4.a-5.a

OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES DE COBAYO

7

LOS SUEROS

PAUTA 1.<sup>a</sup>

Animales utilizados: Cobayos machos.

Cantidad	2. <sup>a</sup> Intraperit Suspensión del virus	Cantidad	Resultados
0,50 c. c.	1/10	1 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 7.
0,50 c. c.	1/10	1 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 8.
0,50 c. c.	1/10	1 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 9.

PAUTA 4.<sup>a</sup>

Animales utilizados: Cobayos machos.

Dilución	Cantidad	Resultados
1/100	4 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 10.
1/100	4 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 11.
1/100	4 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 12.

7

## ENCEFALITIS JAPONESA B.

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Cobayo	Peso Grs.	Intracerebral Suspensión del virus	Cantidad	1. <sup>a</sup> Intraperit Suspensión del virus
1.º	480	1/10	0,15 c. c.	1/10
2.º	410	1/10	0,15 c. c.	1/10
3.º	470	1/10	0,15 c. c.	1/10

## ENCEFALITIS JAPONESA B.

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Cobayo	Peso Grs.	Vía de inoculación intraperitoneal
1.º	400	1.a-2.a-3.a-4.a-5.a
2.º	430	1.a-2.a-3.a-4.a-5.a
3.º	480	1.a-2.a-3.a-4.a-5.a

OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES DE COBAYO

9

PAUTA 1.<sup>a</sup>

Animales utilizados: Cobayos machos.

Cantidad	2. <sup>a</sup> Intraperit. Suspensión del virus	Cantidad	Resultados
0.50 c. c.	1/10	1 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 12.
0.50 c. c.	1/10	1 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 13.
0.50 c. c.	1/10	1 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 14.

PAUTA 4.<sup>a</sup>

Animales utilizados: Cobayos machos.

Dilución	Cantidad	Resultados
1/100	4 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 15.
1/100	4 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 16.
1/100	4 c. c.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 17.

9

## ENCEFALITIS DE SAN LUIS

Se parte de suspensión virulenta de cerebro de ratón.

Cobayo	Peso Grs.	1. <sup>a</sup> Intracerebr. y 1. <sup>a</sup> Intraperit. Suspensión del virus	Cantidad	2. <sup>a</sup> Intracerebr. y 2. <sup>a</sup> Intraperit. Suspensión del virus
1. <sup>o</sup>	475	1/10	0,15 ic 0,50 ip.	1/10
2. <sup>o</sup>	395	1/10	0,15 ic 0,50 ip.	1/10

PAUTA 5.<sup>a</sup>

Animales inoculados: Cobayos machos.

Cantidad	3. <sup>a</sup> Intracerebr. y 3. <sup>a</sup> Intraperit. Suspensión del virus	Cantidad	Resultados
0,10 ic. 0,50 ip.	1/10	0,10 ic. 0,50 ip.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 13.
0,10 ic. 0,50 ip.	1/10	0,10 ic. 0,50 ip.	Sangría a los 15 días. Suero núm. 14.

## TITULACION DE LOS SUEROS

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 7

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
s. LUIS 1/1	4	3	±	0	0	0	0	0	0	

Título del suero: 1/2.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 8

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
s. LUIS 1/1	4	3	2	0	0	0	0	0	0	

Título del suero: 1/4.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 9

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
s. LUIS 1/1	1	±	0	0	0	0	0	0	0	

Título del suero: 0.

OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES DE COBAYO

13

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 10

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	4	2	±	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/2.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 11

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	2	1	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/1.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 12

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	4	2	±	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/2.

13

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 13

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
s. LUIS 1/1	4	2	±	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/2.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

SUERO N.º 14

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
s. LUIS 1/1	3	±	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/1.

ENCEFALITIS JAPONESA B

SUERO N.º 12

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
JAPON 1/1	4	4	4	4	3	2	1	0	0	0

Título del suero: 1/32.

OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES DE COBAYO

15

ENCEFALITIS JAPONESA B

SUERO N.º 13

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
JAPON 1/1	4	4	4	4	4	3	±	0	0	

Título del suero: 1/32.

ENCEFALITIS JAPONESA B-

SUERO N.º 14

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
JAPON 1/1	4	4	4	4	3	2	1	0	0	

Título del suero: 1/32.

ENCEFALITIS JAPONESA B

SUERO N.º 15

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
JAPON 1/1	4	4	4	3	2	±	0	0	0	

Título del suero: 1/16

15

ENCEFALITIS JAPONESA B

SUERO N.º 16

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
JAPON 1/1	4	4	4	3	2	±	0	0	0	

Título del suero: 1/16.

ENCEFALITIS JAPONESA B

SUERO N.º 17

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
JAPON 1/1	4	4	4	4	3	2	±	0	0	

Título del suero: 1/32.

## CONTROLES DE LA TITULACION DE SUEROS

SUERO NORMAL

Antígeno	Diluciones del suero									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
S. LUIS 1/1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

OBTENCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES DE COBAYO

17

SUERO NORMAL

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	2	0	0	0	0	0	0	0	0

SUERO SAN LUIS POSITIVO N.º 8

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
NORMAL 1/1	2	0	0	0	0	0	0	0	0

SUERO JAPÓN POSITIVO N.º 17

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
NORMAL 1/1	2	±	0	0	0	0	0	0	0

17

## RESUMEN

Encefalitis de San Luis: Animales inoculados, 21. Sueros obtenidos, 14. Títulos de anticuerpos fijadores del complemento; 10 sueros débilmente positivos, alcanzando como máximo un título de 1/8 en un caso, y 4 sueros negativos.

Encefalitis Japonesa B: Animales inoculados, 16. Sueros obtenidos, 15. Títulos de anticuerpos fijadores del complemento, 13 sueros positivos, llegando a alcanzar un título de 1/256 y siendo el título mínimo positivo de un suero de 1/8; negativos 2 sueros.

PROPORCION DE MORTALIDAD PARA EL COBAYO ANTE  
LA INOCULACION CON ESTOS VIRUS

Además de las experiencias ya indicadas, realizamos otra serie de inmunizaciones, siguiendo también las pautas 1.<sup>a</sup> y 4.<sup>a</sup>. Pero los sueros obtenidos, por causas ajenas a nuestra voluntad, se perdieron sin haber sido titulados.

No obstante, puede ser de interés indicar los resultados obtenidos, ya que sigue observándose una mayor mortalidad en los cobayos inoculados con San Luis frente a los inoculados con virus de la encefalitis Japonesa B.

Encefalitis de San Luis.—Pauta 1.<sup>a</sup>: cobayos inoculados, 6; mueren 5, supervivientes, 1. Pauta 4.<sup>a</sup>: cobayos inoculados, 6; mueren 2, supervivientes 4. En total, inoculados, 12; mueren 7, supervivientes 5.

Encefalitis Japonesa B.—Pauta 1.<sup>a</sup>: cobayos inoculados, 5; mueren 2, supervivientes 3. Pauta 4.<sup>a</sup>: cobayos inoculados 3; no muere ninguno; supervivientes 3. En total, inoculados, 8; mueren 2, supervivientes 6.

Si unimos estos resultados con los obtenidos en las demás experiencias, tenemos:

Encefalitis de San Luis.—Inoculados, 27; mueren 16, supervivientes 9.

$$\frac{27}{16} = \frac{100}{x} \quad \times = \frac{1600}{27} = 59,25$$

Resulta un 59,25 por 100 de mortalidad.

Encefalitis Japonesa B. — Inoculados, 18; mueren 3, supervivientes 15.

$$\frac{18}{3} = \frac{100}{x} \quad \times = \frac{300}{18} = 16,6$$

Resulta un 16,6 por 100 de mortalidad.

Proporción de positividad de los sueros obtenidos:

Si tomamos entre los sueros que se han obtenido como positivos a aquellos que poseen un título mínimo de 1/4 y hallamos la proporción que existe entre ellos y los negativos, se observa lo siguiente:

Encefalitis de San Luis.—Sueros obtenidos, 14; sueros positivos, 4.

$$\frac{14}{4} = \frac{100}{x} \quad \times = \frac{400}{14} = 28,57$$

Resultando un 28,57 por 100 de sueros positivos.

Encefalitis Japonesa B.—Sueros obtenidos, 17; sueros positivos, 13.

$$\frac{17}{13} = \frac{100}{x} \quad \times = \frac{1300}{17} = 76,47$$

Resultando un 76,47 por 100 de sueros positivos.

#### TEMPERATURAS DE LOS COBAYOS

En cada experiencia, las oscilaciones de temperatura que presenta cada cobayo son sensiblemente paralelas. (Véanse gráficas.)

En todos los casos se observa que tras la primera inoculación intracerebral la temperatura sube rápidamente, alcanzando y aun superando en algún caso los 41 grados C. Luego, la temperatura decrece lentamente hasta normalizarse. Las inoculaciones intraperitoneales sólo provocan un ligero aumento de la temperatura.

#### CONCLUSIONES

De todo ello parece deducirse que la obtención de sueros hiperinmunes de cobayo con el virus de la encefalitis Japonesa B, según las pautas ensayadas y principalmente con la 1.<sup>a</sup> y la 4.<sup>a</sup>, es francamente posible.

En el caso de la encefalitis de San Luis, no se encuentra la misma facilidad, como puede observarse.

La mortalidad de los cobayos frente a la inoculación es considerablemente mayor con el virus de San Luis, alcanzando un 59,25 por 100, frente a un 16,6 por 100 para el virus Japonés B.

El promedio de positividad de los sueros es mayor para el virus Japonés B, alcanzándose un 76,47 por 100 de sueros positivos, frente a un 28,57 por 100 para el virus San Luis.

Aun el suero obtenido del cobayo inoculado con virus de San Luis, que presentó parálisis, resultó ser de título negativo.

Además, el título máximo de los sueros obtenidos para el virus de San Luis resulta ser el mínimo positivo obtenido para el virus Japonés B.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- CASALS, J. Jour. Exp. Med., 1944, 7, 4, 341-359.  
GARCÍA GANCEDO, A. P. Microbiol. Esp. 1955, 8, I y II.  
HAMMON W. MC.D. AND ESPAÑA C. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1947, 66, 113.  
RIVERS, T. M. Viral and rickettsial infections of man. Second edition, 1952.

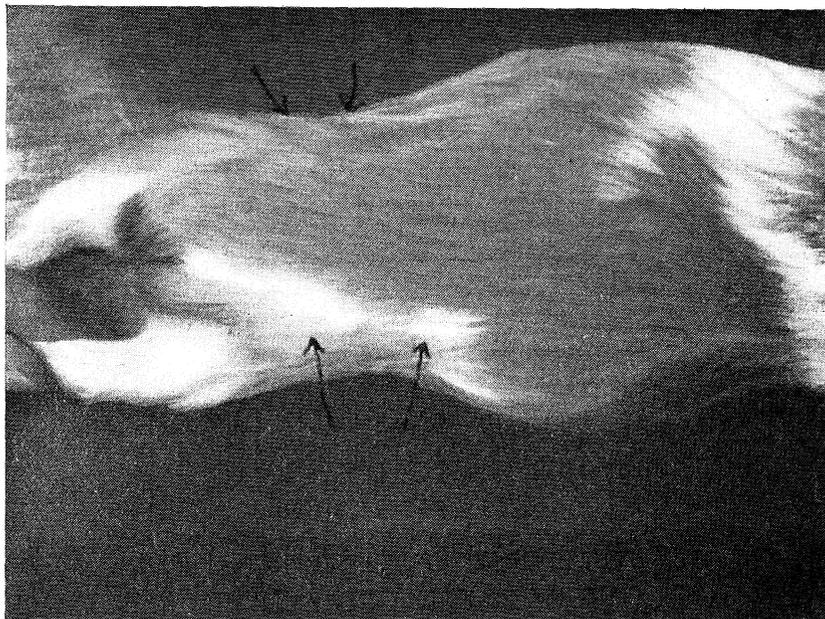


FIG. 1.  
Cobayo presentando pérdida de pelo.

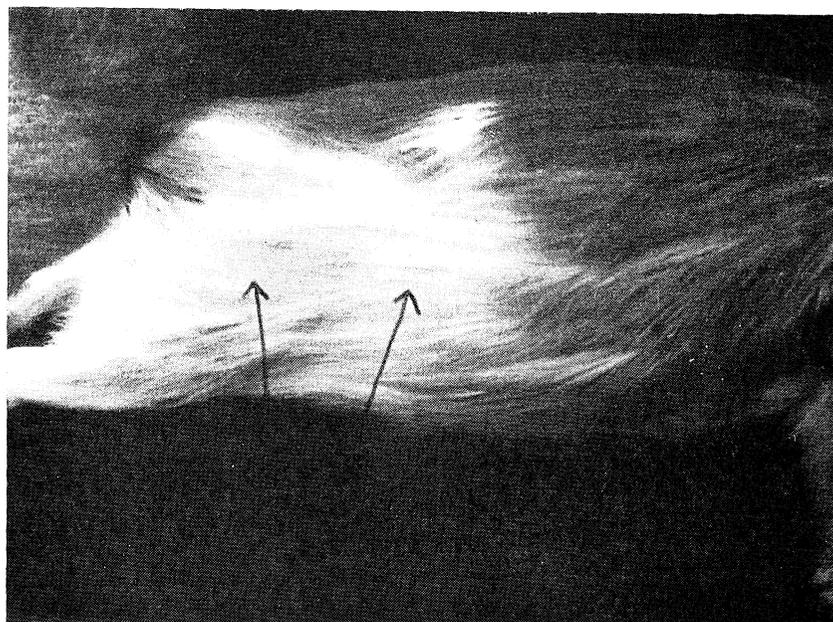


FIG. 2.  
Cobayo presentando pérdida de pelo.

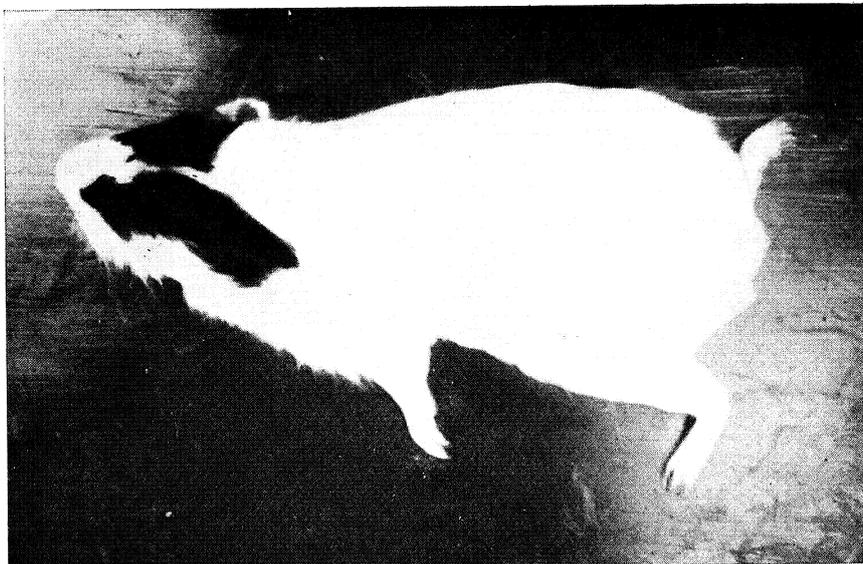
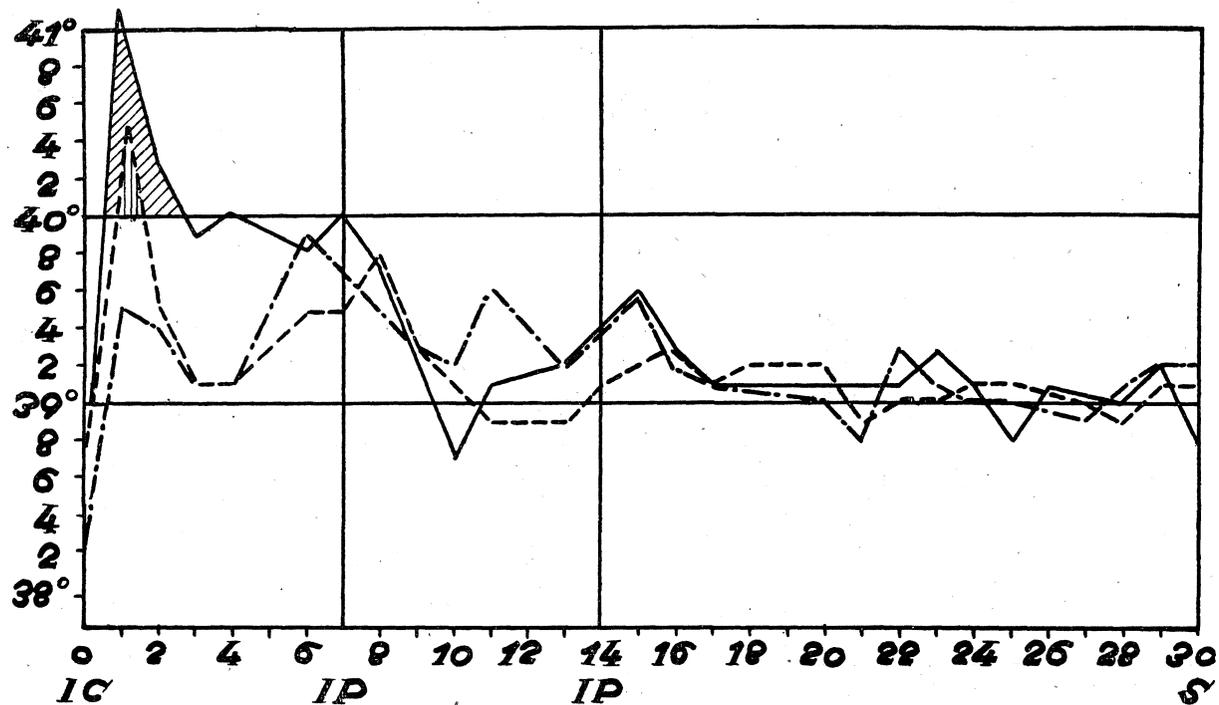


FIG. 3.  
Cobayo inoculado con encefalitis de San Luis  
presentando parálisis.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

PAUTA 1.<sup>a</sup>

Temperatura de los cobayos



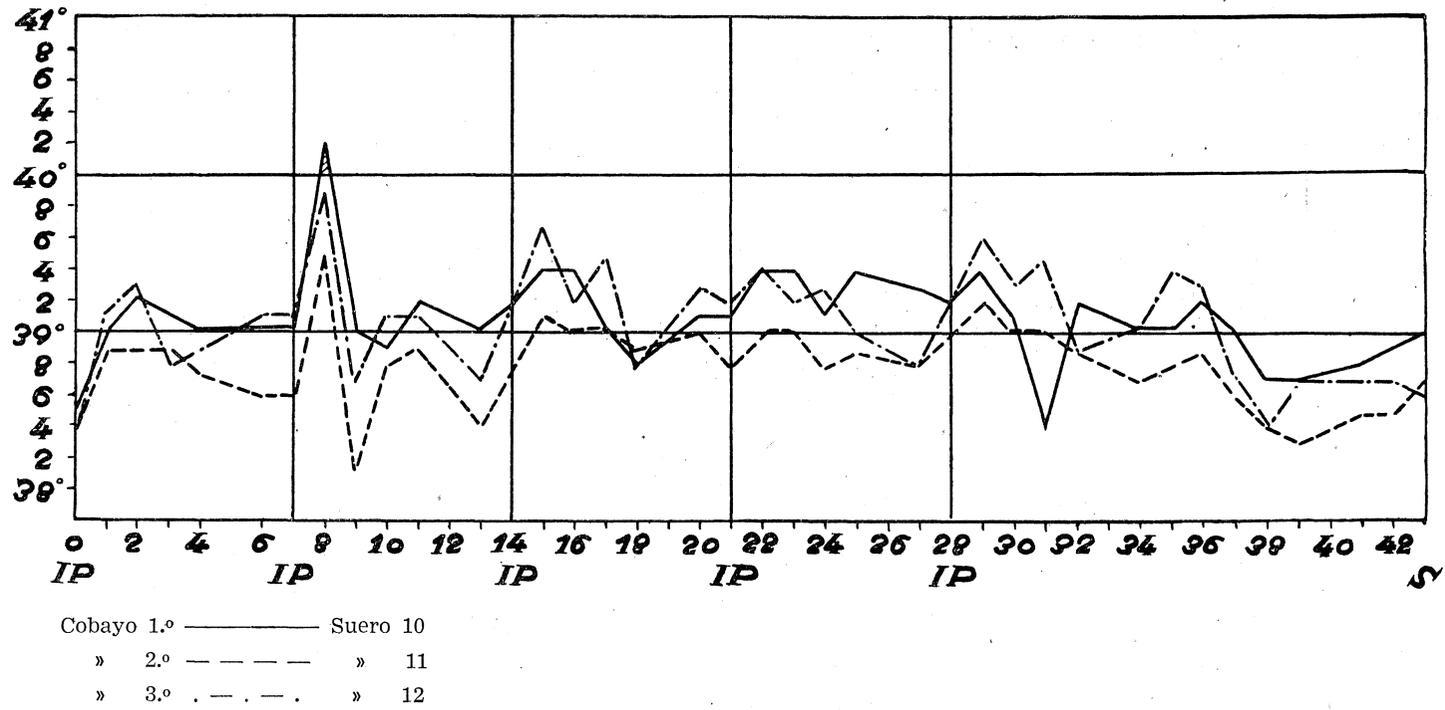
Cobayo 1.º ————— Suero 7  
 » 2.º - - - - - » 8  
 » 3.º . - . - . » 9

Ic: inoculación intracerebral.  
 Ip: » intraperitoneal.  
 S: Sangría.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS

PAUTA 4.<sup>a</sup>

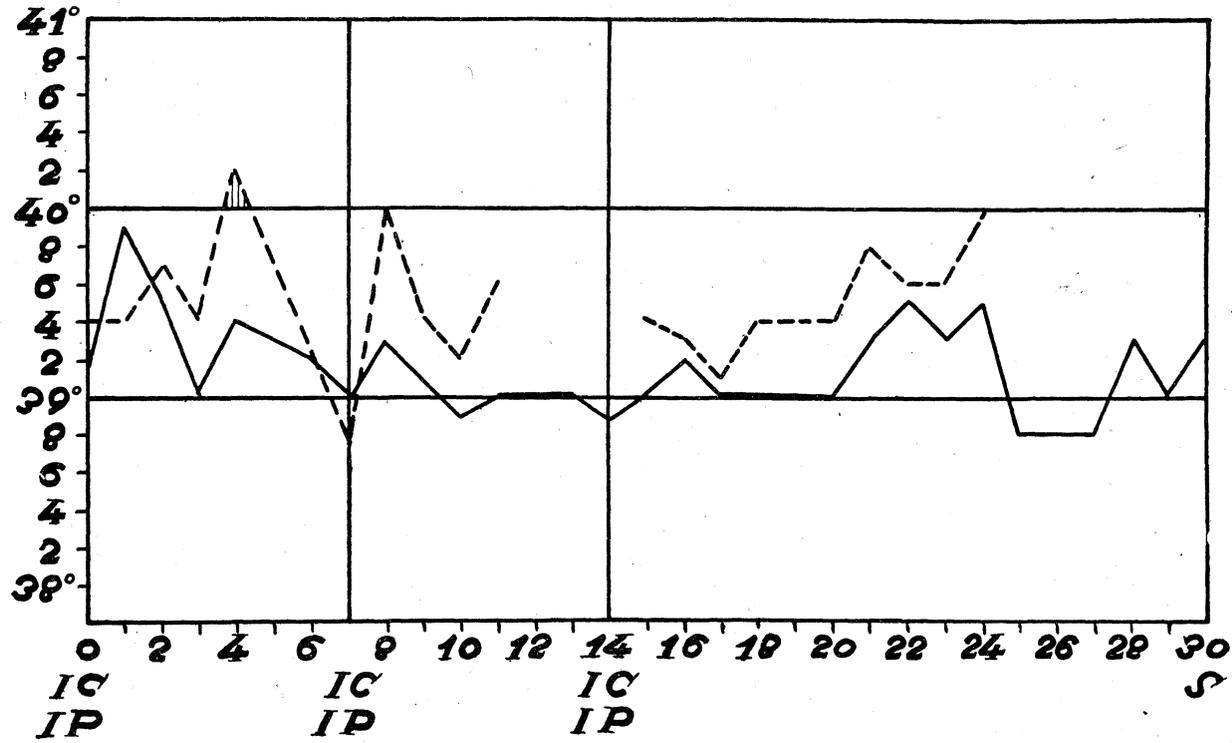
Temperatura de los cobayos



ENCEFALITIS DE SAN LUIS

PAUTA 5.<sup>a</sup>

Temperatura de los cobayos

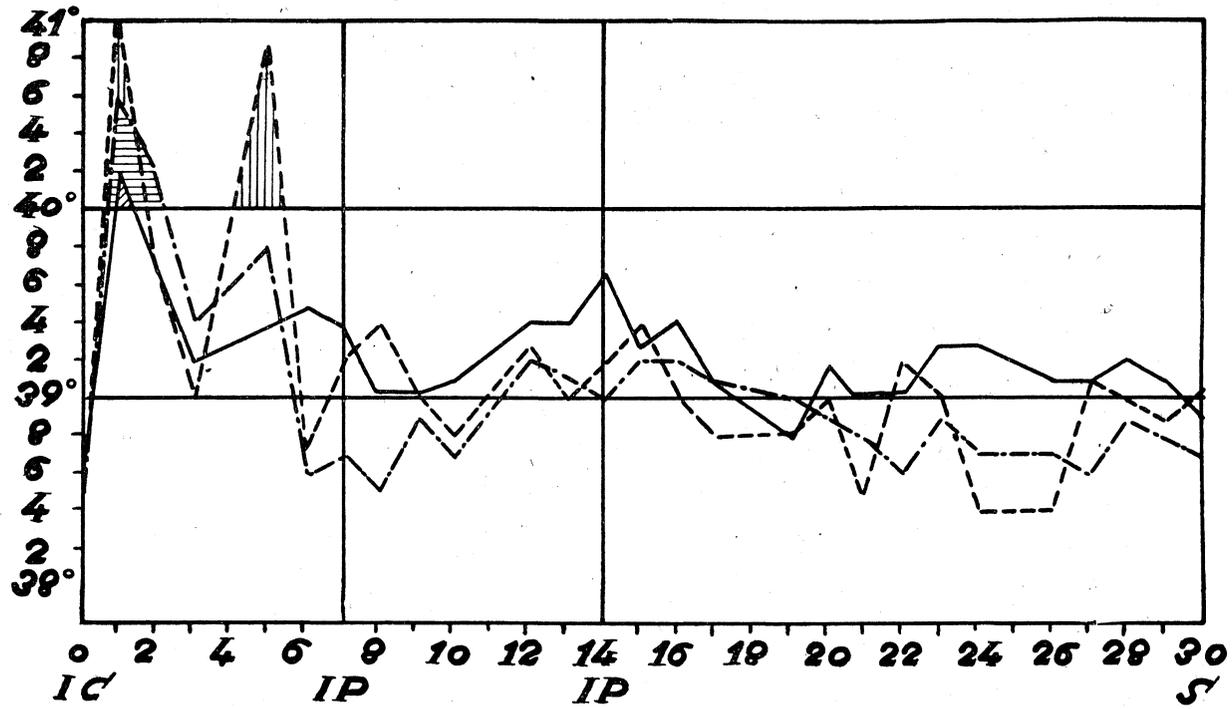


Cobayo 1.º — Suero 13  
 » 2.º - - - - - » 14

ENCEFALITIS JAPONESA B.

