VOLUMEN 13. 1960 ABRIL - JUNIO. NUMERO 2

Microbiología Española

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

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

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

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

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

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

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 pta.; extranjero, 240 pta. Número: España, 20 pta.; extranjero, 30 pta.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI" (Estación Experimental de "Aula Dei". Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 pta.; extranjero, 160 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 50 pta.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES" [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto "A. J. de Cavanilles". Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 pta.; extranjero, 220 pta. Número: España, 200 pta.; extranjero, 230 pta.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España: 150 pta.; extranjero, 175 pta. Número: España, 160 pta.; extranjero, 185 pta.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 pta.; extranjero, 100 pta. Número: España, 45 pta.; extranjero, 60 pta.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 165 pta. Número: España, 30 pta.; extranjero, 60 pta.

CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 160 pta. Número: España, 30 pta.; extranjero, 45 pta.

COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 125 pta. Número: España, 110 pta.; extranjero, 135 pta.

CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO "LUCAS MALLADA" (Instituto "Lucas Mallada", de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 pta.; extranjero, 80 pta. Número: España, 60 pta.; extranjero, 70 pta.

ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto "Lucas Mallada", de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 pta.; extranjero, 200 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 60 pta.

FARMACOGNOSIA (Instituto "José Celestino Mutis", de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 80 pta.; extranjero, 120 pta. Número: España, 25 pta.; extranjero, 40 pta.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis", de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 70 pta.; extranjero, 110 pta. Número: España, 20 pta.; extranjero, 30 pta.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 pta.; extranjero, 150 pta. Número: España, 40 pta.; extranjero, 60 pta.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

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

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

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

Páginas

Comportamiento de la flora bacteriana aeróbica de lactantes frente a los antibióticos, por *María Luisa Alonso* y *Antonio Portolés* 101

Nuevo estudio biológico del género *Azotobacter* (descubrimiento de sus formas *L*) (Conclusión), por *J. Morales* 111

Characterization of a newly isolated strain of Actinomycete identified as *Nocardia V.*, by *Julio Rodríguez-Villanueva* .. 169

Estudio de la acción de varios compuestos de amonio cuaternario frente a los virus vacunal y encefalíticos equinos Este y Oeste, por *Emilio Ronda Laín* 187

Conferencia en la Academia de Ciencias de Nueva York, por *L. Sánchez* 221

Actas de la Sociedad 223

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

COMPORTAMIENTO DE LA FLORA BACTERIANA AEROBICA DE LACTANTES FRENTE A LOS ANTIBIOTICOS

POR

M.ª LUISA ALONSO y ANTONIO PORTOLES

La etiología y terapéutica de diarreas infantiles crea problemas de cierta complejidad, según se desprende de los Seminarios que la O. M. S. organizó sobre estos procesos de la patología infantil (1956-57) y de la reunión de Ginebra acerca de las enfermedades diarreicas (1958).

Dado que, si bien es preciso admitir en muchos casos que existe un componente de nutrición anómala o deficitaria, lo cierto es que en todos puede encontrarse un cuadro larvado o patente de parasitización intestinal microbiana o protozoica, hemos considerado interesante completar los 107 exámenes bacteriológicos llevados a efecto en heces de lactantes, con el estudio del antibiograma de las cepas aisladas frente a antibióticos y asociaciones, sin conceder menos importancia a aquellas cepas que la sistemática señala como no patógenas. El presente trabajo constará de una parte en la que trataremos de aislamiento y caracterización de especies bacterianas en las 107 muestras de heces de lactantes, elegidas al azar, sin pretender sacar conclusiones definitivas en cuanto a encuestas estadísticas se refiere, sino buscar tan solo una orientación bastante precisa de las especies más frecuentes encontradas; y de otra en la que al conocer el comportamiento de dichas especies frente a los antibióticos, sea posible determinar qué inhibidor antibacteriano presenta con mayor frecuencia potente acción bacteriostática *in vitro*, para conseguir orientación acerca de una posible terapéutica correctora de un cuadro clínico diarreiforme atípico.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de heces, recogidas de niños de dos a seis meses de edad, aparentemente sanos una parte de ellos y algunos con cuadro diarreiforme no bien determinado, proceden en su mayoría del Instituto Provincial de Puericultura de Madrid.

Las técnicas utilizadas fueron las de uso ordinario en nuestro laboratorio y con las que verificamos los coprocultivos de modo sistemático (1-6), consiguiendo magníficos resultados en el aislamiento de especies microbianas, que después identificamos según las pautas de los tratados de Bergey y de Dumas. La determinación de antibiograma simultáneo frente a antibióticos aislados y asociados, la efectuamos sobre medio sólido con metódica análoga a la de otras ocasiones (7), pero empleando *cup standard*.