PAUTA 1.<sup>a</sup>

Temperatura de los cobayos

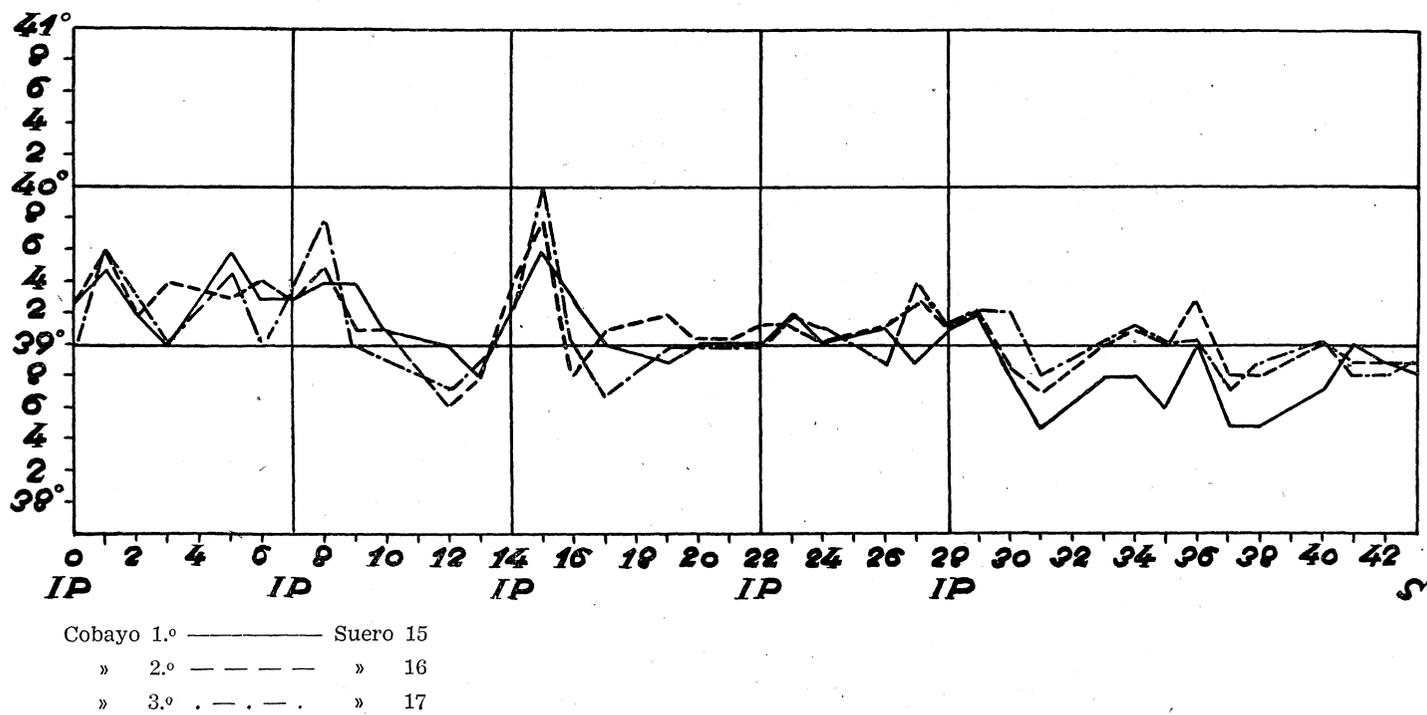


Cobayo 1.º ————— Suero 12  
 » 2.º - - - - - » 13  
 » 3.º . - . - . » 14

ENCEFALITIS JAPONESA B.

PAUTA 4.<sup>a</sup>

Temperatura de los cobayos



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

OBSERVACIONES SOBRE LOS CORTES HISTOLOGICOS DE  
LOS TUMORES PRODUCIDOS EN EL OLIVO POR EL *PS. SA-  
VASTANOI*

POR

R. BELTRÁ

El *Pseudomonas savastanoi*, puede, por distintos procedimientos, penetrar e infectar las ramas jóvenes de los olivos, produciendo agallas o tumores típicos, que deben su formación a que esta bacteria, cuando llega al parénquima cortical produce primero una hiperplasia y luego una destrucción de los tejidos, formando cavidades o cavernas que excavan el tumor poco a poco. En dichas cavidades se alojan las bacterias.

D'Oliveira (1939), al observar estos tumores, mediante cortes histológicos, hace notar que la infección no acarrea la muerte de las células; antes bien, ejerce un efecto estimulante sobre la división celular, observándose pocos o ningunos casos de degeneración celular, en la parte próxima a las cavernas; las células tienen apariencia y dimensiones normales, encontrándose las bacterias uniformemente distribuidas por todo el tumor, sin que la actividad celular cese. En estos tumores parece ser que hay un equilibrio entre la actividad del huésped y el parásito, y que se mantiene por un tiempo relativamente largo.

Parece ser que el *Ps. savastanoi* produce un estímulo en la multiplicación celular que se difunde por las células de alrededor del punto de infección, produciendo una desordenada división celular, que lleva consigo la producción de una hiperplasia.

Este parásito del olivo, fuera del huésped y en el huésped natural,

lleva consigo el poder de imprimir a cualquier planta que infecte, un tipo de lesiones que le es peculiar.

En este trabajo se ha fijado especial atención a la morfología de las bacterias que infectan e invaden las células del tumor y a cómo se encuentran repartidas en él. Estos tumores han sido ampliamente estudiados por Smith, Brown, D'Oliveira y otros.

### TECNICA

Los cortes histológicos del tumor se han hecho con un microtomo de congelación, escogiendo para ello preferentemente tumores jóvenes y de pequeño tamaño, ya que los que son viejos, por su consistencia coriácea, son difíciles de manejar, al igual que los de gran tamaño. El escoger tumores jóvenes también favorece la observación de las bacterias que estudiamos en el interior de los cortes, ya que, según Smith y Erwin (1905), en estos tumores hay menor número de bacterias saprófitas. Esto lo hemos comprobado nosotros experimentalmente en otros trabajos, al aislar el *Ps. savastanoi* de tumores de diferentes edades.

Antes de hacer los cortes histológicos de los tumores, se sumergieron éstos durante doce horas en un fijador rápido, Carnoy, y de ahí se han pasado al alcohol absoluto. Una vez hechos los cortes, se pasaron rápidamente al alcohol absoluto, tiñéndolos después de transcurridos quince minutos, por el método de Stoughton (1930), con carbol tionina y orange G.

Después de teñidos fueron muy bien deshidratados por medio de la esencia de clavo, quedando los cortes transparentes; se lavaron con xilol y las preparaciones se montaron en bálsamo del Canadá.

Mediante la tinción diferencial del tejido del tumor por el método de Stoughton, observamos las bacterias teñidas en rojo fuerte (violeta púrpura), los tejidos celulósicos teñidos en amarillo o verde, mientras que los tejidos lignificados se colorean de azul. Los núcleos se encuentran teñidos en azul claro y los nucleolos en color púrpura.

### RESULTADOS

Hemos observado las células del tumor, que son de aspecto normal, y también células vascularizadas, nucleolos, núcleos y bacterias de diferente morfología repartidas por todo el tejido. Se han visto las cavernas

producidas por el *Ps. savastanoi* rodeadas también de células de aspecto normal.

En resumen, se vieron células normales en todas las preparaciones y células vascularizadas en las fot. 1 y 2.

Núcleos en las fot. 2, 3, 5, 6, 7 y 8.

Nucleolos en la fot. 7.

Bacilos de extremos redondeados, tamaño más bien grande y gruesos, en fot. 1, 2, 3 y 8.

Bacilos de extremos apuntados en las fot. 3, 4 y 5, y por último, bacilos muy pequeños en fot. 3, 5, 6, 7 y 8.

El estudio de la distribución de los microorganismos en el interior del tumor parece demostrar que no sea necesaria la vascularización celular para favorecer la difusión de las bacterias. Estamos de acuerdo con la opinión de D'Oliveira, puesto que se ha observado que las células tumorales son de aspecto normal. Las bacterias encontradas en estos tejidos son muy diferentes morfológicamente. Es de suponer que en el caso de que fuese necesaria la vascularización de las células del tumor para la difusión de las bacterias, éstas se encontrarían solamente alrededor de este tipo de células y no repartidas uniformemente por todo el tumor.

#### RESUMEN

Al observar los cortes histológicos de los tumores producidos en el olivo por el *Pseudomonas savastanoi*, hemos visto las células tumorales de aspecto normal, y bacterias de diferente morfología, que se encuentran uniformemente repartidas por el tejido, aun lejos de las zonas de células vascularizadas, lo que nos hace suponer que no son necesarias la presencia de esta clase de células para la difusión de las bacterias.

#### SUMMARY

In this paper, which comprises the histological cuts of tumours produced by the bacterium *Pseudomonas savastanoi*, we were able to see the normal aspect of the tumorous cells. The bacteria are morphologically different, being distributed uniformly over the tissue, even from the vascularized zones. This fact apparently implies that the presence of this kind of cells is not necessary for the diffusion of the said bacteria

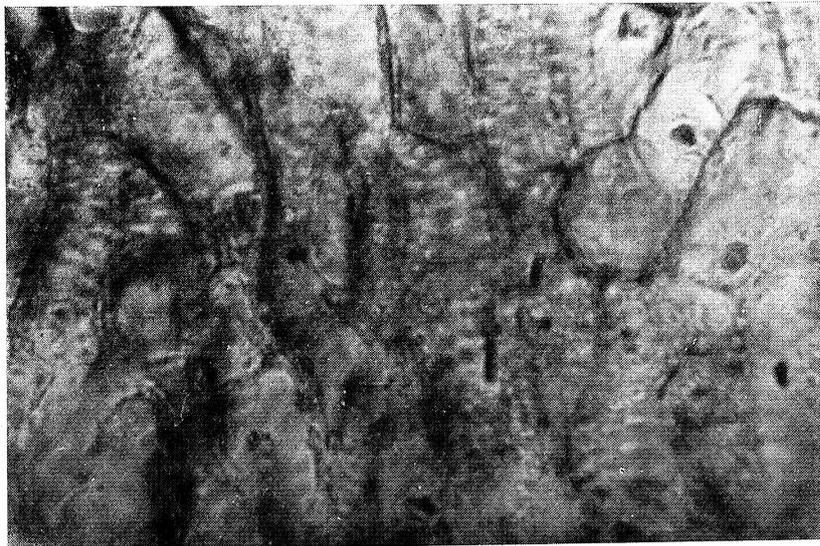
## BIBLIOGRAFIA

- BAKER, R. J. 1950. Cytological Technique. III edición, pp. 100-170 .
- BUTLER AND JONES. 1949. Plant Pathology, pp. 197-205.
- D'OLIVEIRA, M. L. 1939. Inoculacoes experimentais com o Bacterium Savastanoi E. F. Smith e o Bacterium Savastanoi var: fraxini. N. A. Brown. Agronomia Lusitana, vol. 1, tomo 1, pp. 88-102.
- SMITH, C. O. 1922. Pathogenicity of the olive knot organism on hosts related to the olive. Phitopathology, 12:271-278.
- SMITH Erwin, F. 1905. Some observations on the biology of the olives-tubercle organism. Centralb f. Bakt., 15:198-200.
- STOUGHTON, R. H. 1930. Thionin and orange G for the differential staining of bacteria and fungi in plant tissues. Ann. appl. Biol. 17:162.



Fot. 1.

Células tumorales vascularizadas con bacilos de extremos redondeados.  
Tinción por el método de Stoughton.



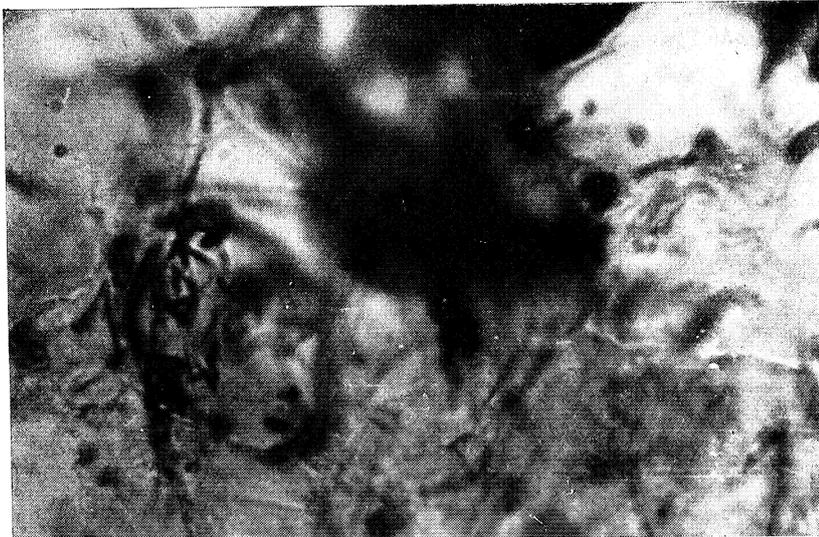
Fot. 2.

Células tumorales vascularizadas. Se observan núcleos y formas bacilares de extremos redondeados.



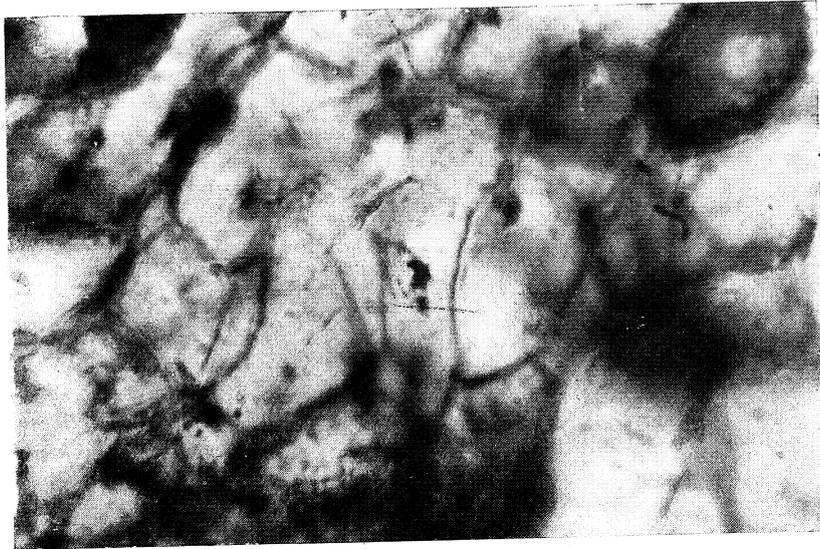
FOT. 3.

Núcleos. Formas bacilares de extremos redondeados y apuntados; hay otras formas muy pequeñas.



FOT. 4.

Se observan bacilos de extremos apuntados.



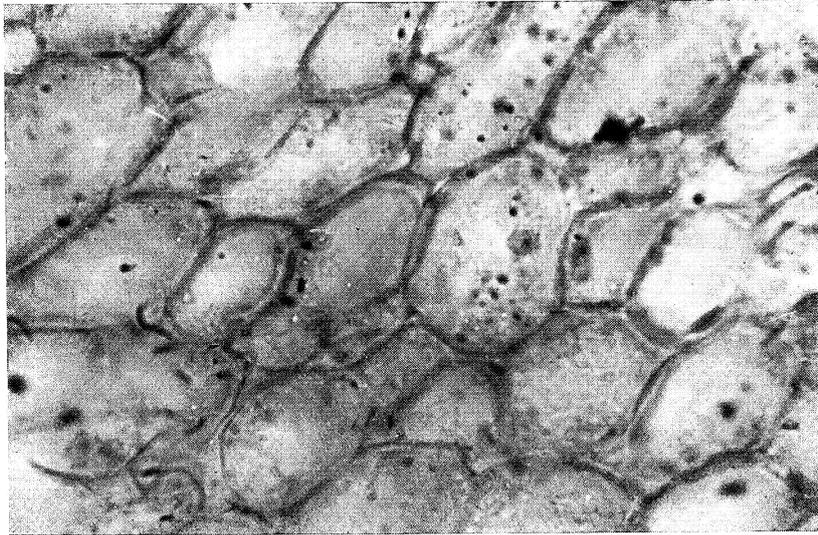
FOT. 5.

Núcleos. Hay bacilos con extremos apuntados y otros muy pequeños.

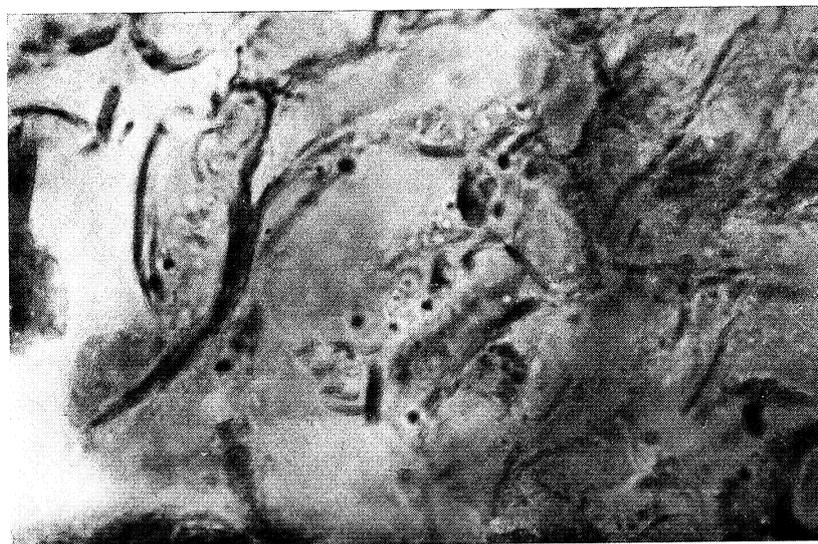


FOT. 6.

Núcleos. Formas bacilares muy pequeñas.



For. 7.  
Núcleos y nucleolos. Se observan bacilos muy pequeños.



For. 8.  
Núcleos. Formas bacilares de extremos redondeados y otras muy pequeñas.

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

**EL SPOROBOLOMYCES HISPANICUS, NUEVA ESPECIE DE  
SPOROBOLOMYCETACEAE AISLADO DE EXTRACTO DE  
CORTEZA DE ENCINA**

POR  
FERNANDO PELÁEZ CAMPOMANES y CARLOS RAMÍREZ GÓMEZ.

Durante nuestras investigaciones sobre levaduras aisladas de taninos procedentes de diversas plantas, aislamos una especie de *Sporobolomyces* de color rosa salmón, productor de abundante materia mucosa de color rojo, propiedad que se fué perdiendo después de varias resiembras.

Se asemeja a *Sporobolomyces salmonicolor* y a *Sp. holsaticus*, en poseer, como éstos, micelio verdadero y asimilar el nitrato potásico. A los cinco días forma velo fino mate y rugoso, como el *Sp. holsaticus*; pero se diferencia muy bien de ambas especies: en la asimilación de los azúcares, en la formación de abundantes blastosporas en el extremo de las hifas, por el menor diámetro de sus células.

Por estas razones, creemos poder hacer de este microorganismo una especie nueva, para la que proponemos el nombre de *Sporobolomyces hispanicus*. A continuación pasamos a describirlo.

DESCRIPCION

En extracto de malta: a los cinco días a 25° forma velo fino, rugoso, mate, transparente, rosado, con arrugas radiales. Las células son largas, irregulares u ovals a arriñonadas, siendo éstas las ballestosporas primarias y secundarias (fig. 1).

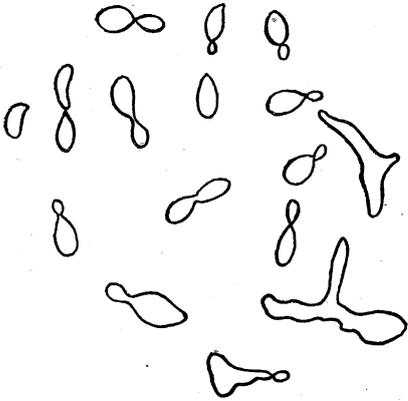


FIG. 1.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. sp.  
Células en extracto de malta a los cinco días a 25° C (1000 x).

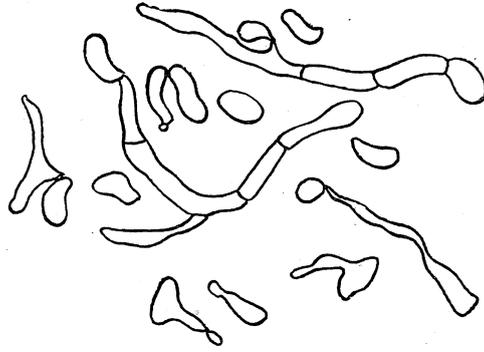


FIG. 2.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. sp.—Células en agar malta a los cinco días a 25° (100 x).

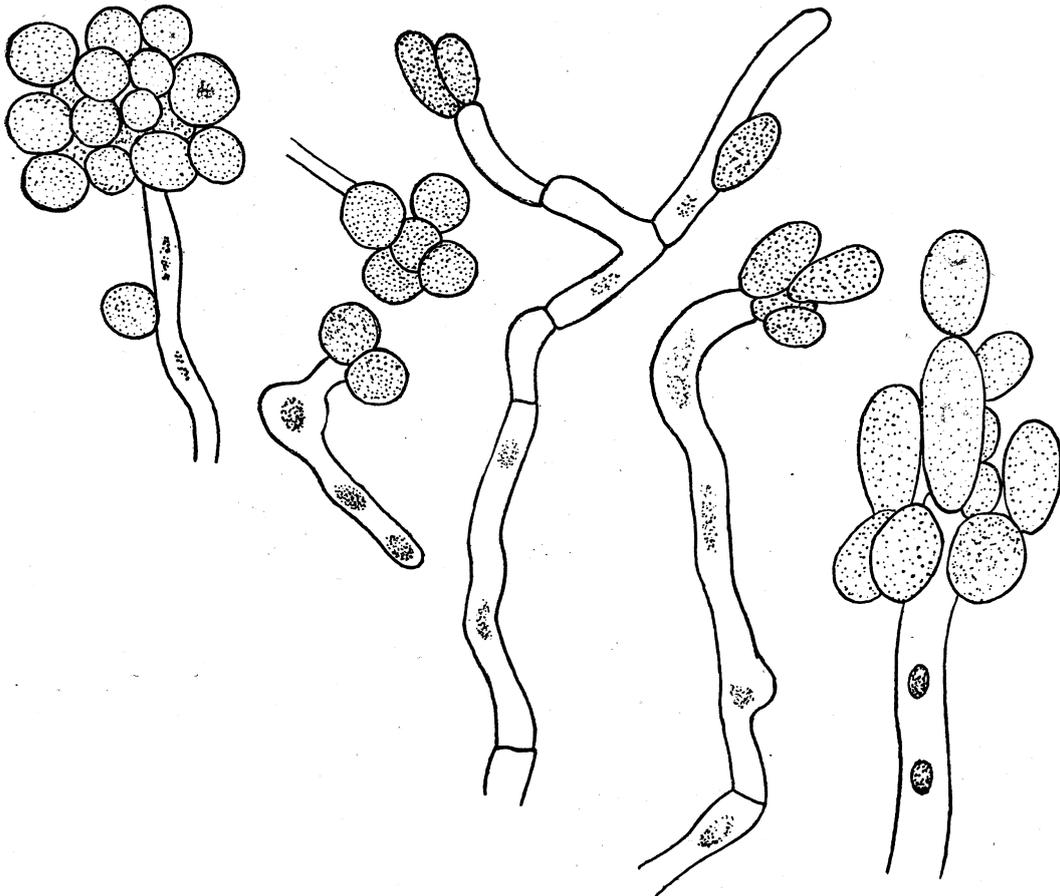


FIG. 3.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. sp.—Racimos de blastosporas y micelio verdadero (1500 x).

Al mes, a 18° C., el velo se vuelve muy grueso, pulverulento, de color rosa salmón, mate, con mucosidad roja en algunos puntos.

Después de un mes, a 18°, la estría es de color rosa salmón a rojo coral, pulverulenta y mucosa en las primeras resiembras, muy rugosa.

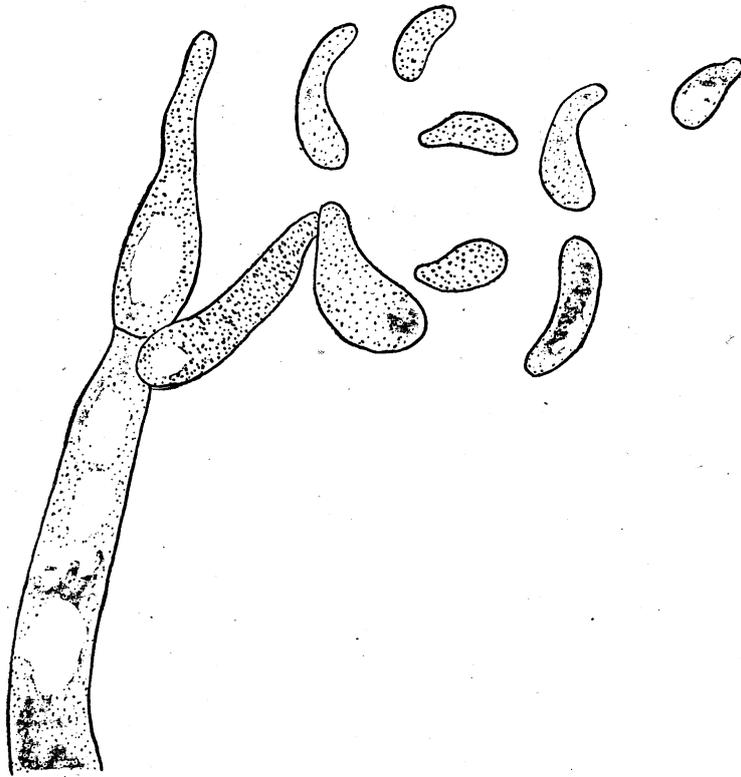


FIG. 4.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. sp.—Micelio verdadero y balles-  
tosporas.

Cultivo sobre porta: sobre agar patata se observa abundante micelio verdadero, con racimos de blastosporas en el extremo de las hifas y también intercalares (fig. 3) (fot. 1 y 2). También se observan balles-  
tosporas reniformes y en forma de plátano (fig. 4) (fot. 3 y 4).

Esporulación: Se desarrollan abundantes esporas que son descargadas por el mecanismo típico de los *Sporobolomyces*.

Fermentación: negativa.

Asimilación de azúcares:	Glucosa	+
	Galactosa	+ ( <i>débil</i> )
	Sacarosa	—
	Maltosa	—
	Lactosa	—
Asimilación de fuentes de N:	Peptona	+
	NO <sub>3</sub> K	+

Asimilación de etanol: positiva, con formación de velo.

Hidrólisis de la arbutina: negativa.

Esta especie ha sido aislada de líquido curtiente compuesto de corteza de encina, procedente de Pola de Siero (Asturias). Se halla en la colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología de Madrid, con el número 402.

#### DIAGNOSIS LATINA

In musto maltato cellulae lungae (1,5-4,5) . (6-30), et mycelium verum. Post dies 5 pellicula nitida, tenuissima. Post unum mensem, 17° C, pellicula, non nitida, crispulata, rosa albida formatur.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C), rosa albida, tenax, crispulata.

Mycelium verum cum blastosporis abundat. Blastosporae reniformae. Fermentatio nulla. In medio minerali cum alcohole aethylico bene crescit et pellicula formatur. Nitras kalicus assimilatur. In medio minerali cum glucoso, galactoso (valde exigue) crescit.

Arbutinum non finditur.

CLAVE DE LAS ESPECIES DEL GENERO *SPOROBOLOMYCES*

- 1 a.—Nitrato potásico asimilado ... .. (2)  
 b.—Nitrato potásico no asimilado ... .. (5)
- 2 a.—Glucosa y galactosa asimiladas; esta última débilmente  
 ..... *Sp. hispanicus nov. sp.*  
 b.—Glucosa y sacarosa asimiladas; galactosa débilmente o no asimilada ... .. (3)  
 c.—Glucosa, sacarosa y maltosa asimiladas; galactosa asimilada débilmente o no asimilada ... .. (4)
- 3 a.—Producen micelio verdadero ... .. *Sp. salmonicolor.*  
 b.—Sin micelio verdadero ... .. *Sp. odorus.*
- 4 a.—Con micelio verdadero ... .. *Sp. holsaticus.*  
 b.—Sin verdadero micelio ... .. *Sp. roseus.*
- 5 a.—Además de la glucosa, sólo asimila a veces débilmente la galactosa ... .. *Sp. gracilis.*  
 b.—Glucosa, galactosa (débilmente), sacarosa y maltosa asimiladas ... .. (6)
- 6 a.—Células ovals, pequeñas (3-5) . (6-11), micras ... ..  
 ..... *Sp. pararoseus.*  
 b.—Células largo ovals a cilíndricas, grandes (4-7). (11-20), micras  
 ..... *Sp. albo-rubescens.*

## BIBLIOGRAFIA

- J. LODDER and N. J. W. KREGER VAN RIJ. The Yeasts. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, 1952.  
 YAMASAKI, ISUE, YUKIO SAMOTURA, TAKEHIKO YAMAMOTO, HISAO FUJII y KENICHI WATANABE. Kyûshû University Fukuoka (Japón), 1952.

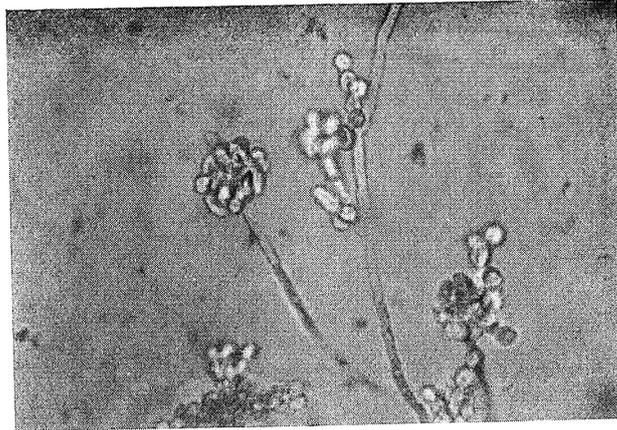


Foto 1.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. s.—Micelio con racimos  
de blastosporas; en agar-patata (400 x).

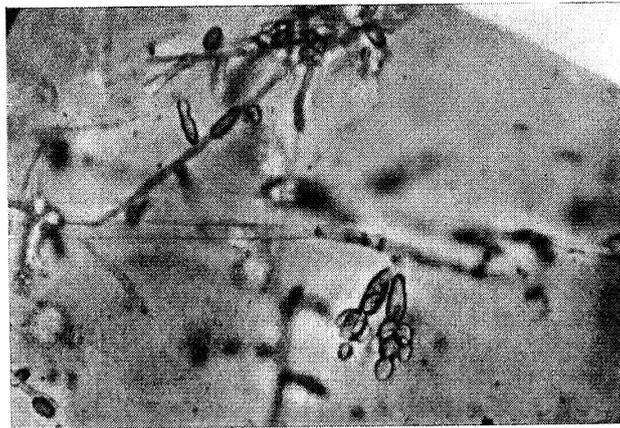


Foto 2.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. s.—Micelio con blastos-  
poras; en agar-patata (400 x).

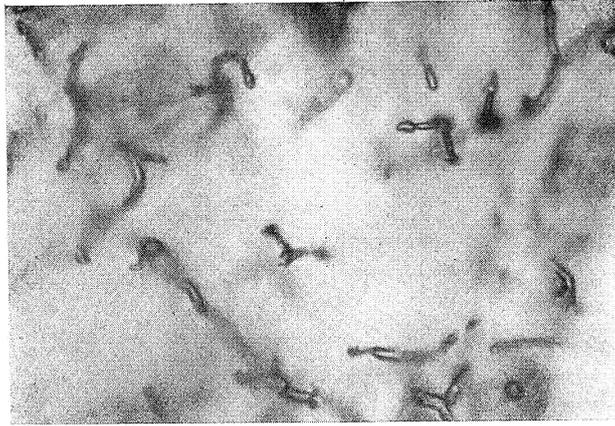


Foto 3.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. s.—Cultivo sobre porta  
en agar-patata. Pueden verse las ballosporae en el ex-  
tremo de esterigmas (400 x).



Foto 4.  
*Sporobolomyces hispanicus*, nov. s.—El mismo cultivo  
de la foto 3, pero en distinto plano (400 x).

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

LA NEUROVACUNA CONSERVA SIEMPRE SUS PRIMITIVAS  
AFINIDADES DERMICAS

POR

E. GALLARDO MARTÍNEZ y A. P. GARCÍA GANCEDO.

Partiendo de un virus testicular lapino de más de 40 pases, hicimos en 1923 nuestros primeros ensayos para conseguir una cepa propia de neurovacuna.

Contra lo que esperábamos, el primer conejo inoculado intracerebralmente presentó al tercer día paresias manifiestas; parálisis, contracturas y dificultad respiratoria al cuarto día, muriendo al quinto con todos los síntomas propios de un proceso encefálico.

Con suspensiones al 1/50.000 de este primer pase se hicieron inoculaciones en piel (Groth), testículo y cerebro en lotes de cuatro conejos, consiguiéndose: pústulas evidentes en piel, típicas orquitis vacunales y muerte de los animales.

Las nuevas comprobaciones efectuadas con el pase noveno dieron el siguiente resultado: En piel, pústulas al 1/100.000; en testículo, esta misma suspensión sólo dió lugar al quinto o sexto día, a ligera reacción inflamatoria, provocando orquitis violentas las suspensiones al 1/40.000 y 1/80.000; en cerebro, de los dos conejos inoculados con la suspensión al 1/100.000, uno muere al octavo día y el otro supervive. Tanto los testículos extirpados como el cerebro del conejo muerto, dieron lugar a pústulas en piel.

Con los pases números 20 y 34 se repitieron las experiencias del pase núm. 9, que demostraron la creciente actividad del virus, ya que el pase 34 dió lugar, con la suspensión al 1/800.000, a pústulas en piel,

y con la al 1/1.000.000, a orquitis ligeras al noveno día, y a muerte al décimo, de uno de los tres conejos inoculados intracerebralmente. Tanto el testículo como el cerebro resultaron virulentos.

Siguiendo los pases directos de cerebro a cerebro, se pudo apreciar por medio de los controles biológicos practicados, que el virus había adquirido su máxima intensidad patógena después del pase 34. En piel, se lograron pústulas evidentes al 1/800.000 y 1/1.000.000. Las inoculaciones se comenzaron en conejos albinos y negros de piel blanca, que fueron los que dieron mejor resultado (1/1.000.000). En los corrientes, aun procurando elegir los de piel menos manchada, los resultados no fueron siempre de tan alto título, mas no dejaron de prender al 1/800.000; en testículo, las reacciones fueron algo tardías (octavo y décimo día), con las suspensiones al 1/800.000 en todos los pases, y más ligeras y en los mismos días con las al 1/1.000.000; en cerebro, todos los conejos inoculados con las suspensiones al 1/800.000 murieron del séptimo al décimo día, y con las 1/1.000.000 supervivieron algunos. Con los que murieron al décimo día se hicieron inoculaciones en piel y testículo que resultaron intensamente positivas.

Como nuestro propósito fué siempre llegar a conocer el valor vacunífero de la neurovacuna en el hombre, hicimos distintos tipos de suspensiones, y con ellas se vacunaron lotes de niños mayores de cuatro meses que fueron rigurosamente sometidos a observación. Los datos estadísticos de positividad no desmerecieron de los obtenidos con nuestras más activas dermovacunas.

De las experiencias realizadas con nuestra primitiva cepa sometida a nuestro control y utilización, durante treinta y dos años, y de las que también realizamos con otras varias aisladas a partir del año 1939, una de las cuales conservamos en su 49 pase de cerebro a cerebro, podemos afirmar que el virus vacunal dérmico de ternera prende desde el primer momento en el cerebro del conejo, si la inoculación se efectúa con un filtrado o centrifugado rico en virus, y que en cuantas cepas aislamos, la máxima intensidad del virus fué adquirida después de 30 pases directos de cerebro a cerebro.

Las condiciones de virus fijo no se pueden definir en neurovacuna por la muerte de los conejos en fecha determinada constantemente repetida, sino que es preciso, a más de esto, haber llegado a un límite de exaltación que no aumente por sucesivos pases, demostrándolo mediante inoculaciones en piel (Groth), testículo y cerebro.

Otro hecho observado en el transcurso de nuestras experiencias que no concuerda con los trabajos de Levaditi y Nicolau, es la igualdad de afinidades por piel, testículo y cerebro, antes y después de haber adquirido el virus su máxima exaltación. Esta igualdad de afinidades no se ha modificado hasta la fecha, como podrá verse en las nuevas experiencias.

También hemos seguido observando los caracteres macroscópicos de las pústulas, su evolución y sus complicaciones, sin haber encontrado diferencias con las dadas a conocer en el primer trabajo. Seguimos igualmente sin encontrar diferencias destacadas en cuanto a patogeneidad, entre la neurovacuna, testivacuna y las pulpas de ternera, siempre que éstas hayan sido inoculadas con semillas muy activas. No obstante, reconocemos que el virus humanizado o de pase embrionario es mucho menos patógeno.

En 1927, los Institutos holandeses trataron de depurar sus linfas de gérmenes extraños al virus, por todos los medios entonces conocidos, con objeto de observar los resultados de la vacunación con linfas puras.

No consiguiendo la completa esterilidad ni por los métodos al fenol y la trypaflavina (Paschen y Gins), ni por el de la eucopinotoxina (Kisteyn), decidieron utilizar la neurovacuna, como prototipo de linfa pura. A petición del Profesor Aldershoff, le fué remitida nuestra cepa, con la que obtuvieron la linfa deseada, y durante los meses de agosto y septiembre del mismo año practicaron por todo el país unas 50.000 neurovacunaciones. Las diluciones empleadas fueron al 1/10 y 1/25; no obstante lo cual, la positividad fué muy satisfactoria. Se apreciaron intensas reacciones locales y varios casos de encefalitis y de vacuna generalizada, sin fenómenos encefalíticos.

Aldershoff no pudo confirmar ninguna afinidad especial de la neurovacuna, por el sistema nervioso central, y contrariamente a lo supuesto, la relativa frecuencia de vacuna generalizada sin fenómenos encefalíticos, parece demostrar un dermatropismo más agudo. Los casos de generalización fueron observados en niños con pústulas de normal intensidad.

Gracias a las vacunaciones practicadas en Holanda con nuestra cepa de neurovacuna, el origen bacterico de la encefalitis post-vacunal, puede darse por excluido casi por completo.

De haber sido ciertas las afirmaciones de algunos investigadores de

que el virus cerebral perdería, después de un número determinado de pases, sus afinidades por la piel. La gran positividad alcanzada por el Profesor Aldershoff, en sus experiencias de vacunación humana con nuestra cepa de neurovacuna, no se hubiese producido, y mucho menos se hubiesen podido observar los casos de generalización.

Durante treinta y dos años, nuestra cepa ha sufrido 588 pases directos de cerebro a cerebro, y con ella ha venido practicándose anualmente en España muchos miles de vacunaciones, sin haberse podido confirmar casos de auténticas encefalitis post-vacunales, ni de generalización de vacuna. Nosotros no podemos negar la posibilidad de que se hayan dado algunos casos que pasasen inadvertidos a la observación de los vacunadores, pero es indudable que de haberse presentado estas complicaciones con la frecuencia que en otros países, las autoridades sanitarias hubiesen tenido noticias de ellas.

La neurovacuna no ha quedado, pues, reducida, como algunos supusieron, a un virus de laboratorio inútil, desde el punto de vista práctico, sino que ha prestado y sigue prestando en España un valioso servicio en la prevención contra la viruela.

#### NUEVAS EXPERIENCIAS

Partimos del pase 588 de nuestra primitiva cepa, conservado en desecación congelada, y del pase 49 de otra cepa aislada en 1940, conservada en las mismas condiciones.

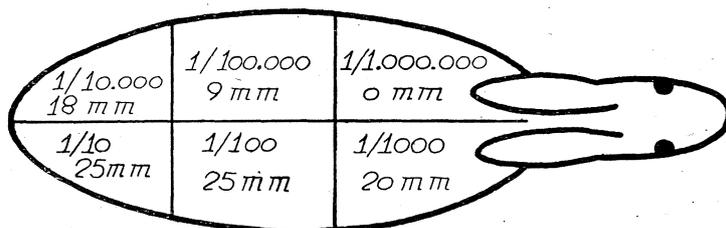
Con estas dos cepas hacemos primeramente una valoración de actividad en piel de conejo, mediante punturas intradérmicas (Groth), con examen de lesiones, y seguidamente inoculaciones testiculares y cerebrales.

##### *Valoraciones en piel.*

Pase 588.—Se hacen suspensiones decimales del 1/10 al 1/1.000.000, con las que se practican punturas intradérmicas (0,20 c. c.), en un conejo de 1.180 grs. de peso (conejo 1.º). La observación, a los cinco días, evidencia la gran patogeneidad de las suspensiones concentradas, que dan

lugar a extensas lesiones de tipo necrótico, en tanto que las altas suspensiones acusan lesiones más pequeñas de tipo inflamatorio. (Véase esquema número 1.)

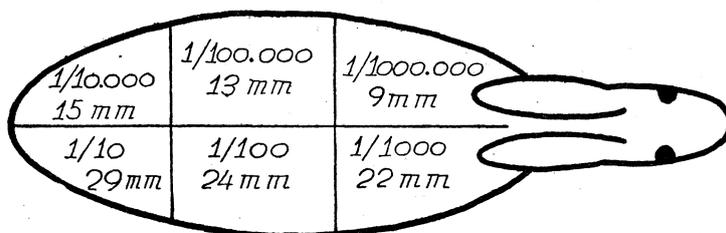
ESQUEMA NUM. I



Conejo 1.º

Esta experiencia, la repetimos en idénticas condiciones en otro conejo de 1.070 grs. de peso y piel menos pigmentada (conejo 2.º). El examen de la punturas, a los cinco días, demuestra una mayor sensibilidad del animal y análogas características lesionales. (Véase esquema núm. II.)

ESQUEMA NUM. II



Conejo 2.º

Pase 49.—Se efectúan punturas intradérmicas con los mismos tipos de suspensiones decimales que las del pase 588. A los cinco días, el tamaño y características de las lesiones son muy semejantes a las observadas en los conejos 1.º y 2.º del pase 588.

*Inoculaciones en testículo.*

Pase 588. — Se hicieron suspensiones al 1/400.000, 1/800.000 y 1/1.000.000, con las que se inocularon (0,20 c. c.), tres conejos de 1.600, 2.100 y 2.050 grs. de peso, respectivamente.

En el conejo inoculado con la primera de las suspensiones se aprecia al quinto día una intensa reacción inflamatoria testicular. Se extirpa al octavo día.

La inoculación con la segunda suspensión no da lugar a reacción inflamatoria testicular al quinto día. Se extirpa al octavo día sin orquitis aparente.

La inoculación con la tercera suspensión da lugar a una reacción testicular muy apreciable algo tardía (séptimo día). Se extirpa al octavo día.

Los tres testículos se trituraron separadamente en mortero con arena, suspendiéndolos al 1/10 en solución salina, y una vez comprobada su esterilidad bacteriana, se almacenan en nevera.

Pase 49.—Se realizan las inoculaciones con las mismas cantidades y tipos de suspensiones empleadas con el pase 588.

Suspensión al 1/400.000; se inoculó un conejo de 2.900 grs. de peso, que presentó al cuarto día una orquitis intensa. Se extirpó al cuarto día.

Suspensión al 1/800.000; se inoculó un conejo de 1.800 gramos de peso, que a los cuatro días presentaba una intensa reacción inflamatoria testicular. Se extirpa a los cuatro días.

Suspensión al 1/1.000.000; se inoculó un conejo de 2.100 gramos de peso, que presentó a los seis días una moderada reacción inflamatoria local. Se extirpó a los siete días. Los testículos se almacenan en las mismas condiciones que los de la experiencia anterior.

*Inoculaciones en cerebro.*

Pase 588.—Se utilizan los mismos tipos de suspensión y las mismas dosis que en las experiencias anteriores.

Suspensión al 1/400.000; se inoculó un conejo de 1.370 gramos de

peso, que presentó parálisis al cuarto día, muriendo al quinto. Se extrae el cerebro al quinto día.

Suspensión al 1/800.000; conejo de 1.300 grs. de peso. Muere y se extrae el cerebro al quinto día.

Suspensión al 1/1.000.000; conejo de 1.320 grs. de peso. Muere y se extrae el cerebro al quinto día.

Los cerebros son triturados separadamente en frascos con perlas de vidrio y suspendidos al 1/10 en solución salina, y una vez comprobada su pureza por siembras en caldo común y agar sangre, se almacenan en nevera.

Pase 49.—Se inoculan tres conejos de 1.320, 1.850 y 1.280 gramos de peso, con las suspensiones 1/400.000, 1/800.000 y 1/1.000.000, respectivamente, y dosis ya indicadas en anteriores experiencias.

El conejo inoculado con la primera de las suspensiones presenta convulsiones y parálisis al quinto día, muriendo al sexto, en que se extrae el cerebro. El conejo inoculado con la segunda suspensión se sacrifica al sexto día en fase paralítica y se extrae el cerebro seguidamente. Y el conejo inoculado con la tercera suspensión, se sacrifica al sexto día en fase preagónica, y se extrae el cerebro.

Los cerebros se trituran y suspenden en las mismas condiciones que las del pase 588, y se almacenan en nevera, previa comprobación de pureza.

*Determinación del poder patógeno en piel de conejo de los testículos inoculados con los pases 588 y 49.*

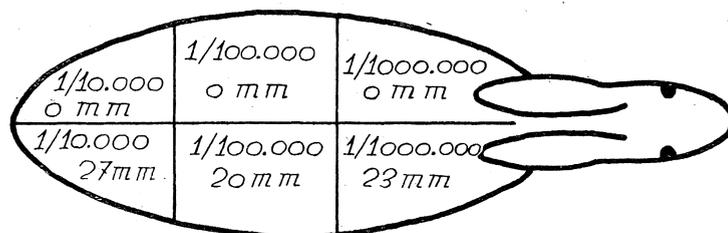
Con cada uno de los testículos I, II y III de las dos cepas, se hacen suspensiones al 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, efectuando con ellas punturas intradérmicas en piel de conejo.

Cepa 1.<sup>a</sup> Pase 588.—Conejo de 1.900 grs. de peso, inoculado con suspensiones de testículos II y III.

Las punturas practicadas con las suspensiones de testículo II, que presentó muy poca reacción inflamatoria, fueron totalmente negativas, en tanto que las efectuadas con el III, de buena reacción inflamatoria,

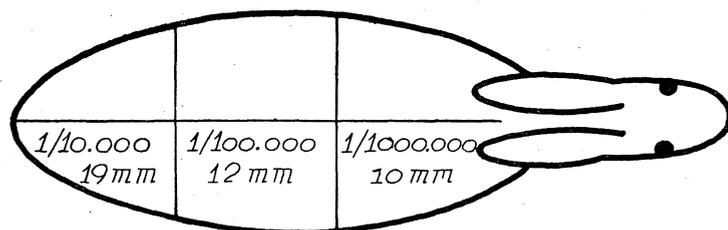
dieron lugar a grandes lesiones de tipo ligeramente necrótica, la correspondiente a la suspensión al 1/10.000. (Véase esquema núm. III.)

ESQUEMA NUM. III

*Testículo II**Testículo III*Cepa 1.<sup>a</sup> Pase 588.

En otro conejo de 1.890 grs. de peso se inoculan las suspensiones del testículo I, que se extirpó con buena reacción inflamatoria. El tamaño de las lesiones fué menor que las del testículo III, observándose el mismo carácter ligeramente necrótico de la puntura efectuado con la suspensión al 1/10.000. (Véase esquema núm. IV.)

ESQUEMA NUM. IV

*Testículo I*Cepa 1.<sup>a</sup> Pase 588.

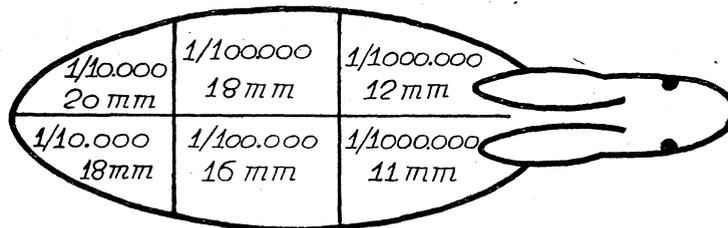
Cepa 2.<sup>a</sup> Pase 49.—Se procede en la misma forma que en la experiencia anterior.