RESULTADOS

a) Examen microbiológico por coprocultivo

Cuadro 1. En cuanto a la procedencia de las muestras

Grupo	Edad de los niños	Estado físico	Número de muestras	Observaciones
A	De dos a cuatro meses	Sanos	31	Proceden, en el 82 por 100 de los casos, del Instituto Provincial de Puericultura; en el 11 por 100, de un medio hospitalario militar, y en el 7 por 100, de procedencia variable
B		Enfermos	27	
C	De cuatro a seis meses	Sanos	38	
D		Enfermos	11	
Total de muestras examinadas			107	

Cuadro 2. En cuanto al comportamiento fisiológico de las cepas aisladas

Características	Número	Porcentaje
Retienen el color del Gram	72	27,4
Cepas móviles	94	42,0
Licuantes de gelatina	22	9,7
Reductoras de rojo neutro	121	53,9
Reductoras de rojo de metilo	87	34,0
Productoras de acetilmetilcarbinol	56	24,7
Productoras de indol	96	42,5
Fermentadoras de urea	93	42,0
Utilizadoras de citrato	33	14,6
Productoras de SH_2	18	7,9
Fermentadoras de glucosa	196	86,7
Fermentadoras de lactosa	130	57,5
Con virulencia para el ratón	48	13,3
Hemolíticas	29	21,2

Otras características eubióticas son: su buen crecimiento en agar común (menos 7 por 100, que crecieron pobremente) y caldo común (menos un 23 por 100, con desarrollo limitado, aunque uniforme), y un elevado porcentaje de cepas resistentes a los medios hostiles (86 por 100).

Cuadro 3. En cuanto a su identificación, características ecológicas en el hábitat intestinal y de acuerdo con las pruebas de virulencia

Especies identificadas	Número	Porcentaje de patógenas	Porcentaje de saprofitas
Escherichia coli	91	9,98	90,02
Escherichia intermedium	3	0	100,00
Aerobacter aerogenes	28	8,90	91,10
Klebsiella sp.	11	0	100,00
Proteus	31	9,70	90,30
Enterococos	51	2	98,00
Estafilococos	4	1 cepa (*)	3 cepas
Difterimorfos	4	0	100,00
Bacillus subtilis	3	0	100,00
Total de cepas identificadas	226	7,80	92,20

(*) Este resultado no se considera porcentuable.

Cuadro 4

N.º	Antibióticos	Coliformes			Enterococos			*Proteus*			*Klebsiella*		
		R (*)	SL	S	R	SL	S	R	SL	S	R	SL	S
1	*Penicilina*	104	18	0	33	16	2	28	2	0	7	3	0
2	Pen. + dihidroestreptomicina	19	79	24	27	21	3	26	4	0	3	2	5
3	Pen. + cloramfenicol	16	80	26	13	25	13	23	7	0	2	2	6
4	Pen. + tetraciclina	24	53	45	15	27	9	25	5	0	3	3	4
5	Pen. + clorotetraciclina	24	54	48	17	23	11	24	6	0	3	2	5
6	Pen. + oxitetraciclina	16	61	44	16	22	13	23	7	0	1	3	6
7	Pen. + eritromicina	67	12	43	10	18	23	19	11	0	7	3	0
8	Pen. + polimixina B	62	13	47	13	19	19	13	17	0	6	2	2
9	Pen. + novobiocina	52	28	42	7	22	22	16	14	0	4	4	2
10	*Dihidroestreptomicina*	13	100	9	36	15	0	22	8	0	3	7	0
11	Dihidr. + cloramfenicol	7	24	91	9	24	18	15	13	2	1	2	7
12	Dihidr. + tetraciclina	17	82	23	26	8	17	15	15	0	3	2	5
13	Dihidr. + clorotetraciclina...	15	82	25	25	13	13	13	17	0	2	2	6
14	Dihidr. + oxitetraciclina	13	81	28	26	14	11	11	19	0	3	2	5
15	Dihidr. + eritromicina	71	42	9	22	12	17	19	11	0	6	2	2
16	Dihidr. + polimixina B	63	34	20	20	14	17	18	10	2	5	3	2
17	Dihidr. + novobiocina	89	24	9	13	18	20	20	10	0	6	3	1
18	*Cloramfenicol*	11	47	62	22	12	17	20	8	2	5	3	2
19	Cloramf. + tetraciclina	20	81	21	19	13	19	14	14	2	4	3	3
20	Cloramf. + clorotetraciclina	17	79	26	19	9	23	13	14	3	3	4	3
21	Cloramf. + oxitetraciclina	15	85	22	19	11	21	13	14	3	2	6	2