Conejo de 1.370 grs. de peso. Se inocula con suspensiones de testícu-

los III y II. El tamaño de las lesiones fué muy semejante, apreciándose en todas las punturas necrosis más o menos intensas. (Véase esquema número V.)

ESQUEMA NUM. V

*Testículo III*

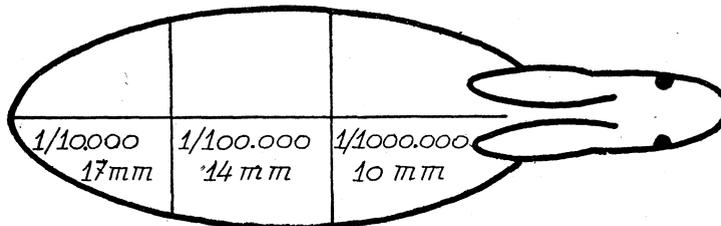


*Testículo II*

Cepa 2.<sup>a</sup> Pase 49.

Las suspensiones del testículo I se inoculan en un conejo de 1.570 gramos de peso. El tamaño de las lesiones y sus características son semejantes a las apreciadas en las suspensiones de los testículos II y III. (Véase esquema núm. VI.)

ESQUEMA NUM. VI



*Testículo I*

Cepa 2.<sup>a</sup> Pase 49.

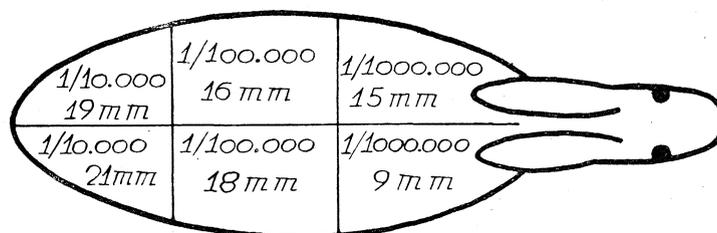
*Determinación del poder patógeno en piel de conejo de los cerebros inoculados con los pases 588 y 49.*

Se procede en la misma forma ya indicada en las inoculaciones con las suspensiones testiculares.

Cepa 1.<sup>a</sup> Pase 588.—Conejo de 1.410 grs. de peso, inoculado con suspensiones de los cerebros I y II. (Véase esquema número VII.)

ESQUEMA NUM. VII

Cerebro I



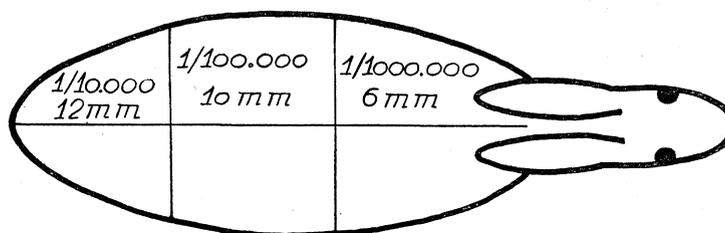
Cerebro II

Cepa 1.<sup>a</sup> Pase 588.

Conejo de 1.890 grs. de peso, inoculado con suspensiones del cerebro III. (Véase esquema núm. VIII.)

ESQUEMA NUM. VIII

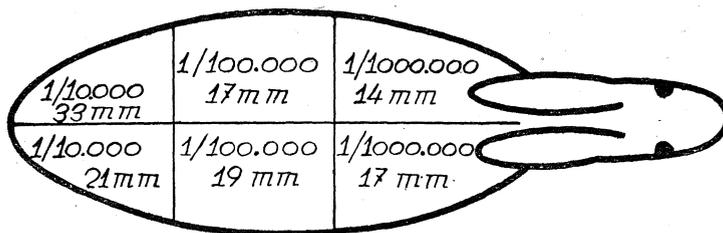
Cerebro III

Cepa 1.<sup>a</sup> Pase 588.

Cepa 2.<sup>a</sup> Pase 49.—Repetimos exactamente lo realizado en la experiencia anterior con dos conejos de 1.435 y 1.340 grs. de peso, en los que se apreciaron lesiones de las mismas características y de los tamaños consignados en los esquemas núms. IX y X.

ESQUEMA NUM. IX

Cerebro I

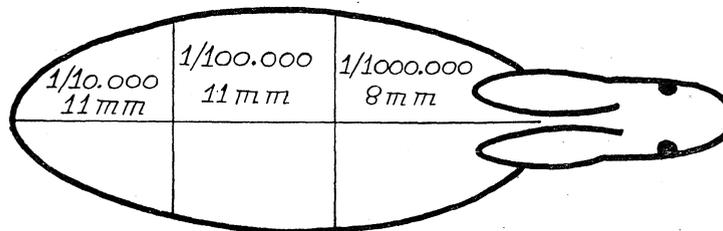


Cepa 2.<sup>a</sup> Pase 49

Cerebro II

ESQUEMA NUM. X

Cerebro III



Cepa 2.<sup>a</sup> Pase 49

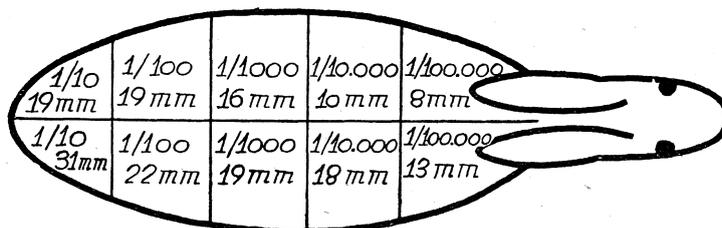
*Acción de la temperatura sobre las dos cepas de neurovacuna y una de dermovacuna de ternera muy activa.*

Se hicieron suspensiones al 1/10 de los pases 588 y 49 de neurovacuna y de una pulpa dérmica de ternera (89), que se colocaron en estufa a 37 grados durante veinticuatro horas. Pasado este tiempo, de las suspensiones madres (al 1/10), se hacen otras al 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000, que se inoculan en punturas intradérmicas en

un conejo de 2.000 grs. de peso. Las correspondientes al pase 588 de neurovacuna, en uno de los flancos y en el opuesto las de pulpa de ternera número 89. (Véase esquema núm. XI.)

ESQUEMA NUM. XI

Pase 588



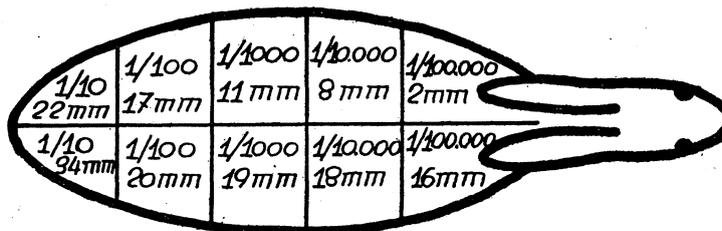
Ternera 89

Resistencia a la temperatura (24 horas)

En otro conejo de 2.100 grs. de peso se inoculan las suspensiones correspondientes al pase 49 de neurovacuna y las de pulpa dérmica de ternera núm. 89. (Véase esquema núm. XII.)

ESQUEMA NUM. XII

Pase 588



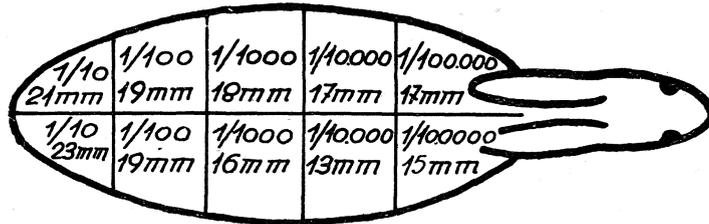
Ternera 89

Resistencia a la temperatura (24 horas)

Las suspensiones de los pases 588 y 49 de neurovacuna se inoculan para su comparación en otro conejo de 1.400 grs. de peso. (Véase esquema núm. XIII.)

ESQUEMA NUM. XIII

Pase 49



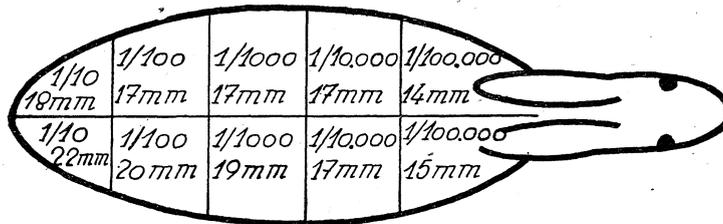
Pase 588

Resistencia a la temperatura (24 horas)

Después de cuarenta y ocho horas a 37 grados, se repiten las experiencias anteriores en conejos de 1.300, 1.450 y 1.320 gramos de peso, respectivamente, con los resultados que pueden verse en los esquemas correspondientes. (XIV, XV y XVI.)

ESQUEMA NUM. XIV

Pase 49

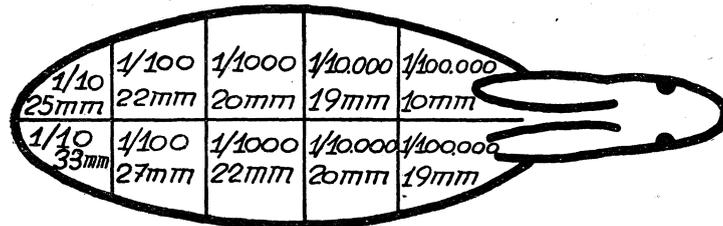


Pase 588

Resistencia a la temperatura (48 horas)

ESQUEMA NUM. XV

Pase 49

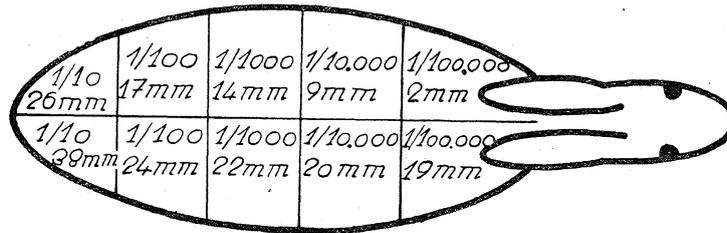


Ternera 89

Resistencia a la temperatura (48 horas)

## ESQUEMA NUM. XVI

Pase 49



Ternera 89

Resistencia a la temperatura (48 horas)

Es indudable que tanto las dos cepas de neurovacuna como la dérmica de ternera, resistieron bien la temperatura de 37 grados C. durante veinticuatro y cuarenta y ocho horas. Sin diferencias acusadas entre las dos cepas de neurovacuna, y muy apreciables, comparándolas con la dérmica de ternera núm. 89.

## CONCLUSIONES

De todas las experiencias practicadas y de los datos obtenidos en distintas campañas de vacunación antivariólica, se deducen las siguientes conclusiones:

1.<sup>a</sup> La cepa de neurovacuna aislada por nosotros en 1923, que ha sufrido 588 pases consecutivos de cerebro a cerebro, continúa conservando las mismas propiedades de patogeneidad y de riqueza en virus, puestas de manifiesto en las experiencias efectuadas con el pase 34.

2.<sup>a</sup> El virus vacunal, después de tan larga serie de pases cerebrales, no demuestra una afinidad especial por el sistema nervioso (neurotropismo).

3.<sup>a</sup> La conservación de su originaria afinidad dérmica (dermotropismo) se evidencia por el resultado de las inoculaciones en piel de conejo y por su gran positividad en las vacunaciones humanas.

4.<sup>a</sup> Comparada nuestra primitiva cepa con otra aislada posteriormente y de 49 pases, no se aprecian diferencias acusadas en su patogeneidad, riqueza de virus y afinidades.

5.<sup>a</sup> Los tejidos dérmico, testicular y cerebral, muestran la misma sensibilidad al ser inoculados con las suspensiones cerebrales de las dos cepas.

6.<sup>a</sup> Después de un determinado número de pases cerebrales, el virus adquiere las características de virus fijo, sin perder en lo más mínimo sus primitivas afinidades dérmicas.

7.<sup>a</sup> La resistencia a la temperatura entre las dos cepas de neurovacuna es muy semejante.

8.<sup>a</sup> La cepa dérmica de ternera núm. 89 es sin duda alguna más resistente a la temperatura de 37 grados C. que las de neurovacuna estudiadas.

9.<sup>a</sup> En las numerosas campañas de vacunación en que nosotros hemos intervenido, no pudimos confirmar caso alguno de encefalitis postvacunal ni de vacuna generalizada.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALDERSHOFF. Ann. Inst. Pasteur, 1929, 43, 1.198.  
ALDERSHOFF. N. T. G., 1928, 1, 1.198.  
GALLARDO, E. Arch. Inst. Alfonso XIII, 1924.  
GALLARDO, E. Arch. Inst. Alfonso XIII, 1926.  
GALLARDO, E. Medicina de los Países Cálidos. Octubre, 1928.  
GINS. Zeit. f. Hyg., 1924, 51, 339.  
ILLERA Y GALLARDO. Arch. Inst. Alfonso XIII, 1922.  
KIRSTEIN. Zeit. f. Hyg., 1924, 103,584.  
LEVADITI, HARVIER Y NICOLAU. C. R. Soc. Biol., 1921, 85,345.  
LEVADITI Y NICOLAU. C. R. de l'Acad. des Ss., 1922, 174.  
LEVADITI Y NICOLAU. C. R. Soc. Biol., 1923, 83.  
LEVADITI Y NICOLAU. Ann. Inst. Pasteur, 1923, 37, 1, 164,174.  
LEVADITI. Les ectodermoses neurotropes. París, 1923 (77).

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

ESTUDIO CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE ALGUNAS ESTIRPES DE *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

POR

R. BELTRÁ

En el presente trabajo hemos hecho un estudio con el microscopio electrónico, de algunas estirpes de *Ps. savastanoi*. Se han estudiado el *Ps. savastanoi* 2 (4), 12 (3), 14 (4), aisladas por nosotros; *Ps. savastanoi* 64 y *Ps. pisi* 123, procedentes de la colección del Dr. W. J. Dowson, de la «National Collection of Plant Pathogen. Botany School. Cambridge» y *Ps. savastanoi* 206 y 208, aisladas por la doctora D'Oliveira (Portugal).

PARTE EXPERIMENTAL

Al hacer la preparación de los pseudomonas para su observación con el microscopio electrónico, hemos tenido en cuenta que el número y longitud de los flagelos varía con el tiempo y medios de cultivo empleados y también que las bacterias que crecen sobre medios sólidos tienen los flagelos más cortos que aquellas que crecen en medio líquido. Asimismo se ha tenido en cuenta que las bacterias de cultivos viejos pueden mostrar flagelos más largos que las de cultivos jóvenes.

Hemos partido de cultivos de doce a setenta y dos horas, en tubos de agar-glucosado inclinado, y en general la técnica seguida ha tendido a solucionar, en la preparación de la suspensión, el problema de que las bacterias que estudiamos crecen generalmente embebidas en una sustancia viscosa, y que sus flagelos son extremadamente lábiles. Por esta razón, para la preparación de la suspensión bacteriana se ha procedido a llenar de agua estéril el tubo que contiene el cultivo de la bacteria y

dejarlo en reposo 10', tiempo en el cual las bacterias, sin deteriorar sus flagelos, quedan en suspensión. Pero habiendo visto que por este procedimiento se logra una masa indiferenciada cuando se observa con el microscopio electrónico, se procedió a centrifugar cinco minutos a 3.500 revoluciones por minuto, resuspender en agua destilada estéril, haciendo después las diluciones necesarias de esta suspensión ayudados con pipeta Pasteur.

La suspensión de los microorganismos es llevada sobre la membrana de colodion. Cuando la superficie de este film se evapora, obtenemos sobre la membrana un área circular, que contiene bien dispersas las células bacterianas aisladas.

Las preparaciones se someten luego al sombreado. En la técnica del sombreado hemos empleado un vaporizador de alto vacío, modelo Philips, accesorio del microscopio electrónico, que produce un vacío del orden de  $10^{-5}$  mm. de Hg. El metal que más frecuentemente se ha vaporizado es una aleación de paladio-oro, aunque también se han usado paladio, cromo puro, etc.

Se siguió el proceso corriente en el sombreado, y el valor del ángulo de sombra se reguló variando los parámetros de distancia y altura de la preparación con respecto al foco emisor. La pendiente utilizada en

el presente trabajo ha sido empleando primeramente la relación  $\frac{1}{3}$ , y posterior y definitivamente, la de  $\frac{1}{4}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Ps. savastanoi* 2 (4).

Formas bacilares  $2,3 \times 0,7$  micras (fot. 1).

Aisladas o unidas por un extremo.

Flagelo polar recto.

Cultivo de 12 horas en agar-glucosado.

### *Ps. savastanoi* 12 (3).

Formas bacilares  $2,7 \times 0,6$  micras (fot. 2).

Bacteria en fase de división, apreciándose tabique de separación y restos de citoplasma.

Restos de flagelo polar.

Cultivo de 72 horas en agar-glucosado.

Formas bacilares  $2,5 \times 0,5$  micras (fot. 3).

Formas cocobacilares  $1,4 \times 0,7$  micras, que se encuentran en fase de división.

Flagelo polar recto.

Cultivo de 24 horas en agar-glucosado.

*Ps. savastanoi* 12 (14).

Formas bacilares  $3 \times 0,7$  micras (fot. 4).

Dos o más flagelos polares curvados, unidos, formando un haz.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Formas bacilares  $3,5 \times 1$  micras (fot. 5).

Se observa claramente la membrana citoplasmática.

Restos de un flagelo polar, que parece salir del citoplasma.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Formas bacilares  $1,5 - 2 \times 0,5 - 0,7$  micras (fot. 6).

Membrana citoplasmática; en la parte central se observa una célula con gránulos, probablemente gránulos de volutina o mitocondrias de Mudd.

Flagelo polar terminal que parece emerger del citoplasma.

Cultivo de 24 h. en agar-glucosado.

Formas cocobacilares  $1,8 \times 0,7$  micras, en estado de división (fot. 7).

Hay tabique de separación.

Restos de flagelos polares, uno de ellos lateral.

Cultivo de 24 h. en agar-glucosado.

*Ps. savastanoi* 64.

Formas bacilares con flagelo polar lateral, curvado y grueso (fot. 8).

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Forma cocobacilar  $1,2 \times 0,6$  micras (fot. 9).

Superficie celular cóncava.

Cultivo de 24 h. en agar-glucosado.

*Ps. savastanoi 206.*

Formas cocobacilares  $3 \times 0,7$  micras (fot. 10).

Flagelo polar con dos curvas.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Formas bacilares  $4 \times 0,5-0,7$  micras (fot. 11).

Se observa la membrana citoplasmática, y zonas destruídas por el bombardeo de electrones, que coinciden probablemente con las partes más débiles de la estructura celular.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Dos formas bacilares  $2,7 \times 0,7$  micras, unidas por un extremo (fot. 12).

Se observa claramente la membrana citoplasmática.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

*Ps. savastanoi 208.*

Formas bacilares  $2 \times 0,8$  micras (fot. 13).

Tres flagelos polares rectos, unidos parcialmente, formando un haz.

Inserción de los flagelos en la célula por puntos diferentes.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Forma cocobacilar  $1,5 \times 0,9$  micras (fot. 14).

Flagelo polar recto.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

Formas bacilares  $2 \times 0,7$  micras (fot. 15).

Flagelo polar recto y grueso.

Cultivo de 12 h. en agar-glucosado.

*Ps. pisi 123.*

Formas bacilares  $1,3 \times 0,3$  micras (fot. 16).

Células unidas en fase de división. En la célula de la parte superior, la cromatina emigró a los polos de la bacteria, y está parcialmente unida por el citoplasma. En la célula inferior ya se ha separado casi por completo el citoplasma y se ven restos de membrana.

Cultivo de 24 h. en agar-glucosado.

Anteriormente se han resumido los resultados obtenidos con las distintas estirpes de *Ps. savastanoi* y *Ps. pisi*.

En el «Bergey's Manual» al *Ps. savastanoi* se le asigna forma bacilar normal de  $0,4 - 0,8 \times 1,2 - 3,3$ . En nuestras electronografías hemos observado que esta bacteria no se presenta solamente con forma bacilar, sino que hay formas cocobacilares, flageladas, de tamaño  $1 \times 0,5$ , y que suponemos se deben a una forma del estado de división celular.

Hemos encontrado en el *Ps. savastanoi* diferente número de flagelos que oscilan de 1 a 3; en todas las bibliografías, a estas bacterias se les asignan flagelos polares. Nosotros hemos encontrado flagelos polares y otros que emergen lateralmente del cuerpo de la célula.

El origen lateral de los flagelos y los flagelos anfítricos se pueden explicar, según J. W. Bartholomew (1949), mediante la teoría de la «degeneración flagelar» de Conn (1920-1938-1940-1947), según la cual todas las células bacterianas fueron en un principio móviles periféricas, por lo tanto, esas células monótricas o lofótricas han perdido solamente la habilidad de producir flagelos en ciertas áreas, quedando cualquier área de la célula capacitada para producir un flagelo.

Nosotros hemos encontrado mayoría de flagelos polares, pero también hemos observado algunos flagelos de origen lateral. Hemos observado un flagelo polar terminal y otro lateral en un *Ps. savastanoi* de forma cocobacilar. Los flagelos de estas bacterias parecen arrancar individualmente del cuerpo del bacilo, y en algunas electronografías parece apreciarse que el flagelo emerge del protoplasma celular. En su mayoría, estos flagelos no se encuentran aislados unos de otros, sino que se reúnen formando un haz, dando la apariencia de un flagelo más grueso.

Para algunos autores, E. Leifson (1951), el grado de curvatura del flagelo parece ser de importancia, independientemente de su longitud, asignando a las bacterias del género *Pseudomonas* dos curvas. Nosotros hemos encontrado en estas bacterias una mayoría de flagelos rectos, habiendo encontrado también flagelos con una, dos y más curvas.

## CONCLUSIONES

1. La observación con el microscopio electrónico de las distintas estirpes de *Ps. savastanoi* señala que, junto a la forma bacilar normal con flagelos polares, se encuentran formas de menor tamaño con tenden-

cia a la forma cocobacilar, que se supone es debida a que la bacteria está en una fase de división celular. Estas formas están provistas de flagelos.

2. Las medidas efectuadas sobre las electronografías dan un término medio de tamaño  $3 \times 0,5$  micras, con un mínimo de  $1,5 \times 0,5$  micras y un máximo de  $3,5 \times 1$  micras, para las células normales y de  $1 \times 0,5$  micras como término medio en las formas cocobacilares.

3. Los flagelos parecen arrancar individualmente del cuerpo del bacilo, y no todos ellos en común del mismo punto, teniendo cierta tendencia a estar unidos formando un haz.

4. Aunque en su mayoría hemos visto flagelos polares, hemos observado también flagelos polares laterales.

5. La curvatura de los flagelos parece ser un dato variable en el *Ps. savastanoi*.

Este trabajo se ha realizado con un microscopio electrónico RCA, modelo MU2A., del Instituto de Optica «Daza de Valdés».

Deseo expresar mi gratitud al Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal y al Patronato «Alonso de Herrera», del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por la beca concedida, que me ha permitido llevar a cabo estas investigaciones, así como al jefe de la Sección, profesor don Lorenzo Vilas, bajo cuya dirección se han efectuado. También quiero hacer constar mi agradecimiento a los doctores M. Rubio, F. Catalina y A. Camuñas por su valiosa ayuda.

#### RESUMEN

En este trabajo se ha hecho un estudio con el microscopio electrónico del *Pseudomonas savastanoi*, observándose la presencia de formas cocobacilares y la tendencia de los flagelos a permanecer unidos formando un haz. Se ha visto también el punto de salida de los flagelos y el origen de algunos de ellos, haciéndose observaciones sobre su curvatura.

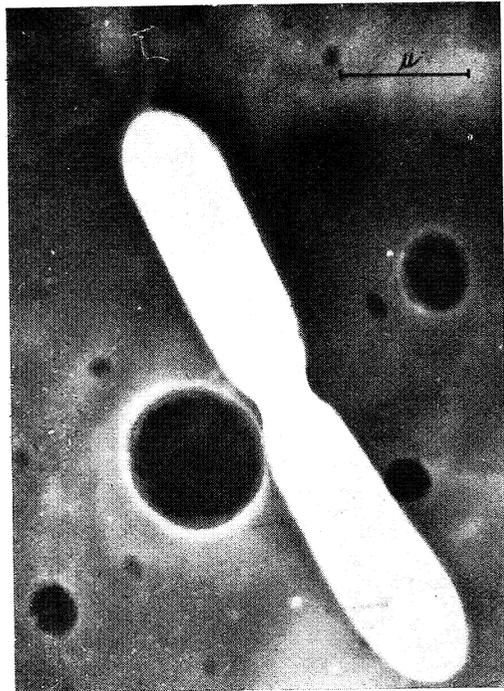
#### SUMMARY

In this paper a study by the electronic microscope of the *Pseudomonas savastanoi* is described. It has been possible to observe the pre-

sence of coccobacillus and the tendency of the flagella to stay together in a bundle. Some observations have been made about the curvature and lateral origin of the flagella.

## BIBLIOGRAFIA

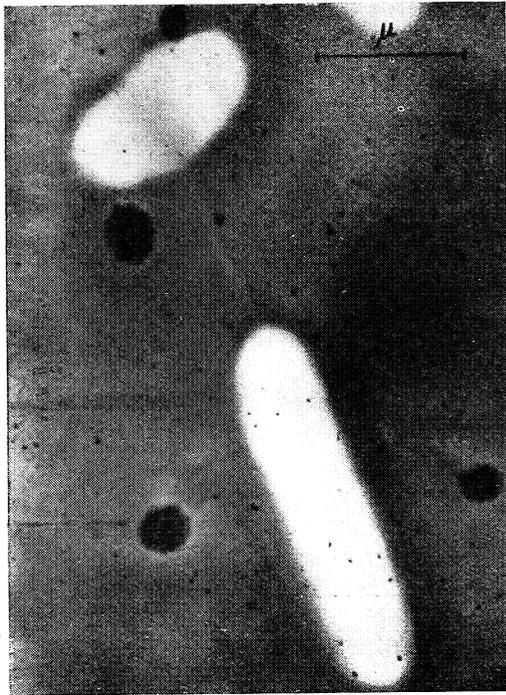
- BARTHOLOMEW, J. W. 1949. Flagellation of certain species of *Pseudomonas* as seen with the electron microscope. J. Gen. Microbiol. 3:340.
- BERGEY'S. Manual of determinative bacteriology, 1948. Sixth Edition, pp. 119-125-132-133, by Breed, Murray and Hitchens.
- CONN AND BREED. 1920. A suggestion as to the flagellation of the organism causing legume nodules. Science 51:391.
- CONN AND WOLFE. 1938. The flagellation of bacteria. Science 87:283.
- CONN, WOLFE AND FORD. 1940. Taxonomic relationships of *Alcaligenes* spp. to certain soil saprophytes and plant parasites. J. Bact. 39:207.
- CONN AND ELROD. 1947. Concerning flagellation and motility. J. Bact. 54:681.
- KNAYSI, G. 1951. Elements of bacterial cytology. II Edition, pp. 63-199-202.
- LEIFSON, E. 1951. Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. 62:377.
- MALLET, KOFFLER AND RINKER. 1951. The effect of shaking of bacterial flagella and motility. J. Bact. 61:703.
- MUDD AND SMITH. 1950. Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei. J. Bact. 59:561.
- MUDD, BRIDIE, WINTERSCHIED, HARTMAN, BEUTNER AND MC. LEAN. 1951. Further evidence of existence of mitochondria in bacteria. J. Bact. 62:729.
- RINKER, J. N., AND KOFFLER. 1951. Preliminary evidence that bacterial flagella are not «polysaccharide twirls». J. Bact. 61:421.
- The practice of electron microscopy. Marzo 1950. Journal of the Royal Microscopical Society.



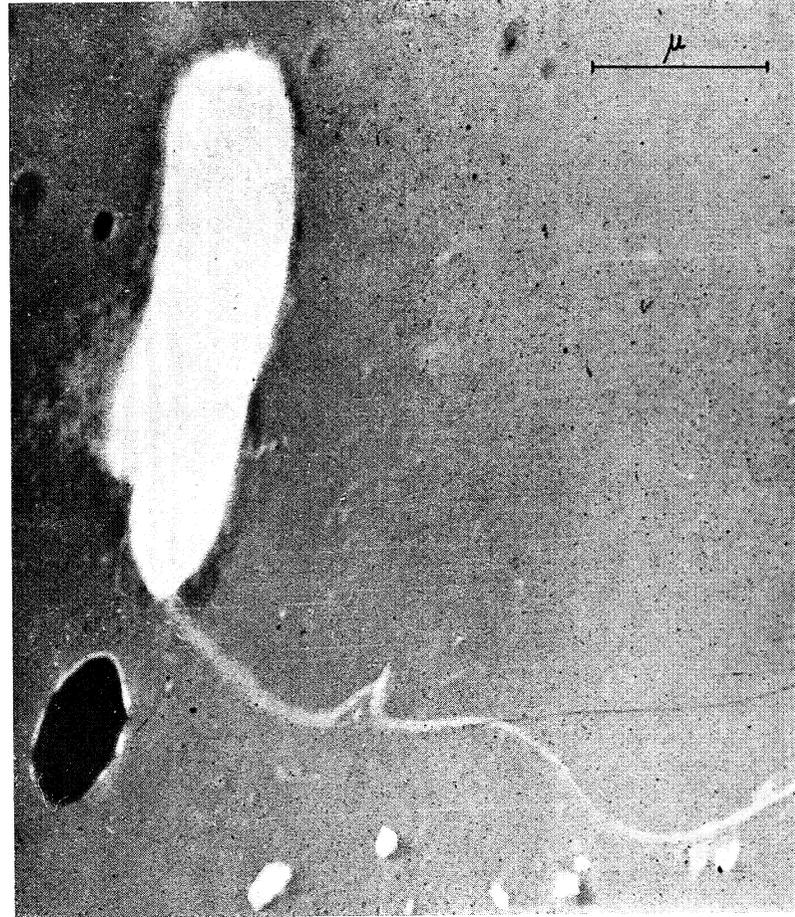
For. 1.  
*Ps. savastanoi* 2 (4). × 17.000. Cultivo 12h.  
Negativo.



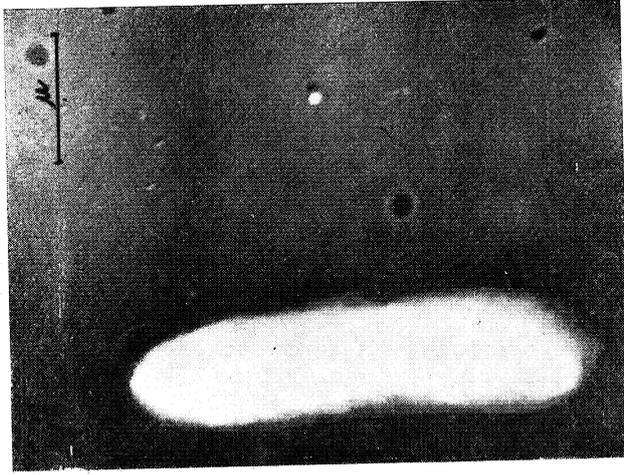
For. 2.  
*Ps. savastanoi* 12 (3). × 19.000. Cultivo 72h.



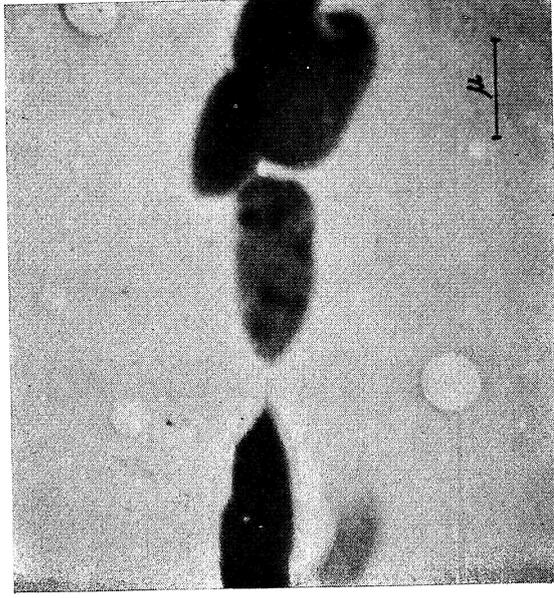
FOT. 3.  
*Ps. savastanoi* 12 (3).  $\times$  20.000. Cultivo 24h.



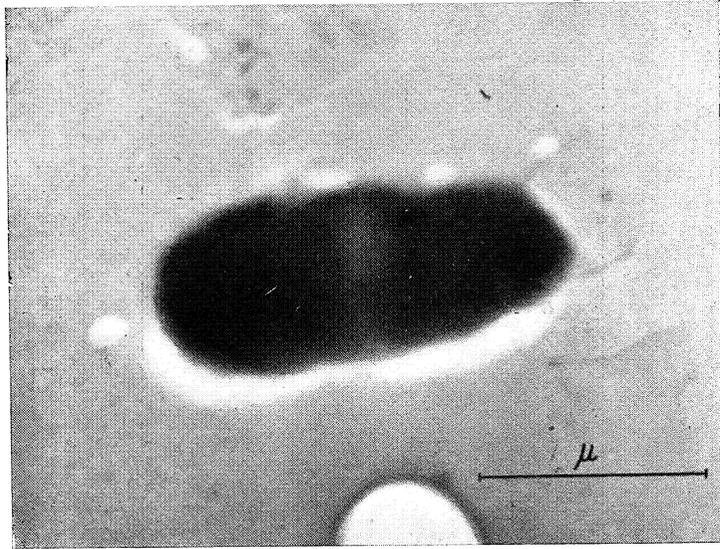
FOT. 4.  
*Ps. savastanoi* 12 (14).  $\times$  23.000. Cultivo 12h. Negativo.



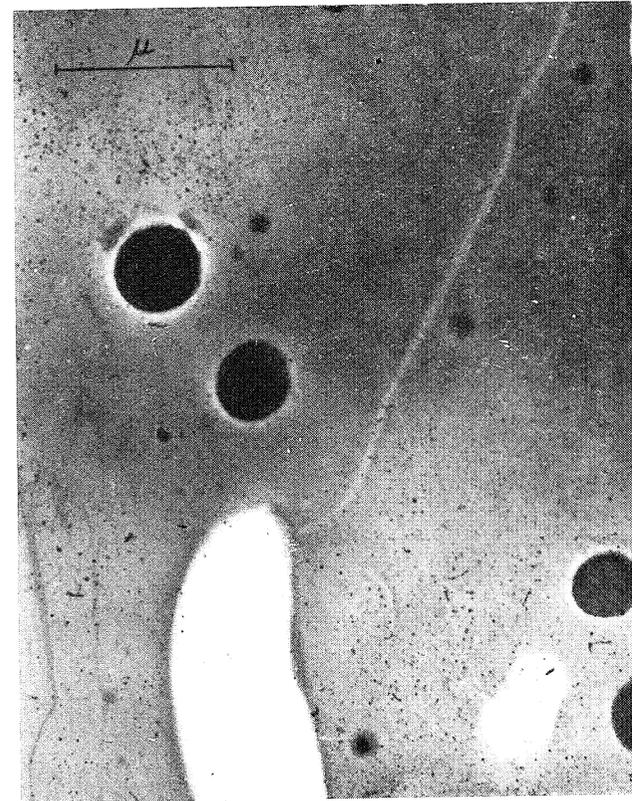
For. 5.  
*Ps. savastanoi* 12 (14). Cultivo 12h. Ne-  
gativo.



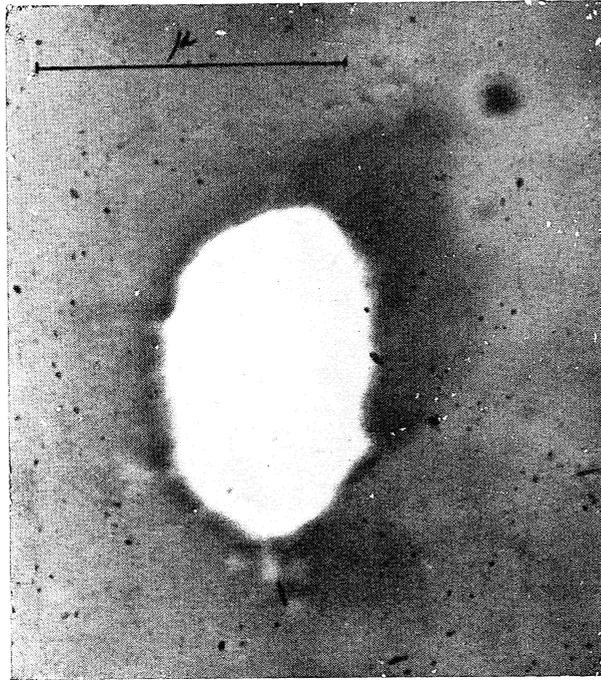
For. 6.  
*Ps. savastanoi* 12 (14). × 13.000. Cultivo 24h.



FOT. 7.  
*Ps. savastanoi* 12 (14).  $\times 30.000$ . Cultivo 12h



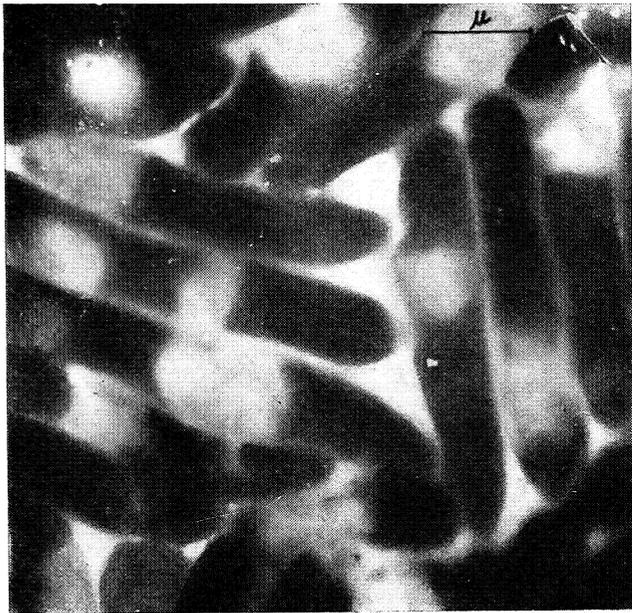
FOT. 8.  
*Ps. savastanoi* 64.  $\times 23.000$ . Cultivo 12h. Negativo.



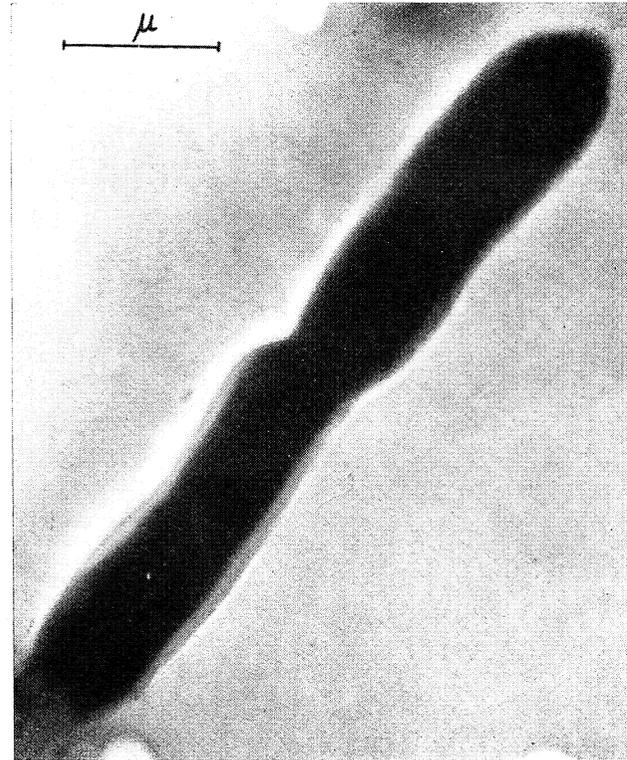
FOT. 9.  
*Ps. savastanoi* 64.  $\times$  40.000. Cultivo 24h. Negativo.



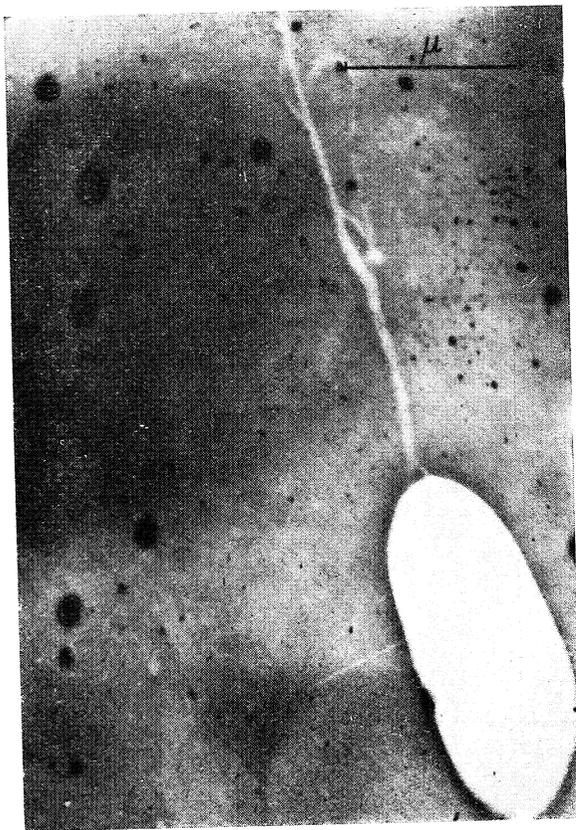
FOT. 10.  
*Ps. savastanoi* 206.  $\times$  19.000. Cultivo 12h.



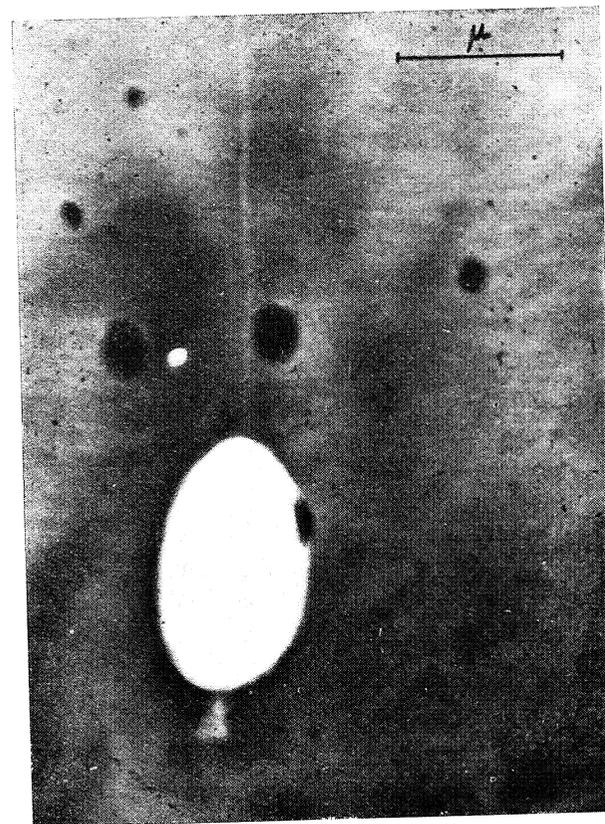
FOT. 11.  
*Ps. savastanoi* 206.  $\times$  14.000. Cultivo 12h.



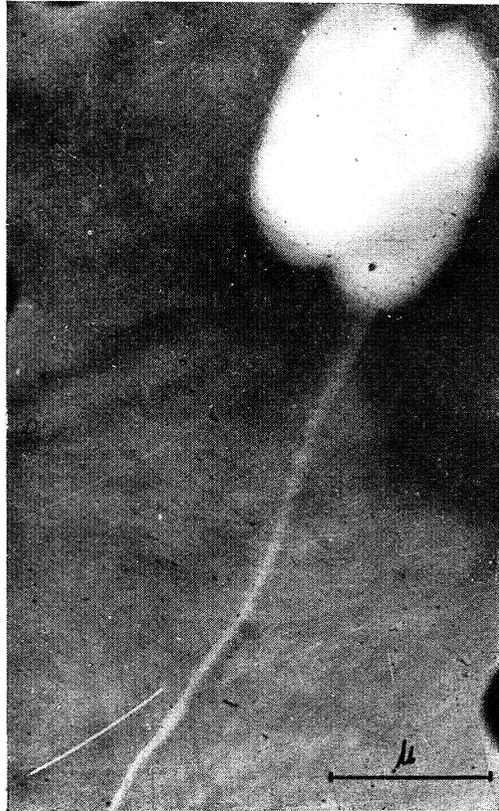
FOT. 12.  
*Ps. savastanoi* 206.  $\times$  21.000. Cultivo 12h.



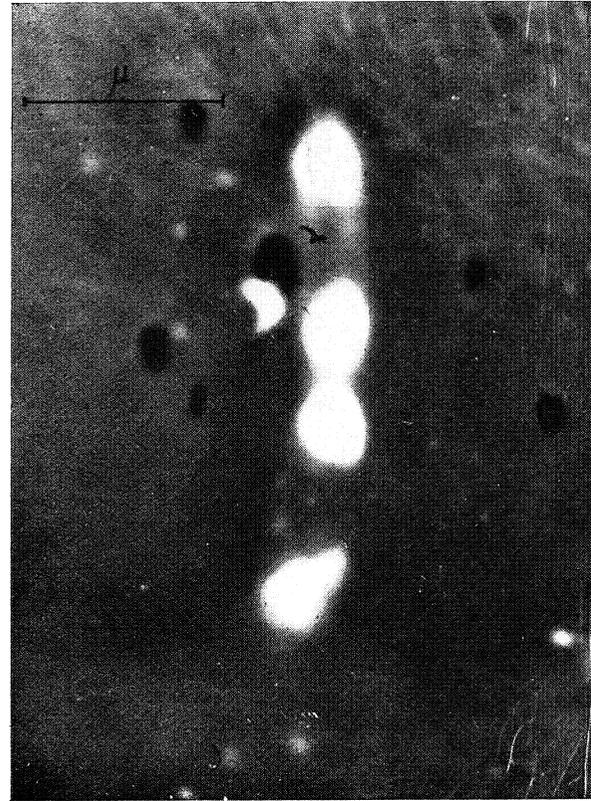
For. 13.  
*Ps. savastanoi* 208.  $\times$  23.000. Cultivo 24h. Negativo.



For. 14.  
*Ps. savastanoi* 208.  $\times$  22.500. Cultivo 12h. Negativo.



Fot. 15.  
*Ps. savastanoi* 208.  $\times$  21.000. Cultivo 12h.  
Negativo.



Fot. 16.  
*Ps. pisi* 123.  $\times$  19.000. Cultivo 24h. Negativo.

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

POR

FEDERICO BEATO Y GONZÁLEZ

IV. EL PROBLEMA GENETICO DEL BACTERIOFAGO

1. *Introducción al mecanismo de reproducción del Bacteriófago en su aspecto general.*

Hasta ahora, se admitía que la reproducción sexual era facultad exclusiva de las formas de vida superiores. Sin embargo, cuando los biólogos investigaron más a fondo la cuestión, comprobaron la existencia, en organismo cada vez más sencillo, de representantes de este modo de reproducción, y actualmente están siendo objeto de investigación los virus, como constituyentes de la capa más baja de la vida. En 1947, se comunicaron experimentos que demostraron que las bacterias e incluso algunos virus, que precisan de bacterias como organismo huésped, podrían reproducirse sexualmente, hallazgo éste que llamó poderosamente la atención, ya que hasta entonces eran los hongos, levaduras y paramecios los organismos más sencillos, en los que se había comprobado la reproducción sexual.

Por reproducción sexual se comprende la conjunción de intercambio de los factores hereditarios de dos individuos (padres) con el resultado de la formación de un nuevo ser. Haciendo abstracción de otros aspectos, la sexualidad tiene para el biólogo un interés particular por cuanto constituye un medio sumamente útil y casi imprescindible, mediante el cual una especie de organismo puede adaptarse a las condiciones de vida turnantes y de esta manera conservarse. Especies vegetales y animales, resisten a la destrucción por alteraciones de ambiente en el curso de eras geológicas, en virtud del hecho de que por las mutaciones (alte-

raciones de la sustancia hereditaria) continúen evolucionando con lo que quedan adaptados mejor al ambiente. Estas mutaciones se producen espontáneamente y se expanden mediante una población con ayuda de la reproducción sexual. Las mutaciones se combinan de nuevo en cada generación, por lo que las especies con reproducción sexual disponen siempre de un número considerable de tipos nuevos, de los que algunos pueden estar adaptados a un ambiente alterado y ser de este modo el punto de partida de los eslabones próximos en la cadena de la evolución. En ello reside la ventaja de la sexualidad. Por ello es comprensible que entre todas las formas de vida conocidas se busque la sexualidad y los primeros hechos demostrativos de ella en las bacterias fuesen comunicados con una gran reserva (Beato, 102).

Ahora bien: la reproducción es el fenómeno por el cual una estructura organizada da lugar a otra estructura idénticamente organizada. Cuando una bacteria crece y se divide, produciendo dos organismos, se supone que se han reproducido por división binaria, pero esta división puede únicamente ser considerada como el último paso en el proceso de reproducción de un organismo. Es claro que la fisión binaria no puede existir en el plano molecular, y como determinadas partículas o moléculas específicas, como los genes, son perpetuadas, es admitido, de que de alguna manera, ellas inducen la síntesis u organización de idénticas estructuras. Parece como si alguna molécula específica estuviera dotada de continuidad genética. Así, a primera vista, la reproducción de una molécula es algo completamente distinto de la reproducción de un organismo. Y como un organismo está compuesto de moléculas, esto podría significar que la naturaleza de la reproducción de la parte es diferente de la naturaleza de la reproducción del todo. Un organismo es esencialmente una estructura organizada. Antes de la división de un organismo, las moléculas específicas son duplicadas. Dos organismos hijos son organizados en virtud del interjuego de fuerzas ejercidas por varias partículas. La fisión separa dos estructuras ya organizadas.

El problema de la naturaleza de la reproducción es el problema de naturaleza de la duplicación, de fuerzas morfogenéticas, es decir, de algo que no puede dividirse porque está exento de existencia independiente. Desde este punto de vista, la reproducción de un complejo molecular y de un organismo, tienen algo en común, especialmente la organización de bloques de metabolitos dentro de estructuras específicas.