23	Cloramf. + polimixina B	48	52	22	10	23	19	12	18	0	4	4	2
24	Cloramf. + novobiocina...	35	67	20	4	21	26	17	13	0	3	7	0
25	*Tetraciclina*	33	47	42	25	7	19	30	0	0	6	3	1
26	Tetrac. + clorotetraciclina...	28	47	47	20	14	17	28	2	0	3	4	3
27	Tetrac. + oxitetraciclina	27	45	50	18	16	17	20	10	0	2	5	3
28	Tetrac. + eritromicina	47	50	25	10	26	15	17	11	2	3	7	0
29	Tetrac. + polimixina B...	39	52	31	16	24	11	16	12	2	4	4	2
30	Tetrac. + novobiocina	56	49	15	16	18	17	30	0	0	3	5	2
31	*Clorotetraciclina*	37	38	47	21	9	21	27	3	0	4	4	2
32	Clorot. + oxitetraciclina	29	48	45	19	11	21	26	4	0	4	3	3
33	Clorot. + eritromicina	55	39	28	9	26	16	17	12	1	6	2	2
34	Clorot. + polimixina B	37	55	30	16	21	14	21	9	9	3	5	2
35	Clorot. + novobiocina	60	49	13	15	20	16	15	15	0	5	5	0
36	*Oxitetraciclina*	37	48	37	19	13	19	19	11	0	2	6	2
37	Oxitetrac. + eritromicina	55	40	27	8	24	19	15	11	4	3	5	2
38	Oxitetrac. + polimixina B	39	55	26	11	25	15	20	3	7	8	2	0
39	Oxitetrac. + novobiocina	50	56	16	14	23	14	10	18	2	3	6	1
40	*Eritromicina*	113	9	0	13	28	10	30	0	0	8	2	0
41	Eritr. + polimixina B	81	35	6	10	29	12	19	10	1	7	2	1
42	Eritr. + novobiocina...	74	48	0	6	13	32	17	9	4	9	0	1
43	*Polimixina*	23	76	13	20	26	5	27	3	0	8	1	1
44	Polim. + novobiocina	27	78	17	9	20	22	22	6	8	7	2	1
45	*Novobiocina*...	115	7	0	16	20	15	28	2	0	7	2	1

(*) *R* = Resistentes. SL = Sensibilidad limitada. S = Sensibles.

b) Comportamiento frente a los antibióticos

El estudio se realizó frente a soluciones patrón, preparadas por nosotros, de penicilina, dihidroestreptomicina, cloramfenicol, tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina, polimixina B y novobiocina y todas las combinaciones binarias posibles entre ellas, actuando sobre medio sólido y con *cup standard,* en lugar de siluetas múltiples, como en otras ocasiones.

De este modo, pudimos comprobar que se trataba de cepas fuertemente polirresistentes, cuyo crecimiento era inhibido especialmente por algunas asociaciones antibióticas. De su comportamiento dan idea los resultados que se recogen en el cuadro 4.

Los valores de inhibición obtenidos para estafilococos, difterimorfos y *B. subtilis* no se prestan a consideraciones detalladas por el breve número de cepas aisladas y por su comportamiento sensible frente a la mayoría de los antibióticos ensayados; bastará, por tanto, consignar que las asociaciones que resultaron más eficaces en la inhibición del desarrollo de estas cepas fueron: cloromicetina + estreptomicina, para estafilococos; penicilina + eritromicina, para difterimorfos; y penicilina + estreptomicina, para *B. subtilis.*

Una clara visión de conjunto se obtiene de la observación de la figura 1, en la que se consideran los tres grupos principales: coliformes (*Escherichia* y *Aerobacter*), enterococos (estreptococos del grupo D, de Lancefield) y *Proteus* y *Klebsiella,*

CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS RESULTADOS

Antes de iniciar estas consideraciones, nos parece oportuno poner de relieve que nuestro criterio admite la posibilidad de una eclosión de virulencia en un momento dado y por mecanismos no bien conocidos, para una determinada flora compleja parásita habitual de un organismo superior, máxime cuando otras veces tuvimos ocasión de comprobar que las asociaciones bacterianas —de las que el intestino humano es hábitat de preferencia— predisponen a la aparición de patogenicidad, no sólo porque ciertas subinfecciones vengan a agravar un cuadro infeccioso ya preexistente por un mecanismo de adición, sino porque en determinados