Es, sin embargo, claro, que una célula es la mínima unidad bioló-

gica apta a reproducir su propia estructura, y la reproducción de un virus es más comparable a la reproducción de los constituyentes de la célula que a la reproducción de una célula. La duplicación de moléculas específicas, incluyendo los virus, puede únicamente tener lugar en un ambiente celular específico, porque esta duplicación de la célula misma es el resultado de la actividad e intercambio de un gran número de otras moléculas específicas. Luria (100) ha sugerido, como hipótesis de trabajo, que los fagos de la serie T no se multiplican por fisión binaria, pero penetrando aquéllos en las bacterias se dividen en pequeñas unidades que serían los genes individuales. Los genes se multiplicarían independientemente, dirigiendo los enzimas celulares a su propia replicación, y únicamente más tarde, en la mitad del desarrollo de su ciclo, volverían de nuevo a agruparse para formar un número de nuevas partículas fago. En efecto, la multiplicación del fago tiene lugar en el interior de la bacteria. El nuevo fago no es visible por el microscopio electrónico en la superficie bacteriana, y nos es accesible a la acción del suero antifago. El fago, como todos los virus, está constituido de materiales que difieren química y genéticamente de los de la célula huésped.

Las diferencias químicas no son expresables en términos químicos específicos, pero ellos pueden ser delineados por refinadas técnicas de inmunoquímica. El antisuero puede discernir entre elementos de virus y del huésped, que no es posible separar por los actuales métodos de fraccionamiento utilizados en química de las proteínas.

Ahora bien, lo que nosotros observamos en el fago es la aparición de un aumento de la actividad del virus, asociada a un incremento en el número de las partículas materiales específicas en una población de bacterias infectadas con virus, el cual es producido por esta única entidad observable, bacteria-virus, y el mecanismo que interviene en la infección y aparición de la actividad del nuevo virus, no puede ser postulado por analogía. En muchas mentes, el término reproducción y autorreproducción va relacionado con la idea de aumento de tamaño seguido de división. Un muy detenido análisis de ello revela que este aumento de tamaño, seguido de división, debe suponer la replicación de alguna estructura elemental responsable para la conservación de la especificidad de las generaciones sucesivas. Por ello, una de las primeras tareas en la investigación de virus ha de ser el descubrir la relación entre la partícula virus, que nosotros conocemos en estado extracelular, a que es replicada en el interior de la célula huésped. El estudio,

pues, de la reproducción de los virus constituye uno de los mejores medios que permiten llenar el vacío existente entre su crecimiento y replicación. Un ejemplo de lo que todo esto representa lo tenemos en los espléndidos resultados obtenidos en el estudio del sistema de fagos T, activos sobre el *E. coli* raza B.

Se ha averiguado, como ya hemos dicho en otro lugar, que la reproducción tiene lugar en un corto período de latencia (de 13' a 45'), entre la infección de la célula y su disolución, con un aumento en la actividad del fago, demostrable al liberarse por lisis gran número de partículas fago específicas. El número de células infectadas, así como el de partículas fago de cada bacteria, la liberación y cantidad de virus liberado por cada célula puede ser determinado con seguridad (trabajos de Delbruck y Luria-54).

Por otra parte, el virus infectante puede ser tatuado y fácilmente reconocible en sus mutantes (trabajos de Luria-103 y Hershey-104), pero nuestro problema es el de determinar cómo están relacionadas las nuevas partículas fagos con las partículas infectantes. Es, sin duda alguna, evidente la continuidad entre las dos clases de partículas, no solamente por la especificidad general de reproducción, sino también por la observación de que en las bacterias infectadas con mezcla de virus, dos fagos estrechamente relacionados, tal como el T2 y sus mutantes T2r, producen, como han demostrado los trabajos de Hershey (104), una mezcla de ambos tipos infectantes en proporción similar a cada uno de los que constituyen dicha mezcla. La continuidad del material virus, después de la infección, es también demostrada por experimentos de radiación, pero sobre ellos hemos de hablar más adelante. Por otro lado, hay amplia evidencia de que el virus sufre una alteración a fondo después de la infección.

Doermann (105), provocando la ruptura de bacterias infectadas, en diferentes períodos, después de la infección, encuentra que durante varios minutos ninguna actividad del fago puede ser observada, y únicamente alrededor de la mitad, en el período de latencia, las primeras partículas activas hacen su aparición. Otro hecho revelador de que las partículas finales no son un producto directo de la reproducción de las partículas infectantes. Ello es demostrado por los experimentos llevados a cabo en infecciones mezcladas, y que serán revisadas en otro capítulo. Por el momento, diremos que bacterias infectadas con una mezcla de fagos no relacionados, como T1 y T2 o T1 y T4, se excluyen mu-

tuamente; solamente uno de los tipos es liberado por cada bacteria, y la partícula infectante del otro tipo se pierde, lo cual sugiere una alteración de la partícula infectante. Sin embargo, fagos relacionados, T2, T4, T6, mezclando dos de ellos e infectando una bacteria, el producto obtenido es una mezcla de los dos.

Estos hechos, así enunciados, indican que la específica reproducción del fago es perpetuada, no como un total, sino subdividida en discretas unidades, podemos, pues, considerar a estas unidades como los elementos cuya estructura específica es replicada. Pero esto sólo nos demuestra que las unidades son replicadas separadamente; cabe, pues, suponer que, después del eclipse inicial, cada nueva partícula fago es producida como un todo y que toda recombinación resulta de la última interacción entre las partículas nuevamente formadas. Este fenómeno de recombinación en el fago parece establecer la certidumbre de que la especificidad de una partícula fago es perpetuada por discretas subunidades y que éstas deben las unidades que son replicadas.

Pero no olvidemos que toda célula tiene su especificidad perpetuada por subunidades llamados genes, no debiéndose olvidar tampoco que la especificidad de un complejo celular no es debida a la posesión de un particular gene, sino al hecho de que la célula posee una particular colección de genes, los cuales están enlazados y colocados en determinado orden.

Ahora bien, la complejidad de las interacciones que se presentan en los períodos iniciales de la infección por el fago, ha sido bien evidenciada en otra parte de esta revisión. La existencia demostrada de las infecciones múltiples, sugiere que repetidas e independientes contribuciones de cada partícula infectante participan en la formación de las distintas generaciones. Luria, en el 47 (106), emitió la hipótesis de la existencia de una replicación independiente de las unidades genéticas componentes del fago, seguida por su completa reorganización, para la formación de una partícula madura de fago.

Los bioquímicos han aclarado con sus trabajos algunos aspectos de la reproducción del fago. La determinación de la proteína y ácido nucleico total en las bacterias infectadas y utilizando la técnica de los isótopos, demuestran que el material de las partículas fago que, como sabemos, están constituídas casi exclusivamente de proteína y a. nucleico, derivan en su mayor parte de compuestos asimilados del medio, después de la infección.

La intensidad de asimilación de estos nuevos materiales es similar al poder de síntesis del protoplasma bacteriano en células no infectadas, inmediatamente antes de la infección. Esto sugiere que la persistencia de enzimas sintéticos en las bacterias, son responsables de la formación de los metabolitos precisos para la síntesis del fago.

La síntesis del DNA precede inmediatamente a la aparición de partículas fago activas, y ella no se lleva a cabo en bacterias infectadas con fago inactivo, lo que hace suponer que el DNA puede ser afectado fundamentalmente en la etapa final, de la generación de partículas activas. Estas síntesis abortadas serían debidas a la actividad de porciones de partículas fago infectantes que no fueran dañadas por la radiación.

Las observaciones citológicas, ya anteriormente revisadas y que fueron descritas por Luria y Humann (96), en bacterias infectadas por T2, explican la supresión de toda síntesis bacteriana específica; como sabemos, toda infección con fago activo es seguida por la aparición de gránulos de cromatina que probablemente representan al nuevo fago, como lo demuestra el hecho de que esta nueva cromatina no es capaz de acumularse después de una infección con fago inactivo, o después de la infección con fago activo sobre determinados tipos de bacterias anormales, que son incapaces de sufrir la lisis en presencia del virus fago.

Esto nos sugiere que la supresión de síntesis de componentes específicos bacterianos en una célula infectada por fago, resulta de una ruptura del aparato genético de la bacteria y su reemplazamiento por el aparato genético del fago.

La ruptura del aparato genético de la bacteria infectada con fago inactivo, explica el fracaso de esta bacteria a sufrir una posterior multiplicación.

Por tanto, el virus no solamente lleva al huésped bacteriano un organizador específico adicional, sino que éste es predominante, es lo que Luria ha denominado parasitismo en el nivel genético (Luria-100).

En las bacterias lisogénicas, que portan y ocasionalmente liberan fagos, Lwoff y Gutmann (18), han demostrado que el tipo genético de virus y huésped pueden coexistir y funcionar conjuntamente en simbiosis genética. La diferencia entre infección por fago, seguida de muerte, y la infección seguida por lisogenidad, puede ser interpretada como una diferencia entre la compatibilidad de relaciones entre el material genético del virus y del huésped.

La compatibilidad en el sistema lisogénico puede ser más o menos

estable, y sus cambios pueden estar relacionados con el carácter esporádico de la liberación del fago por la bacteria lisógena.

Por todo lo dicho, nosotros podemos construir un esquema de reproducción de un bacteriófago tipo T2: la infección ocasiona una ruptura de la organización genética de la bacteria, y un cambio en la organización del virus infectante que conduce a la formación de un nuevo sistema unitario, la bacteria infectada-fago, conteniendo la maquinaria enzimática de la bacteria, e imponiendo al huésped un modelo derivado del virus y utilizado materiales metabólicos no específicos, se dirige la síntesis del virus. Esta pauta genética es resuelta en un número de unidades más o menos independientes: las determinantes genéticas del fago. El proceso de formación del nuevo virus es tal, que él permite, para su compleja organización, llevarla a cabo y terminar en la aparición de una población de partículas de fago, que representan el producto final del proceso de reproducción. Sin embargo, este cuadro presenta una serie de lagunas; hay una primera, entre la desaparición del virus inicial y la aparición del virus maduro; hay otra, de naturaleza química, entre los elementos metabólicos no específicos y las partículas específicas finales de nucleoproteínas; hay un vacío genético entre los determinantes del fago y la partícula fago, siendo los primeros responsables de la especificidad heredada, y siendo la partícula fago la portadora de la infección, y, por lo tanto, la única unidad indefinible en el estado extracelular. Es claro que existiendo todas estas lagunas en el sistema fago, es de esperar su eliminación, y que ello será más fácil trabajando y experimentando sobre el bacteriófago que sobre otros sistemas biológicos.

Ahora bien, el análisis de un particular fenotipo estudiado por Luria (107), le lleva a la comprobación de que la mutación se presenta durante la multiplicación del virus, produciendo «clones» mutantes que varían de tamaño.

Un análisis estadístico del tamaño del clone, conduce a la conclusión de que el fago como unidad genética sufre crecimiento por sucesivas divisiones binarias. Así, el producto de una ruptura puede ser comparado a un cultivo de fago procedente de una sola partícula infectante, y sufriendo ciclos de división regulares. La noción de una primera partícula fago vegetativo multiplicándose en la célula bacteriana y madurando posteriormente, pueden dar razón de estos hechos. Por ello, Visconti y Delbruck (108) han teorizado en la forma siguiente:

las partículas padres penetran en la bacteria y son transformadas en partículas fago vegetativas. Estas se multiplican y con ello la cantidad de apareamientos se hace apreciable. En cierto momento las partículas vegetativas están en proporción constante, casualmente ordenadas y entonces transformadas en partícula fago madura, que se acumulan en las bacterias. La maduración es irreversible en la célula madre; la partícula fago madura no se aparea y no se multiplica. Esta teoría coloca la genética del fago muy en contacto con la teoría clásica mendeliana aplicable a los organismos superiores. La diferencia con éstos consiste fundamentalmente en el hecho de que nosotros no podemos estudiar directamente la recombinación de una sola pareja.

Únicamente aplicando los métodos estadísticos de poblaciones genéticas, es factible calcular el valor de la recombinación por simple apareamiento, y así construir el mapa de enlaces.

Por último, interesa que hagamos constar que la multiplicación del fago por un proceso de fisión no ha sido todavía definitivamente eliminada. Es verdad que desaparece al principio la partícula infectante, pero esto no requiere decir que desaparece la partícula. Es posible que la desaparición de la partícula infectiva sea causada por algún cambio en la partícula virus, quizá por la pérdida de receptores específicos de superficie.

Se ha pensado que los virus poseen genes formando grupos enlazados y ordenados; estos grupos podrían multiplicarse por fisión binaria, y en consecuencia, la multiplicación de los virus no sería en esencia diferente de la de las bacterias. La más simple hipótesis sería suponer que las partículas fago se multiplican por fisión, y aceptado esto, se sospecha que la recombinación ocurre por fusión de dos o más partículas fago, seguido de segregación, en que partículas poliploides de razas tipo pueden resultar. La aparición de partículas no infectivas sería en parte debido a la agregación de partículas inmediatamente derivadas de la fisión, pero también es, en parte, un fenómeno real, como resultado de las grandes diferencias de fenotipo en las partículas, como consecuencia de recombinación y mutación.

## 2. Variación y mutación en el fago

### A) Introducción.

El examen del fago producido por la bacteria infectada y sus relaciones al foco infectante, nos da una gran parte de información sobre el desarrollo del fago. La cantidad y composición del nuevo fago como una función de la cantidad y composición del fago infectante, nos permite analizar las relaciones genéticas entre los dos. Partamos del hecho fundamental que todas las mutaciones son espontáneas y que ellas se presentan durante la multiplicación de los fagos. Ahora bien, éstas forman un grupo heterogéneo y deben ser considerados como un conjunto de distintas entidades y más o menos relacionados. Aun dentro de los fagos considerados como relacionados, hay gran variación. Esto puede ser observado también en poblaciones de virus obtenidos por medios experimentales de una sola partícula individual.

Indudablemente, los virus exhiben una gran variabilidad y poder de adaptación. Se ha observado cómo la transferencia de un virus a un nuevo huésped es a menudo seguido por permanentes cambios hereditarios en las propiedades del virus. La adaptabilidad en poblaciones de organismos superiores depende de la utilidad de variables factores hereditarios, incluyendo algunos de los que pueden ser favorecidos por nuevas condiciones ambientales.

La plasticidad de los virus ha de depender de su capacidad a cambiar de naturaleza, según el ambiente en que se desarrolle.

Se piensa que la variación en el fago es directamente producida por el ambiente del huésped, cosa que muy frecuentemente es inexacta. La auténtica mutación es determinada por la potencialidad intrínseca del material genético del propio fago.

La frecuencia de las aparentemente espontáneas mutaciones no son claramente afectadas por factores extrínsecos. Los mutantes pueden ser seleccionados en ambiente en que ellos se reproducen rápidamente, o que sobreviven más largo tiempo que los tipo «padres».

Los microorganismos difieren de los más altos organismos por el gran tamaño de sus poblaciones, lo que, debido al gran número de individuos, nos abastece de una gran variedad de mutantes. En el fago, podemos lograr su adaptación a un determinado germen, donde otros

muchos son incapaces de crecer; pero si una partícula entre millones de ellas sufre una mutación favorable a su crecimiento, ella puede ser el origen de una población constituida casi exclusivamente de su propia descendencia. Sin embargo, el problema no es tan simple. A menudo la exposición en un nuevo ambiente conduce al no desarrollo. Otras veces hay diferente multiplicación de dos o más tipos de partículas, una de ellas presente en el original y la otra que ha hecho su aparición por mutación durante el desarrollo.

La composición de una población viral ha de depender de la relativa capacidad de los diferentes tipos a proliferar y sobrevivir.

B) *Los tipos de mutantes en el bacteriófago.*

a) *Mutación en relación a la bacteria huésped (h).* — Si nosotros mezclamos los fagos con bacterias, la mayoría de éstas sucumben, pero quizá una parte de ellas efectúa una mutación adoptando una forma resistente contra los fagos infectantes. Por lo que nace una nueva estirpe bacteriana fago resistente y se crea una línea de defensa para su especie, frente a esta clase de fagos. Pero éstos, a su vez, pueden volver al ataque por mutación, adoptando una forma que los pone en condiciones de destruir la bacteria resistente. Ahora bien, los mutantes resistentes son de varios tipos; una (Luria y Delbruck-109), llamada B. 5, es resistente a los virus T1 y T5, pero es cultural y serológicamente indistinguible de la raza original B. Un segundo tipo B1 forma una colonia pequeña y es resistente únicamente al T1 y puede desarrollarse sin tritofano. Hay unas 6 a 8 mutaciones diferentes, todas resistentes al T1. Es claro que la sensibilidad o resistencia al T1 es determinada por varios factores genéticos en la célula bacteriana. Son interesantes las relaciones entre la resistencia al virus y otras características. Por ejemplo, la resistencia al T1 y T5 o la resistencia al T3 y la necesidad del tritofano. Una sugestión es, que puede existir alguna relación metabólica entre la capacidad de la célula a utilizar tritofano y la de formar el componente de la superficie celular necesario para la absorción del T1 (Anderson-110). Pero es también posible que este enlazamiento dependa de algún carácter accidental del aparato genético de la célula, similar al enlazamiento genético entre sexo y hemofilia, en el género humano. El enlazamiento entre el T1 y T5, y más fuerte entre T3 y T4, llevan juntos

pares de virus, que no están relacionados, ni morfológica, ni antigénicamente. Por otro lado, la mutación bacteriana, conduciendo a resistencia frente a dos o más virus, donde están contenidos los T2, T4, T6, y que están ciertamente muy relacionados, son raramente encontrados. Un mutante de T1 es capaz de lisar ciertas bacterias resistentes a T1. Esto nos ilustra en el sentido de una sola mutación, representando un ligero cambio en la estructura del virus, que puede conducir a una nueva especificidad con su huésped, separando el virus del grupo a que él pertenece y conduciendo dentro de sí aparentes relaciones con otros virus de diferente origen. Esta casual relación entre otros virus con respecto a su especificidad-huésped, puede ser hecha clara por analogía. Así, la gama globulina del suero de caballo y del cobayo están genéticamente alejadas una de la otra, y pueden fácilmente ser distinguidas por pruebas serológicas. Pero si ambas acontecen que proceden de animales que han sido inmunizados frente al mismo antígeno y ellas son probadas únicamente por su actividad específica como anticuerpos, puede ser erróneamente alcanzada la conclusión de que ellas son proteínas idénticas (Beadle y Sturberant-111).

Ahora bien, las mutantes que afectan a la especificidad del huésped, llamadas mutaciones h., son reconocidas, según Luria (103), por su capacidad a crecer sobre razas bacterianas resistente a un tipo normal de fago. Así, el fago T1h es activo, no únicamente sobre el coli raza B., sino también sobre la raza B/1, que es una mutante del E. coli B resistente al T1. A este virus mutante se le denominó T1h, y el original T1h +, en conformidad con la usual convención genética. La letra h se refiere al carácter variable del huésped, o del lugar genético que determina esta variación.

El signo + significa el carácter tipo, salvaje primitivo. En general, hay diferentes mutaciones h, que se representan con característica frecuencia en determinados stock de virus. Estas mutantes pueden sufrir una segunda mutación, o revertir al tipo original sobre el nuevo huésped. La mutante h no difiere grandemente del virus antecesor. Ninguna diferencia serológica ha sido encontrada. Estas mutantes, en relación al huésped, nos dan un ejemplo típico del papel de la mutación en la adaptación del virus al nuevo huésped.

Luria (103), siembra una gran población de un fago T2, con una bacteria relacionada al germen huésped sensitivo, pero no resistente al fago T2, comprueba el desarrollo de algunas placas de fago. De cada

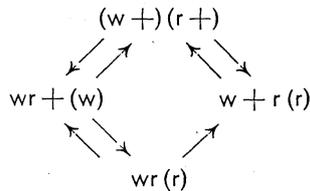
placa puede aislarse una nueva raza de fago similar en muchos aspectos al original, pero poseyendo la permanente capacidad de atacar la bacteria resistente. La frecuencia de la mutante h puede variar de 1 a 1.000 para 1 en  $10^9$  o más, de partículas fago normales. Los mutantes h nos ilustra también sobre algunos aspectos en el juego de mutación y selección, que determinan la formación de poblaciones de virus. Si una partícula mutante h está presente cuando una suspensión de fago es puesta en contacto con un cultivo bacteriano resistente, que la mutante puede atacar, ésta será la única partícula a proliferar, y puede eliminar y sustituirla totalmente en pases sucesivos.

Las mutaciones pueden afectar a características que el fago pueda presentar, por ejemplo, Delbruck (59), comprueba que fagos que requieren determinados iones, o cofactores orgánicos para su absorción, pueden producir mutantes que no requieran estos factores. La mutación puede transformar un fago moderado en una variedad más o menos virulenta (trabajos de Boyd-112). Foster (72), ha descrito mutantes resistentes a la proflavina.

Este tipo de mutación h no afecta ni a la morfología ni a la especificidad serológica del fago. Por ello, estos dos grupos de características bien relacionadas entre ellas, forman la mayor y más segura base para la clasificación del grupo de fagos T. Las características en relación al huésped son de poco valor en la clasificación del fago, excepto para aquellos grupos bacterianos no relacionados con el fago. Así, un fago puede adquirir por mutación la capacidad de crecer sobre una raza de especie o género bacteriano diferente, de su huésped original. Sin embargo, aunque esto representa un útil dato para la identificación de una raza, es un carácter demasiado variable para que pueda ser utilizable con propósitos taxonómicos.

b) *Mutaciones afectando el tipo de placa.*—Este tipo de mutación ha sido encontrado únicamente entre los virus del sistema T. Los fagos T2, T4, T6 difieren por sus mutantes r, que producen aclaramiento de enturbados cultivos bacterianos, al final del período latente, mientras que cultivos infectados con el tipo salvaje, el aclaramiento r +, es considerablemente alargado, algunas veces hasta cuatro horas, según Hershey (104). Esta dilación del aclaramiento es característica de los cultivos tardíos de gérmenes infectados con el tipo primitivo del fago numerado T y se ha denominado a este fenómeno inhibidor de lisis (r +); la r caracteriza

a los mutantes, cuya dilación está ausente, es decir, es rápidamente lisada. Una mutante intermedia ha sido llamada  $w$  o inhibidor débil (weak). Con referencia a estos mutantes, el tipo salvaje puede ser llamado  $w+$ ,  $r+$ . Como la mutación  $n$ , pero independientemente, el tipo placa mutación ocurre únicamente durante el período de crecimiento de los virus. Estas mutaciones son indistinguibles del tipo de donde derivan, excepto por las características mencionadas, siendo relativamente estables genéticamente. Las propiedades escritas permiten un limitado análisis genético (ver la figura adjunta). Hay cuatro genotipos indicados por los apropiados símbolos y únicamente tres fenotipos que van entre paréntesis:



Ahora bien, el espontáneo origen de estos mutantes, lo encontramos en el hecho de que no requiere un ambiente selectivo para que éstos se manifiesten. Hershey (104) ha comprobado que los colifagos T2, 74 y T6 siempre contienen mutantes caracterizados, por formar placas mayores o más pequeñas que las que normalmente forma el tipo original. Los fagos derivados de estas variantes continúan dando el tipo de placa modificado. La frecuencia de tales mutantes es del orden de 1 en 1.000 partículas. Luria (107) analiza la distribución clonal de los mutantes  $r$ , en el fago T2, y comprueba que las mutaciones espontáneas del tipo primitivo al tipo  $r$ , es de cerca de una mutación por cada  $10^{-4}$ , duplicaciones.

En verdad que la determinación genética del tipo de placa en el T2, es muy compleja. Según Doermann (105), la diferencia en el tipo de placa refleja diferencias en la extensión con que la lisis de la bacteria infectada puede ser inhibida por un segundo fago infectante. El menos inhibido, o tipo  $r$ , puede derivar de cualquiera de las diferentes mutaciones que aparentemente se presentan en diferentes determinantes genéticos. Las diferencias entre  $r$  y  $r+$  han sido analizadas por Doer-

mann (105), como sigue: La inhibición de la lisis es debida a una segunda infección con fago que se presenta lo menos a los tres de la primera. Los fagos r +, liberados de la primera bacteria lisada son absorbidos por las bacterias restantes e inhibida su lisis. Para inhibir la lisis en ambas infecciones primaria y secundaria, debe ser con fago r +. Mientras una partícula pueda inhibir la lisis, la duración de la inhibición aumenta con la multiplicidad de la infección secundaria. El volumen de ruptura de la bacteria inhibida en su lisis es mayor que el de la bacteria no inhibida.

Por otra parte, cuando una bacteria primeramente infectada con T2h + r +, y 8' más tarde con T2hr +, la inhibición de la lisis se presenta aunque ninguna de las bacterias inhibidas produzca T2hr +, esto sugiere que la inhibición afecta al crecimiento del fago añadido secundariamente. Pero como Luria (103) ha comprobado cuándo una mutación ocurre en una bacteria, el fago producido contiene ambos mutante y normal.

La cantidad de fago presente en el producto de la bacteria en que la mutación ha ocurrido, dependerá del modo en que el fago se reproduce, o, por lo menos, de la forma en que se reproduce la porción del material genético (gene), responsable para la determinación del carácter mutante. Los nuevos genes fago deben surgir como consecuencia de la replicación de algún tipo de gene persistente. Si una mutación tiene una constante probabilidad de ocurrir en cada replicación, el número de mutantes a que una mutación da lugar en la bacteria dependerá de los efectos de la replicación. Contando todas las placas del T2r, en el producto individual de varios cientos de bacterias infectadas con T2 es posible observar que los mutantes, cuando se presentan, son agrupados en clones de idénticas cualidades (Luria-107).

La distribución de clones de variados tamaños está muy relacionada a la distribución que es calculada, suponiendo que la reproducción del gene-fago es un proceso siguiendo la ecuación  $N = 2^n$ , donde N es el número final de unidades gene y n comprende al número de la generación del fago en que ha tenido efecto. Esta ecuación es fundamentalmente análoga a la ecuación para la reproducción clonal de la bacteria o protozoos. Nos dice que los gene-fago se reproducen de 1 a 2, 12 a 4 a 8, más bien que por sucesiva producción.

### 3. *Las denominadas infecciones mezcladas*

#### A) *Infección múltiple y mezclada.*

Cuando varias partículas fago atacan la misma bacteria, nosotros hablamos de infección múltiple si ellos son todos iguales, e infección mezclada, si ellos son de diferente tipo. Los resultados son diferentes y dependen del grado de semejanza entre las partículas.

La infección múltiple da resultados completamente similares a la infección única. El período latente, el fago producido y el tiempo de aparición de la partícula madura, como es observado por lisis prematura, no tiene significación distinta. Esta semejanza entre la única y múltiple infección no es debida a la limitación en el número de partículas infectantes que puedan penetrar en la célula, sino más bien ello indica que la cantidad de fago producido en una bacteria es limitada por algún otro mecanismo. Cuando la infección múltiple consiste de dos infecciones con el mismo fago, separado por un intervalo de varios minutos, Freuch y colaboradores (113) comprobaron que el segundo fago, después de haber sido absorbido, era destruído y parte de su fósforo era arrojado dentro del medio en forma soluble. En un posterior trabajo, Freuch (114) demuestra cómo este segundo fago no participa en su reproducción, y su fósforo no contribuye al de la progenie del fago. El puede, sin embargo, dar muestra de su presencia, por ejemplo, por inhibición de lisis.

#### B) *Infección mezclada con fagos relacionados*

Bacterias infectadas con una mezcla de dos fagos relacionados con el T2 y T4 producen, en la mayoría de los casos, ambos tipos de fago. Delbruck y Bailey (115) demuestran que si las partículas de dos razas de fago son marcadas con tatuaje genético, recombinantes de ellos son encontrados en el producto. Además de esto, Luria (116) encuentra tipos híbridos en el producto combinado, observando partículas con caracteres específicos para uno o el otro de las razas padres. El tipo híbrido observado en el cruce entre el T2 y T4 siempre presenta la misma combinación de especificidad serológica, y en relación al huésped, célula de uno u otro de los tipos padres. Esto indica una escasa selección intracelular.

La participación de muchas partículas fagos infectantes en la reproducción, es únicamente posible si la infección es casi simultánea. Dulbeco (117), comprueba que unos minutos de dilatación es suficiente para causar una exclusión entre fagos relacionados. Esta exclusión va acompañada, según Freuch y colaboradores (113), por destrucción y parcial derramamiento dentro del medio de las partículas excluidas.

C) *Infección mezclada con fagos no relacionados*

Pasemos ahora al extremo opuesto: infecciones mezcladas, en que los dos tipos padre no están relacionados, pero todavía capaces de infectar el mismo huésped bacteria. Los dos casos mejor analizados han sido, por un lado, la infección mezclada con T1 y T2, estudiado por Delbruck y Luria (54), y por otro el empleo de la mezcla de T1 y T7, por Delbruck (118). En ambos casos, los dos tipos originales son morfológicamente distintos y no presentan ninguna reacción serológica cruzada. El principal resultado obtenido en estos casos es el fenómeno de mutua exclusión, que significa que la bacteria, al romperse, puede producir uno de los fagos infectantes originales, pero nunca ambos. Esto es observado más corrientemente con el empleo de una técnica especial, sembrando de la bacteria infectada mezcladamente sobre una mezcla de dos razas indicadoras, una de las cuales es sensitiva a uno de los fagos y resistente al otro. Sobre tales placas de agar se formará una placa clara originada de una bacteria infectada al romperse, dará por lo menos una partícula capaz de lisar una de las razas indicadoras. El principio de mutua exclusión ha sido comprobado en otros casos de infecciones mezcladas, con razas no relacionadas. El estado de exclusión del otro virus es, algunas veces, pero no siempre, muy rápidamente establecido después de la infección. Por ejemplo, sabemos que el T5 es absorbido en ausencia de Calcio (trabajos de Adams, 119), pero su progreso es detenido en el período inicial. Todavía en bacterias en que T5 ha sido absorbido en ausencia de Ca., la multiplicación de los virus no relacionados es excluida. Similarmente, en bacterias simultáneamente infectadas con T1 y T2 el T1 es siempre excluido. El T5 y T2 establecen la exclusión muy rápidamente. El T1 la establece más lentamente. Si el T2 es añadido 4' más tarde que el T1, a una suspensión bacteriana, hay todavía una considerable proporción de bacterias en que T2 se multiplica, con exclusión del T1.

La exclusión no ocurre en el período de absorción; al contrario, en tanto que los dos virus no están en gran exceso en las bacterias, ellos son absorbidos. Watson (120) ha comprobado que cuando el T2 es irradiado con rayos X, su habilidad a excluir al T1 es destruída, en la misma proporción a su capacidad para mutar los gérmenes. Esto sugiere que una partícula del fago debe invadir la bacteria para excluirla. En infecciones mezcladas con T1 y T2, la exclusión es unilateral, siendo el T2 el que domina, la lisis se presenta después de los 21', el período de latencia característico para T2. En las pocas bacterias en que T1 se impone, la lisis ocurre después de los 13', período de latencia característico del T1. Si los dos fagos no son dados simultáneamente, el tiempo será calculado desde el momento en que el fago fué añadido, hasta ser liberado por la bacteria.

El virus excluído, aunque absorbido, no es recuperado después de la lisis. Sin embargo, ejerce influencia sobre el fago producido. En el caso de infección mezclada con T1 y T7, este efecto del virus excluído sobre el producido, consiste en una muy considerable reducción de lo producido. Esto ha sido llamado efecto depresor.

En el estudio de infecciones mezcladas con T1 y T7 se pudo observar que el efecto depresor puede ser provocado por la adición de antisuero específico frente al virus excluído (trabajos de Delbrück-118), agregado después de la absorción de este virus. Esto ha sido interpretado como indicando que el virus excluído quedaba en el exterior de la bacteria infectada.

Hemos de hacer notar que hay todavía un más alto grado de no relación que la que aquí estudiamos, cual es el caso de dos fagos con distinto huésped. Si tales fagos son añadidos a un cultivo conteniendo una mezcla de dos huéspedes bacterianos, seguramente no habrá interferencia. Este caso es similar al que se presenta en plantas o animales cuando dos virus atacan diferentes tejidos, o dentro del mismo tejido, atacan distinto componente de la célula.

El mecanismo de la mutua exclusión no es claro. Por otra parte, fago que viene del exterior puede algunas veces excluir la maduración de un fago ya presente en el interior de la bacteria tipo lisogénica (trabajos de Weigle y Delbrück-121). En éste, y probablemente en todos los casos, la mutua exclusión puede afectar una competición de alguna, única pieza de la maquinaria necesaria para la maduración del fago. Es posible que el fago excluído se multiplique en la bacteria infectada con

la mezcla, y que simplemente no sea capaz de madurar. Así, la exclusión mutua y efecto depresor pueden resultar de diferentes tipos de interacciones, en separadas regiones de la bacteria infectada.

#### D) *Recombinaciones genéticas*

Otro hecho verdaderamente importante en genética de fagos, es el observado por Hershey (122). Un tipo original y una mutante r del mismo virus pueden crecer en la misma bacteria, y con ello se llega a algo más importante: una bacteria infectada por un par de virus, el T2 y T2r; el producto de esta bacteria infectada, con los dos tipos, contiene partículas correspondientes a ambos tipos. Si los virus son el T2r y T4r, se comprueba entre los virus progenie, tipos diferentes a cualquiera de los virus infectantes. Parece ser que estas transformaciones virales en las bacterias, con una infección mezclada, no serían más que un cambio de genes entre dos virus que crecen en la misma célula. Tal recombinación genética evidentemente nos da un mecanismo para explicarnos el origen de los nuevos tipos virales en la naturaleza. La estructura genética de los fagos es más complicada de lo que hasta ahora se sospechaba. No únicamente la partícula de T2 contiene un número de genes capaz de mutaciones, sino que estos genes están evidentemente separados unos de otros y son capaces de formar nuevas combinaciones durante su proceso de reproducción en la célula. Delbruck y Bailey (115) trabajan en los fagos T2 y T4r (mutante del T4), que están emparentados entre sí y pueden reproducirse en la misma bacteria de la cepa B. Cada una de estas estirpes tiene dos características diferentes: T2 determina colonias pequeñas y puede destruir también bacterias de una cepa A de coli. T4r produce colonias grandes y destruye bacterias de la cepa C. Al hacer actuar simultáneamente T2 y T4r sobre bacterias de la cepa B, fueron derramadas, como era de esperar, partículas fágicas de ambas estirpes, pero además se habían formado dos tipos nuevos con propiedades combinadas, uno de los cuales determinó colonias grandes y destruyó bacterias A. Otro produjo colonias pequeñas y destruyó bacterias C. Evidentemente, los padres se habían unido y habían intercambiado algo.

Los cuatro tipos eran T2, T2r, T4 y T4r. La infección con T2h y T2r dió: T2h, T2r, T2hr y T2. El descubrimiento de estas recombinaciones abrió un nuevo campo en la genética del fago. Los trabajos de Hershey

y Rotman (123) demuestran claramente que cada característica funciona como una unidad, representa una de las dos formas alternativas, de determinado fragmento del fago o gene, y que la recombinación no es más que reajuste de estos genes. Así tenemos:  $T2hr + \times T2h + r$ ,  $T2hr + T2h + r$ ,  $T2hr$ ,  $T2h + r +$ . El signo más ya hemos dicho que indica lo normal (tipo primitivo) o allele.

Posteriormente estos mismos autores (124) descubrieron de qué mutantes  $r$ , aisladas independientemente del mismo fago, son raras, y siempre son idénticas. Es claro que el fenómeno nos revela esenciales aspectos del proceso del desarrollo del fago; este proceso es tal, que conduce a que la recombinación de caracteres del fago se efectúe.

Un análisis cuantitativo de la recombinación genética puede ser como una información del desarrollo del fago. Una particularidad de la genética del fago es que el dato cuantitativo sobre la recombinación, o sea, sobre la relativa frecuencia de las distintas clases de progenie derivados del cruce, son obtenidos por el examen del producto de muchas bacterias, y sería mejor del total producto de cada individual bacteria. El exacto número de partículas fago de cada tipo padre, que infecta esa bacteria, es desconocido; lo que conocemos es el promedio de partículas infectantes. Sin embargo, el proceso de recombinación puede ocurrir muchas veces dentro de cada bacteria. Se ha apuntado por alguno que la infección mezclada de una sola bacteria es equivalente a un experimento en población genética, más bien que a un cruce entre dos individuos.

Ahora bien, creo tiene interés el examen un poco detenido de algunos de los experimentos en fago, en relación al problema de la recombinación. De los trabajos de Hershey y Rotman (123-124) se obtienen los resultados siguientes: Los cuatro tipos obtenidos de la infección mezclada son distinguidos cuando son cultivados en una mezcla de coli B y B/2. Comprueban: el producto medio de los dos tipos padres, son iguales; el producto medio de los dos recombinantes son tipos iguales; en la bacteria individual, la producción de los cuatro tipos varía ampliamente, justamente como el volumen de ruptura total; en la producción proporcional de los cuatro tipos se observa escasa o nula correlación entre ellos; esto es, si la recombinación  $rh$  aparece con más alta frecuencia que el promedio corriente en una ruptura individual, esto no está relacionado con un alta o baja, en el promedio de los otros recombinados tipo  $++$ . Por otra parte, si en la producción obtenida de una bacteria los tipos «padres»

aparecen con desigual frecuencia, entonces la de los tipos recombinantes se presentan en proporción más baja que el promedio. En un cruce recíproco, en que la infección es hecha con T2rh y T2 + +, en este caso los solos mutantes, T2r y T2h, aparecen como recombinantes y con igual frecuencia, siendo ésta la misma con la que los recombinantes T2rh y T2 + + aparecían en el cruce original. Comprobaron la existencia de distintos mutantes r del T2. Los principales estudiados por Hershey y Rotman fueron los numerados r1, r7 y r13. Cruzados con el T2h, obtuvieron, con diferente frecuencia, distintos recombinantes en la forma que exponemos:

$$\begin{aligned} \text{T2h} \times \text{T2r1} & \text{ ————— } 15 \% = \text{T2h} \times \text{T2r7} \text{ ————— } 7 \% \\ \text{T2h} \times \text{T2r13} & \text{ ————— } 0,8 \% \end{aligned}$$

Estas diferencias en la frecuencia con que aparecen los recombinantes, son una expresión del diferente grado de enlace de la locus h, con cada uno de los de r. Si ahora revisamos el cruce entre r1 y r13, son obtenidos igualmente cuatro tipos de partículas, resultando de este cruce los dos tipos originales T2r1 y T2r13, y dos recombinantes T2r13 y T2 + +. Aquí los tres tipos portan una o más mutaciones r del mismo tipo de placa. Ellos son fenotípicamente iguales. Ellos pueden ser distinguidos únicamente por pruebas genéticas, en la forma siguiente: la T2r1 puede dar en su progenie una cierta proporción de tipos salvajes al cruzarse con T2r13, pero no en un cruce con T2r1r13. Similarmente, T2r13 puede dar progenie tipo salvaje en un cruce con T2r1, pero no en cruce con T2r1r13, o con T2r13. Finalmente, el T2r1r13 no da tipo salvaje con ninguno de los tres posibles cruces.

Doermann y Hill (125) han estudiado el cruce entre padres diferenciados por tres caracteres no ligados, en lugar de dos. La recombinación para un par de caracteres son divididos en dos clases iguales, cada uno de los cuales porta una de las formas del tercer carácter. Por ejemplo, en un cruce T2rh<sub>m</sub> × T2r + h + m + (r, h, m, no enlazados), la mitad del rh + (o del r + h), es m; la otra mitad es m +. La correlación positiva es explicada por la asistencia de partículas que llevan en sí, un diferente número de oportunidades para la recombinación genética (el h).

Ahora bien, caracteres enlazados que no se ordenan independientemente han sido encontrados. Ellos dan con frecuencia recombinaciones intermedias entre el mínimo observado (1 %) y 25 %. Los resultados son

compatibles con el supuesto de que los genes están situados linealmente en el cromosoma, y que la frecuencia de recombinación refleja a su vez la frecuencia de los intercambios, entre genes del mismo cromosoma, lo que aumenta las probabilidades de que grupos de genes situados linealmente sean separados por un mecanismo de intercambio. Así, Visconti y Delbruck (108), utilizando tres caracteres ligados, *a*, *b*, *c*, indican si un cierto gene está situado entre otros dos, o alejado de ellos. Si *c* está entre *a* y *b*, la frecuencia de recombinaciones para el par *a b* es aproximadamente la suma de la frecuencia de recombinación para *a c* y para *b c*. La validez de la hipótesis del enlace es corroborada por el experimento denominado de «acoplamiento y repulsión», un cruce de  $ab \times AB$  daría 3 % *aA* (y *Bb*); el cruce  $aB \times Ab$  da 3 % *AB* (y *ab*).

Por otra parte, una partícula recombinante puede exhibir caracteres derivados de lo menos tres «padres». Así, en un cruce de  $abc \times aBc \times Abc$ , algunas partículas *ABC* son encontradas. Si el elemental acto de la recombinación es un apareamiento, de pares de partículas de fago, seguido por la distribución de elementos genéticos, deben entonces existir en cada bacteria varios turnos de apareamiento.

Bresch (126) ha llevado a cabo un estudio genético sobre el fago T1, el cual, como sabemos, no está relacionado con ningún otro del grupo T, si bien actúa sobre el mismo huésped, él es morfológica y serológicamente distinto. La bacteria empleada era *Esc. coli B*, y una mutante raza B/1, seleccionada de B por T1. Todas las razas de fago derivados de una sola placa eran preparadas en cultivos bacterianos conservados a 4° centígrados, filtración posterior a través de membrana. La técnica del cruce la realiza añadiendo 1 c. c. de un cultivo de *coli B*, que contiene cerca de  $10^8$  bacterias, a 0,5 c. c. de una mezcla en caldo de fagos «padres», conteniendo alrededor de  $6,10^8$  partículas de cada tipo. Después de 8' a 37°, alrededor del 30-35 % de los fagos eran absorbidos, dando una multiplicidad de infección de 2-3 fagos de cada tipo.

Bresch utiliza un agar nutriente glucosado, al cual añade dos sustancias colorantes, azul, agua y metacromo amarillo. Con ello obtiene una serie de matices en la formación de placas que le permite la observación clara y definida de los distintos mutantes. En este medio, el fago original T1 da una colonia más pequeña que en el agar normal, y observa un ancho halo azul en excelente contraste al color azul verdoso de la capa de bacterias. Con esta técnica selecciona mutantes, con dos y tres factores, que somete a distintos cruces. El cruce entre tres

factores revela un enlace entre los tres genes afectados. En el cruce con dos factores, ninguna correlación es encontrada en una única ruptura entre un número de opuestos recombinantes. Sus trabajos están completamente de acuerdo con los resultados alcanzados por Hershey y Rotman (123 y 124), sobre el T2.

Ahora bien, en una única ruptura de bacteria infectada mezcladamente, el número de recombinaciones producidas de tipo opuesto, en la bacteria individual, no son iguales, ni son similares, ni siquiera relacionados. Si la recombinación es debida a emparejamiento sufrido por recíprocos cambios, el resultado podrá ser la producción de pares de individuos de igual número de los dos recombinantes. Sin embargo, puede haber una desigual reproducción de recombinantes después del cambio; tal desigual reproducción puede reflejar parcialmente la no sincronización de la multiplicación del fago, y por la eliminación en parte, de partículas ya maduras de la población.

Todo lo revisado en este aspecto, revela una extraordinaria complejidad del sistema genético del fago. El cómo tiene lugar la recombinación genética, es cosa que no conocemos con certidumbre. La más probable explicación parece ser la existencia de una serie de apareamientos casuales, independiente del tipo genético, entre partículas fago vegetativas haploides, las cuales todavía no están maduras y carecen de infecciosidad. La recombinación pareada de fagos podría presentarse por casual segregación de cromosomas y por intercambio, como en la reproducción sexual de organismos superiores. Lo más notable de todo esto es, sin duda alguna, la tremenda frecuencia de los apareamientos en el corto período de un solo ciclo intracelular.

Por último, un estudio de Levinthal (127), del enlace en heterocigotes del T2, ha observado que en estas regiones del cromosoma es donde el intercambio se presenta. Esto sugiere la existencia de un especial modo de reproducción del fago, en que los cromosomas son replicados por un mecanismo lineal. Si se realiza un cruce de T2r con T2r +, cerca del 2 % de las nuevas partículas segregadas producidas en el cruce, serían heterocigotes para el locus de r. Es difícil de explicar, aplicando la teoría del apareamiento, especialmente porque las porciones heterocigotas de su cromosoma son siempre muy pequeñas.

#### 4. Radiación y genética del fago

##### A) Fenómeno de reactivación.

El empleo de radiación para el estudio del bacteriófago ha sido de resultados verdaderamente interesantes y demostrativos, ya que ha permitido aclarar muchos aspectos en el ciclo intracelular del fago. Así nos ha enseñado que la absorción del fago no es necesariamente acompañada por la muerte de la bacteria, ya que fagos inactivados por los rayos X son absorbidos y desaparecen sin detener el desarrollo bacteriano (trabajos de Watson-128). Igualmente Luria y Delbruck (128) comprobaron que el período siguiente a la invasión, caracterizado por la muerte de la célula y su desintegración nuclear, puede ser dissociado de la producción del nuevo fago, por el tratamiento con luz ultravioleta del fago antes de la absorción.

Ahora bien, una partícula de fago inactivo es definida como aquella que fracasa a reproducirse en su huésped bacteriano. Si la absorción de tal partícula inactiva tiene lugar, la lisis no se efectúa, pero sí se lleva a cabo la ruptura artificial de la bacteria; no se revela la presencia de fago activo. Pero el fago inactivo por UV puede ser reactivado si lo exponemos en determinadas condiciones a la acción de la luz. Esto se llama fotorreactivación (trabajos de Dubelko-130). La luz productora de fotorreactivación pertenece a la zona violeta y está cercana a la ultravioleta del espectro; la acción del espectro para la fotorreactivación muestra una banda entre 3.000 y 5.000 Å, con un máximo alrededor de 3.650. La fotorreactivación es producida si el fago absorbido sobre una bacteria sensitiva es expuesta a la fot. react de la luz; si se utilizan extractos de bacterias la fot. reactivación no tiene lugar.

Cuando las partículas de fago inactivado son absorbidas sobre bacterias lavadas y resuspendidas en una solución buffer, su fot. reac. se mantiene por varias horas. Después de suficiente exposición a la luz fotorreactivadora, una fracción de la partícula inactiva es reactivada, pero ella no es incrementada por posteriores exposiciones a la luz.

Esto divide las partículas inactivas en dos clases: fotorreactivables y no fotorreactivables. El volumen reactivo de estas dos clases es función de la dosis de UV empleada para la inactivación. Curvas de supervivencia del mismo fago, en la oscuridad, y después de máxima fo-

torreactivación, tienen similar configuración. La relación de caída de la curva de supervivencia, después de la fot. react. y la caída de dicha curva en la oscuridad, define lo que se ha denominado sector no foto-reactivable de la partícula fago a la UV.

Los fagos del grupo T ordenados de más a menos fotorreactivable, son T1, T2, T6, T7, T3, T4, T5. Un Quantum de la luz fot. reac. es independiente de la dosis de UV empleada para la inactivación, ella aumenta con la temperatura y la intensidad de la luz.

Para fagos como el T3 y T7, el daño hecho por cada quantum de UV puede ser reparado por un quantum de luz, aunque algún daño de lo provocado es irreparable. Para el fago T2, la situación es más complicada y la cinética del fenómeno de la fot. react. presupone que la luz reactiva disocia una molécula con poder inhibitor producida por tratamiento con UV en una partícula fago, bloqueando alguna función esencial, y con ello el disociado inhibitor es entonces destruido por un enzima bacteriano (trabajos de Bowen-131).

Otro tipo de reactivación fué descubierto por Luria (106), y estudiados posteriormente por Luria y Dulbecco (132). Al agregar a bacterias, fagos desvitalizados por UV, aquéllos pierden la facultad de desdoblarse, pero no se forman partículas nuevas. Esto ocurre cuando una bacteria es infectada con dos o más partículas inactivas. Esto es llamado «reactivación múltiple». La cantidad MR es definida como la fracción de la bacteria infectada-múltiple, que libera fago activo. Esta cantidad decrece con el segundo aumento de la dosis de UV. Luria observó, pues, que una bacteria infectada por una sola partícula desvitalizada sucumbe sin producir nuevos fagos. Otra infectada con dos o más de ellos, rompe de un modo normal, derramando centenares de fagos. Según Luria, en el interior del cuerpo bacteriano, dos o más partículas víricas inactivas o heridas mortalmente que habían quedado intactas formarían una nueva partícula apta para la reproducción, que tiene lugar en la bacteria, y en la forma acostumbrada y dentro de un período característico determinado. Si más de una partícula desvitalizada es absorbida por la misma bacteria, la producción del fago activo puede tener lugar en aquella bacteria en que un resto al menos de cada unidad no haya sido tocada por la radiación. Luria (106), estima que cada fago de los tipos T2, T4 y T6 se compone de unas 20 subunidades vitales o genes. Suponiendo que quede abolida la función en diez de estas unidades al ser tocadas por un quanto UV, entonces existe la

verosimilitud considerable de que, si dos diferentes partículas son tocadas cuatro veces cada una, no queden destruidas en ambas las mismas subunidades. Pero es evidente que las subunidades intactas que se complementan pueden recombinarse en el cuerpo bacteriano para formar un nuevo fago con plena capacidad funcional.

Luria y Dulbecco (132), estudiaron la infección mezclada con dos partículas inactivas marcadas en un punto genético. Preparan una población bacteriana infectada con muy escasas partículas inactivas de T2r + y más abundantes partículas también inactivas de T2r; en tales condiciones, muchas de las rupturas de las bacterias infectadas, y como consecuencia de MR, pueden contener partículas de T2r +, junto con T2r. En un trabajo posterior, Dulbecco (133) infecta bacterias con partículas fago, una activa y otra inactiva, igualmente marcadas en dos puntos genéticos. Utiliza una técnica similar a la anterior, y la combinación de fagos utilizada era T2hr y T2h + r +; T2hr + y T2h + r (r y h no ligados). Cada miembro de su respectivo par era empleado en forma inactiva, con el otro en forma activa. Cada ruptura producía el tipo original activo, mientras que el original inactivo aparecía, en muy escasas rupturas.

Los tipos recombinantes no estaban presentes en cada ruptura, pero derrames conteniendo recombinantes eran mucho más frecuentes que los que contenían tipos padres irradiados. Estos hechos, no son explicables, como muy bien dice Dulbecco (133), por la hipótesis de la recombinación genética. La reactivación múltiple (MR) es, como ya hemos indicado, probablemente debida a la cooperación entre partículas dañadas, ejecutando algún inicial paso en la integración entre fagos bacterianos. La reproducción puede entonces presentarse por lo menos en una de las partículas genéticamente no dañada.

#### B) *Irradiación intracelular.*

Luria y Latarget (134) demuestran que la acción de la radiación sobre el complejo fagobacteria puede suprimir la producción del fago. En este caso la radiación actúa sobre el mismo virus más bien que sobre el huésped bacteriano. Actualmente muchos fagos pueden crecer en bacterias que antes de sufrir infección han recibido dosis de radiación mucho mayores de la que necesitaban para suprimir el crecimiento

del fago. Esto no debe sorprendernos, ya que hemos visto que la parte de la bacteria empleada en la síntesis del fago es su maquinaria enzimática, muy resistente a la radiación, más bien que la más radiosensitiva del aparato nuclear. El análisis de la supresión intracelular del fago por acción de la radiación, da diferentes resultados con los diferentes fagos. Con el T7 la curva de extinción en una única bacteria infectada inmediatamente después de la infección, es idéntica a la curva de inactivación del fago libre. Los primeros trabajos de Beuzer (135), demuestran que el descenso final, o sea, la probabilidad de un impacto individual, queda constante. Esto indica que la extinción de la capacidad de una bacteria infectada, al liberar el fago requiere la inactivación de todos los elementos virus intracelulares; y que los elementos individuales, al ser activados, retienen la misma radiosensibilidad que las partículas de virus libre.

La situación del T2 es más compleja; la radiosensibilidad de la partícula infectante disminuye por varios minutos antes de que se presente un aumento en el número de unidades radiosensitivas. En este comportamiento encaja la idea de que el fago ha llevado a cabo una inicial reacción que requiere la intervención de una parte específica radiosensitiva. Esta porción puede necesitarse únicamente en los primeros minutos, después que el fago reproduce en la forma de unidades menos radiosensitivas.

Recientemente, Beuzer y Jacob (136) realizan sus trabajos sobre dos fagos, T2 y T7 activos sobre coli B, que difieren morfológicamente y por el hecho de que el fenómeno de reactivación por multiplicación (MR) no existe más que en caso del T2. El complejo fago-bacteria es sometido en distintos períodos a la irradiación con UV.

Observan que la irradiación del complejo o de uno de sus componentes pueden destruir un elemento necesario al acoplamiento ulterior de una o varias de las reacciones, lo cual supone la ruptura del sistema. La tabla de curvas obtenidas con el T7, parecen demostrar que la UV actuaría sobre los complejos, inhibiendo en especial una etapa particularmente sensible del desarrollo del fago situada justamente antes de la aparición de elementos independientes semejantes al fago. Sería, pues, siempre la sensibilidad de la misma reacción la que se pusiera en evidencia por la irradiación del fago libre o del mono complejo. En el fago T2, durante toda la primera mitad del período latente, la resistencia del complejo aumenta progresivamente, lo que indica que en el curso

del desarrollo de este fago existen varias reacciones sensibles a la UV. Si el complejo es irradiado a tiempos variables del período latente, la resistencia aumenta a medida que las etapas sensibles son franqueadas. Con el T2 no es posible observar el aumento de la multiplicidad debido a la aparición de una generación de fagos dotados de una sensibilidad mucho mayor que la del sistema formador de fagos, y la supervivencia del complejo es entonces determinada por la supervivencia de elementos más resistentes. Por lo tanto, supongamos que una bacteria es infectada por dos fagos T2 inactivos, de forma tal que en cada uno de los fagos las lesiones correspondan a reacciones diferentes. Se puede considerar que las reacciones, a las cuales un fago ha perdido el poder de participar, son completadas gracias al poder intacto del otro fago y que el producto de la reacción pueda ser utilizado por los dos fagos. Según esta teoría, la fotorrestauración no consiste más que en una reparación directa de la lesión original, pero que ella permite solamente al complejo, cuya evolución es detenida en la reacción inhibida, de efectuar esta reacción. Una vez la reacción completada, el complejo podrá proseguir su evolución, salvo en el caso de que el fago sufra otras lesiones, que inhiban reacciones ulteriores.

##### 5. *Variaciones no hereditarias en el fago*

El concepto de una actividad fisiológica en el sector no genético del fago, adquirida tardíamente, es sospechada por el hecho de que su desarrollo en distintos huéspedes pueden éstos inducir a transitorios cambios en la partícula fago. Un ejemplo de variación fenotípica distinta del tipo hereditario y genotípico es la presencia de modificados fagos en bacteria que ha recibido una infección mezclada de fagos T2, y uno de sus relacionados T4, T6. Los trabajos de Novick y Szilard (137) comprueban, por ejemplo, que bacterias coli raza B, infectadas con T2 y T4, liberan parte de un fago con variación T4h (activo sobre raza B y un indicador raza B/2 inactivo sobre un raza B/4), pero después de un ciclo de crecimiento sobre B o sobre B/2, algunos de estos fagos retornan al tipo normal T2. Fenómeno de este tipo, llamado mezcla fenotípica, sugiere que algunos de los fagos producidos en las infecciones mezcladas vienen acompañados con el material genético de T2, pero envueltos con una «piel» semejante a la de los otros fagos presentes en

la bacteria huésped. En el siguiente ciclo de desarrollo, el nuevo fago sería eliminado con la envoltura formada bajo su propio control.

Otro tipo de variación no hereditaria es estudiado por Luria y Huamnn (138). Un fago P2, que crece normalmente en la Shige disenterica, pero que no se desarrolla en el coli B. Ocasionalmente, una partícula de fago P2 se desarrolla en alguna célula del coli B. El fago que es liberado por B, lo es en forma de P2B, que en sucesivos ciclos mantiene su capacidad de desarrollo en el coli. Es todavía plenamente activo sobre el Shigella, y un solo ciclo de desarrollo sobre este germen es suficiente para que retorne a su primitiva forma, cual su casi incompatibilidad a crecer sobre E. coli. En relación a esta variación desarrollada por el fago P2, los recientes trabajos de Weigle y Bertani (139) confirman estos hechos; comprueban que una cantidad de P2 que daría 10.000 placas sobre el Shigella, no da más que una placa sobre el coli B. Si se aíslan los fagos de una de estas placas excepcionalmente formadas sobre B y se siembran sobre un cultivo de Shig. y B, se encuentran entonces un número igual de placas sobre los dos indicadores. El hecho más notable es que un solo pase del fago P2B sobre Sh. vuelve a dar la relación característica de 1 a 10.000 entre el número de placas sobre B y el número sobre Sh.

Estos investigadores estudian el caso del fago  $\lambda$ , para el cual la forma primitiva tiene un espectro de acción muy amplio, ya que él se multiplica igualmente sobre las razas S. y C. de coli, pero después de la multiplicación sobre C., en nuevo fago  $\lambda$  C., no forma sobre S. más que una placa, por 10.000 que forma sobre C., y de nuevo el fago de esta forma excepcional recupera su tipo normal  $\lambda$ . Hay, pues, una verdadera correspondencia entre los fagos P2  $\lambda$  C y P2 B, como entre las bacterias Sh., C., y B. El fago P2B, excepción hecha de su capacidad para multiplicarse normalmente sobre B es completamente semejante al P2; la misma especificidad antigénica, la misma resistencia a la temperatura y a la irradiación UV, la misma absorción sobre Sh. y B, el mismo período de latencia. Pero un solo ciclo de multiplicación del P2B en una bacteria Sh., es suficiente para transformar en la forma P2 la totalidad del fago producido.

En todos estos casos descritos, es la variación del número de placas formadas sobre indicadores distintos, el hecho fundamental. Tales variaciones pudieron ser debidas a diferencias en la eficacia de formación de placas sobre los diversos indicadores, o bien a una heterogeneidad ge-

nética del fago utilizado. En efecto, supongamos que del fago P, preparado por lisis de bacterias de una raza A, se ha sembrado sobre los indicadores A y B, y que él forme menos placas sobre B que sobre A. Se trata de diferencias en la eficacia de la siembra, ¿o P contiene algunos mutantes capaces solamente de atacar a B? En el primer caso, la variación sería debida a distintas causas, lenta absorción de P sobre B, o a la necesidad para las bacterias B de estar en un determinado estado fisiológico para permitir ser atacado por P. Pero el fago, de los fagos formados sobre A, no sería diferente del fago de los fagos formados sobre B. En el segundo caso, la siembra de P sobre B produce una selección de mutantes de P. El fago de los fagos sobre B difiere del fago en la mayor parte de los fagos sobre A, recogido y sembrado de nuevo sobre A y B, él daría un número igual de placas, o una más grande proporción de placas sobre B, que la preparación original. Esta propiedad, como ella es de origen mutacional, será transmitida a la progenie de este fago, independientemente del tipo de bacteria A o B, empleada para su multiplicación. En los casos de los fagos P2 y  $\lambda$ , se ha podido demostrar por Bertani y Weigle (140), la imposibilidad de aceptar la hipótesis mutacional, ya que la distribución de los fagos capaces de formar las placas excepcionales sobre B ó S, en medio de la serie de lisados del fago P2 ó  $\lambda$  C, preparado sobre Sh. o C no es «clonal», como debería suceder si los fagos excepcionales hubieran sido formados por mutantes del fago presente en los lisados; por otra parte, las poblaciones de fagos liberados por algunas bacterias C, se hacen lisogenas con  $\lambda$  o  $\lambda$  C, o las bacterias Sh., vueltas lisogenas con P2 o P2B, son exactamente semejantes, en lo concerniente a su capacidad de formación de placas sobre B ó S.

La formación de placas excepcionales sería, pues, debido, no a la presencia de fagos excepcionales, sino a la existencia de bacterias excepcionales capaces de aceptar el fago y el de multiplicarle un número de observaciones justifica esta interpretación. Así, mientras que el número de placas excepcionales debería ser constante en la hipótesis de los fagos de excepción, se encuentra que varía con la edad del cultivo indicador, con la dilución del fago sembrado, con la preirradiación de la bacteria indicatriz por la UV. Por todo lo cual, las variaciones del espectro de acción de los fagos descritos no son, pues, debidas a mutaciones. Para explicar estas transformaciones hay que suponer, según Weigle y Bertani (139), que existe en los fagos una estructura con dos

características: *a)* que su presencia es requerida en algún lugar de la cadena de reacciones necesaria a la reproducción de los fagos; *b)* su especificidad es determinada completa o casi completamente por la bacteria huésped. La reacción para la cual esta estructura es requerida, tiene lugar después de la absorción del fago sobre la bacteria. Esta reacción no puede tener lugar, y no puede, pues, permitir la reproducción de los fagos, más que si ciertas condiciones de compatibilidad entre el fago y el huésped son cumplidas. Cuando no lo son, la reacción no tiene más que una pequeña probabilidad de tener éxito y esta probabilidad dependerá en gran parte del estado fisiológico de la bacteria huésped.

Así, un fago que ha logrado pasar por un nuevo huésped, se encontrará adaptado a él. Un tal mecanismo sería de naturaleza fuertemente adaptativa. Merecía la pena de investigar si otros caracteres de los fagos pueden ser modificados haciendo variar al huésped en el cual ellos se multiplican; tales modificaciones deberán ser investigadas, después de un solo ciclo de multiplicación del fago en el nuevo huésped, para evitar que estos fenómenos sean enmascarados por mutaciones, seguidas de selección. Parece, pues, evidente, que el crecimiento en un nuevo huésped, la partícula de fago sufre algunas modificaciones en su material fisiológicamente activo, pero no de su material genético, hereditario, que altera su capacidad a iniciar el proceso de reproducción, en algún huésped.

#### 6. *El fenómeno de la lisis bacteriana*

El mecanismo por el cual provoca la lisis bacteriana, nos es desconocido. La concepción formada del proceso lítico por D'Herelle (2), basada naturalmente sobre la hipótesis de que el bacteriófago es un virus, es sencilla y rectilínea. Cree que una partícula de virus se introduce en la bacteria en germinación, y se multiplica en su interior, originando así una disgregación más o menos explosiva, una vez alcanzados los límites de distensión. Burnet, en su revisión del 34, apoya esta hipótesis (141). No interesa revisar el enorme cúmulo de opiniones emitidas en relación con este fenómeno. Cada investigador se consideraba obligado a dar una opinión. Lo que sí es cierto es que la lisis del coli por los fagos es particularmente misteriosa.

Bronfenbrenner, en 1938 (142), piensa que un fraccionamiento en su metabolismo sufrido por la bacteria con infección de virus, va acompa-

ñado de cambios hidrolíticos, aumentando la presión osmótica intracelular. Esta hinchazón, como consecuencia de la entrada eventual de agua, rompe la membrana celular. La lisis es atribuída a un indirecto aspecto de la acción enzimática, en el que el papel de virus es solamente el de un estímulo a la reacción autolítica. Creemos que merece la pena el análisis de algunos recientes hechos, algunos de ellos revisados en este trabajo, que pretenden hacer luz en este tan oscuro problema de la lisis bacteriana por fagos. Por otra parte, los trabajos ya mencionados de De Mars, Luria, etc. (52), demuestran que la lisis no está ligada a la producción del fago infeccioso, ya que puede presentarse en presencia de la proflavina que, como sabemos, conduce a la formación de partículas de fago incompletas. Se ha dicho que la liberación del fago se presenta en algunos casos antes de que la lisis sea visible, posiblemente como resultado de una lesión localizada en la superficie de la membrana bacteriana, que puede conducir a la salida del contenido celular. Lo corriente es que la lisis vaya acompañada de la liberación del fago, y que parece ser tiene lugar por ruptura brusca de la membrana bacteriana, dejando frecuentemente una envoltura celular vacía, que posterior y lentamente se desintegra. Nos es desconocido el mecanismo químico o físico-químico de la lisis; ésta puede implicar la acción de enzimas bacterianos o del fago, o de ambos. Por un lado, la presencia de sustancias bacteriolíticas, producidas por las bacterias bajo el estímulo del fago, parece hablar en favor de la intervención de enzimas bacterianos en el proceso lítico. Los trabajos de Gratia (143) demuestran que, después de la lisis bacteriana por fago, la bacteria muy frecuentemente libera sustancias líticas que actúan sobre otros gérmenes, pero no hay prueba alguna de que estas lisinas sean específicas del fago. Por otro lado, la duración específica del período latente entre infección y lisis, que para el mismo germen puede variar de 15' a 50', según el tipo de fago, sugiere un papel del fago en la determinación del curso de la lisis. El período latente queda constante, aun cuando el tiempo de la generación bacteriana sea variado cinco veces por cambios en la composición del medio. Esto indica la independencia en el mecanismo de síntesis de la bacteria. En infecciones mezcladas con fagos T1 y T2, con un período corto y largo de latencia respectivamente, la lisis y liberación del T2 ocurre después del período de latencia del fago excluído. Sustancias bacteriolíticas han sido obtenidas por Anderson (144) de bacterias irradiadas con UV, las cuales son fácilmente lisadas por

lisocima obtenida de clara de huevo, o por lisina separada de un purificado de fago T2. Estas bacterias irradiadas se lisan espontáneamente en un apropiado PH; el papel de estas lisinas en el normal proceso de la lisis bacteriana es desconocido. En algunos casos, la acción lítica es debida a la envoltura o «ghots» aislados de las partículas de fago rotas.

## V. COLICINAS Y BACTERIOFAGOS

Las colicinas eran descubiertas por Gratia y ampliamente estudiadas por Fredericq (145). Producida por determinadas cepas de *E. coli*, son capaces de matar bacterias sensitivas de la misma especie. Esta raza, designada coli V, produce una sustancia antibiótica muy activa, termolabile a más de 100°, extremadamente difusible, precipitable por la acetona, no antigénica y que se denominó principio V. Ella ejercía una acción sobre otra raza coli llamada coli V, así como sobre una cepa de *Sh. dysentérica*. Fredericq ha comprobado que numerosas razas de *Shigelas* y raramente algunas *Salmonellas*, producen también sustancias antibióticas que en apariencia son idénticas a las que producen los *E. coli*, y que deben entrar en el grupo de las colicinas. Las colicinas matan las células sensibles sobre las cuales ellas actúan, siendo su actuación muy específica. Su acción se limita, en efecto, a la familia de las enterobacteriáceas, y cada colicina no ataca jamás más que un determinado número de razas de los diferentes géneros de esta familia. Los colis y shigelas son a menudo sensibles a una o varias colicinas, mientras que las salmonellas, *aerobacter* y sobre todo los *proteus*, lo son muy raramente.

La distinción de 17 colicinas distintas según las cepas antibióticas consideradas, ha sido basada sobre la especificidad de los mutantes resistentes que ellos seleccionan. Ciertas colicinas pueden ser un complejo de varias sustancias en proporción variable, según las razas que la producen, poseyendo algunas propiedades distintas, pero una especificidad de acción casi idéntica. Se pueden, pues, definir las colicinas como sustancias o complejos de sustancias antibióticas difusibles, específicas, producidas por determinadas cepas de enterobacteriáceas y cuya acción bactericida no se ejerce más que sobre otras razas de la misma familia.

Ahora bien: se ha podido comprobar que muchas razas lisógenas en la familia de las enterobacteriáceas, son productoras de colicina. Por otra parte, el estudio de la flora antibiótica en el curso de diversas afecciones

intestinales, especialmente en las paratíficas B, se ha aislado mucho más a menudo que en sujetos normales, razas productoras de colicina B. Se ha comprobado, a su vez, que los fagos activos frente al paratífico B, son encontrados, muy a menudo también, en las heces de enfermos de este tipo. El estudio llevado a cabo por Fredericq (145) del espectro de actividad de numerosas colicinas, demuestra su especificidad y que están en posesión de un campo de acción muy diferente. Unas inhiben el desarrollo de los gérmenes del género *Escherichia*; otras están especializadas en el ataque de las *Shigellas*; otras, las menos, actúan sobre los *aerobacter* y las *Salmonellas*. Esta variable especificidad es observada también en el bacteriófago.

Ya en el 32 Gratia había notado un estrecho paralelismo en la forma en que una raza lisógena produce fago, y la forma en que una raza de coli V produce su principio activo. Fredericq confirma ampliamente la semejanza de estos dos fenómenos. Igualmente que la propiedad lisógena, la producción de una colicina determinada es un carácter hereditario muy estable; el coli V, aislado en el 25 por Gratia, sigue produciendo actualmente la misma colicina; igualmente que las razas lisógenas, no son sensibles al fago que ellas portan, pero son eventualmente sensibles al mismo título que las razas no lisógenas a otros fagos; así, las cepas colicinogénicas no son jamás sensibles a la colicina que ellas producen, pero pueden ser inhibidas por otras colicinas. De la misma forma que ciertas razas lisógenas pueden liberar varios fagos, determinadas cepas antibióticas producen dos y algunas veces tres colicinas. Por otra parte, la morfología de la zona de inhibición producida sobre *gelosa* es muy variable, según la cepa antibiótica, y depende de la naturaleza de las colicinas que ellas produzcan. Las diferencias en la morfología de las zonas de inhibición determinada por las diversas cepas productoras de colicilina son comparables a las diferencias observadas en las manchas de lisis producidas por los diferentes fagos. Lo mismo que hay fagos de grandes y pequeñas placas, hay razas productoras de colicilina de grandes y pequeñas zonas de inhibición. Como la sensibilidad a las diferentes colicilina, son comparables a las diferencias observadas en las manchas sensible presenta un solo punto de ataque característico de tipo, de sensibilidad de este germen e idéntico para todas las colicinas a las cuales él es sensible, o sí, al contrario, él presenta diferentes puntos de ataque específico de cada una de estas colicidinas. En otros términos: una raza sensible posee un solo receptor de antibiosis, cuya naturaleza determina

la sensibilidad particular de esta raza, o bien presenta varios receptores de antibiosis, cuyo número determina la extensión de su sensibilidad.

El estudio de los mutantes resistentes muestra que un germen sensible presenta varios receptores de antibiosis específica de cada una de las colicinas a las cuales él es sensible. La mutante resistente de una cepa sensible a varias colicinas no pierde en bloque la sensibilidad general de esta raza, sino únicamente la sensibilidad a la colicina que la ha seleccionado, conservando frente a las otras colicinas una sensibilidad idéntica a la de la raza de la cual deriva.

La presencia de estos receptores de colicinas es una propiedad hereditaria, estable, característica de cada raza, pero susceptible de desaparecer por mutación. Las mutaciones que interesan los receptores de colicina se producen independientemente de los otros caracteres de la raza madre, e inversamente, la mutación que afecta a los otros caracteres no actúa sobre los receptores de colicinas.

Por lo tanto, las mutaciones que interesan los receptores de colicina son absolutamente comparables a las mutaciones que afectan los receptores del fago, es decir, estos receptores se comportan como los de colicina. Sin embargo, ellos son independientes y distintos. En efecto, el estudio de mutantes derivados de una raza sensible a la vez, a numerosas colicinas y variables fagos, muestra que la mutante resistente a una colicina determinada conserva, frente a las otras colicinas y fago, una sensibilidad idéntica a la de la raza madre que ella deriva, y que la mutante resistente a un determinado fago queda sensible a los otros fagos y colicinas activos sobre la cepa original; sin embargo, Bordet (146) comprueba que una mutante obtenida por resistencia a un fago, había perdido su sensibilidad a la colicina V. Fredericq (145), lleva a cabo experimentos de cruce entre colicina E y fago II de una parte, y entre colicina K y fago III sobre mutantes derivadas de diversas cepas sensibles, confirmando la existencia de resistencia cruzada. Siguiendo la técnica de Lederberg de cruzamiento genético, se comprueba, sin ninguna excepción, que todas las recombinantes que han heredado la resistencia a la colicina E, éstos sólo son resistentes al fago II; y las recombinantes que heredan la resistencia a la colicina K son resistentes al fago III. Las razas sensibles a la vez a las colicinas E y K y a los fagos II y III, poseen, pues, un receptor común a las colicinas y fagos correspondientes.

Ahora bien, Jacob y colaboradores (147), descubrieron que las bacterias colicinogénicas *E. coli* ML pueden ser inducidas a producir colicina

ne la luz UV. Normalmente, la bacteria colicinogénica, no contiene cantidades perceptibles de colicina; pero, después de la irradiación, la síntesis de la colicina se inicia y ella se acumula en el interior de la bacteria; se produce la lisis alrededor de los 70'. Durante este latente período, la bacteria continúa desarrollándose, sintetiza enzimas respiratorios, ácido RNA y DNA, tiene aptitud para sintetizar enzimas de adaptación y es factible la evolución de un fago virulento. La respuesta a la UV de las bacterias colicinogénicas es controlada por su estado fisiológico en igual forma que la bacteria lisogénica.

El estudio de la bacteria sensitiva muerta, ha revelado que una partícula de colicina es suficiente para matar una bacteria; la constante de absorción  $K = 8 \times 10^{-10}$  cen/min. es del mismo orden de tamaño que para el fago. Una bacteria que ha absorbido una partícula de colicina, inmediatamente cesa en su desarrollo, su respiración queda constante. El efecto de la colicina sobre el fago es comparable al de la proteína de la cola del fago T2, responsable por la unión al receptor y probablemente por la actividad letal de los «ghots». Esta proteína del tallo es, como ha demostrado Lannis (148), serológicamente diferente de la proteína de la envoltura del fago. Similarmente, una raza de *P. pyocyanea* irradiada, sintetiza una sustancia bactericida, piocina, que es liberada por lisis y actúa sobre una raza de su misma especie (Jacob-55b).

El término bacteriocina ha sido propuesto por Jacob y colaboradores (139) para designar aquellas sustancias que poseen las propiedades generales de la colicina y piocina. Pudiera admitirse la hipótesis de que las bacterias bacteriocinogénicas están relacionadas a las lisogénicas en el sentido de que ellas poseen genéticamente la capacidad a formar una proteína que corresponde a la proteína del tallo de un fago. Pero en forma alguna puede admitirse que la bacteriocinogenia sea un paso en la filogenia de la lisogenia (Jacob y colaboradores-150).

Resumiendo: las colicinas, como el fago, están presentes en las bacterias normales, las cuales sostienen hereditariamente el poder a sintetizarlas. Son sustancias antibióticas, difusibles, producidas por determinadas razas de enterobacterias, mientras que los fagos son unidades biológicas transmisibles dotadas de continuidad genética. Las colicinas y bacteriófagos son agentes de la naturaleza esencialmente distintos. Estos dos agentes ofrecen, sin embargo, ciertas semejanzas. Las cepas colicinógenas tienen una distribución y un espectro de actividad comparable a las razas lisógenas. Las colicinas que ellas producen se com-

portan en más de un aspecto como los bacteriófagos, y actúan especialmente sobre las cepas sensibles, por intermedio de receptores comparables, pero distintos. La absorción es controlada por un receptor específico, algunas veces común al fago y a la colicina. Las relaciones no se limitan, pues, a simples analogías, sino que se traducen algunas veces por relaciones mucho más estrechas, como lo demuestra el hecho enunciado de la existencia del receptor común para ambos.

Las colicinas se diferencian del fago por el hecho de que ellas no se multiplican y que su acción no es transmisible en serie. Sin embargo, ciertos fagos ejercen una acción bactericida y no se transmiten en serie, lo que prueba que esta transmisión es independiente de su facultad de multiplicarse. El factor responsable de la acción bactericida no determina su especificidad serológica, pero sí su especificidad de acción, y se fija sobre el mismo receptor bacteriano que la colicina K, lo que parece probar que este factor es una sustancia aparentemente idéntica a colicina K. Además, el fago es reproducido en la bacteria que él mata; las colicinas no se reproducen. Por otra parte, la intervención en la constitución de las partículas de ciertos fagos de una sustancia producida normalmente por las bacterias, es evidentemente susceptible de aclarar muchos puntos todavía oscuros en el origen y naturaleza del fago. En la constitución de las partículas del fago intervienen las nucleoproteínas dotadas de continuidad genética, mientras que las colicinas son proteínas. El fago es reproducido en la bacteria muerta; las colicinas no se reproducen.

*(Concluirá.)*