casos, gérmenes poco o nada patógenos aportan condiciones determinadas y necesarias de óxido-reducción, modifican la constitución de los humores tisulares o paralizan los procesos naturales de defensa, dando ocasión a que estos gérmenes —posiblemente también saprofitos— resulten patógenos, estableciéndose entre ellos una verdadera simbiosis. Nosotros hemos tenido ocasión de aislar especies patógenas en casos aparentemente normales y sin manifestación clínica alguna, así como también cepas saprofitas sin patogenicidad aparente en casos en los que un cuadro clínico diarreiforme era patente; si ello entra o no en el capítulo de los "dismicrobismos", no es ahora momento de considerarlo. En este caso, pretendemos tan sólo conocer las características microbiológicas de la flora intestinal con su personalidad o intervención fisiológica y su sensibilidad a los fármacos antimicrobianos capaces de inhibir su crecimiento.

Así, hemos podido comprobar el predominio de especies coliformes y enterococos, existiendo tan solo un 7,80 por 100 de especies definidas como patógenas, entre las que predominan cepas de *E. coli* (9,98 por 100), *P. vulgaris* (9,7 por 100) y *Aerobacter aerogenes* (8,9 por 100); entre los enterococos tan sólo se ha encontrado un 2 por 100 de estirpes patógenas. Como ya dijimos anteriormente, algunas de estas bacterias se han aislado de los grupos A y C (cuadro 1). Pese a que la gran mayoría de especies aisladas era calificada como saprofita (92,2 por 100), muchas de ellas se corresponden con cuadros diarreiformes englobados en los grupos B y D (cuadro 1).

En cuanto a su comportamiento fisiológico, se encuentra predominio de acciones reductoras y fermentadoras de carbohidratos, o sea que se trata en su mayor parte de heces con flora bacteriana de elevado potencial de óxido-reducción y fermentescibles, poco proteolíticas, de escasa virulencia experimental (13,3 por 100 para el ratón) y con gran capacidad de resistencia a los medios hostiles (86 por 100).

Por último, al examinar el comportamiento frente a los antibióticos, podemos decir —en relación con los antibióticos aislados— que para los gérmenes Gram-negativos manifestó una más intensa acción bacteriostática el cloramfenicol, seguido del grupo de las tetraciclinas y dihidroestreptomicina, para la que se encontró un elevado porcentaje de especies con sensibilidad limitada, como una expresión de su capacidad para provocar estreptomicin-resistencias, según hemos visto ya sobre

placa, de acuerdo con el fenómeno conocido como "tailing" por los autores anglosajones. En la flora Gram-positiva es posible señalar como más efectivos a la eritromicina y polimixina B, seguidos de las tetraciclinas y cloramfenicol.

Para las asociaciones binarias de antibióticos —pese a la irregularidad de su conducta—, de acuerdo con las características individuales de cada cepa, existe *antagonismo* para novobiocina + cloramfenicol, tetraciclina o clorotetraciclina, y para cloramfenicol + eritromicina; estas acciones antagónicas fueron predominantes en el grupo de los colibacilos. En bastantes ocasiones puede titularse de *indiferente* el comportamiento conjunto de dos antibióticos frente a enterococos, *Proteus* y *Klebsiella;* estas acciones fueron más patentes para dihidroestreptomicina + tetraciclina o eritromicina, para clorotetraciclina + polimixina B, y para asociaciones entre dos substancias del grupo tetraciclínico.

Fenómenos de *aditividad,* pocas veces observados, se encuentran entre asociaciones de penicilina + oxitetraciclina, cloramfenicol + polimixina B y eritromicina + novobiocina.

Y por último, *sinergismos* patentes se producen entre penicilina + dihidroestreptomicina, eritromicina o polimixina B; dihidroestreptomicina+cloramfenicol; tetraciclina+eritromicina o polimixina B; y oxitetraciclina + eritromicina o polimixina B. Todo ello, contando con que antes de juzgar los resultados hemos tenido en cuenta observaciones pertenecientes a otro grupo de experiencias, que nos permiten enjuiciar, dentro de ciertos límites (admisibles para la clínica), si el mayor o menor efecto inhibidor observable se corresponde con una actividad biológica frente al microorganismo o es una interacción de tipo físico entre dos antibióticos que se difunden conjuntamente en el medio.

Así, parecen presentar mayor poder bacteriostático penicilina + dihidroestreptomicina, y dihidroestreptomicina + cloramfenicol, frente a los coliformes; penicilina + eritromicina, frente a enterococos y difterimorfos; penicilina + polimixina B, y dihidroestreptomicina + cloramfenicol, frente a *Proteus;* y también la última asociación citada y la de penicilina + oxitetraciclina, frente a cepas de *Klebsiella.*

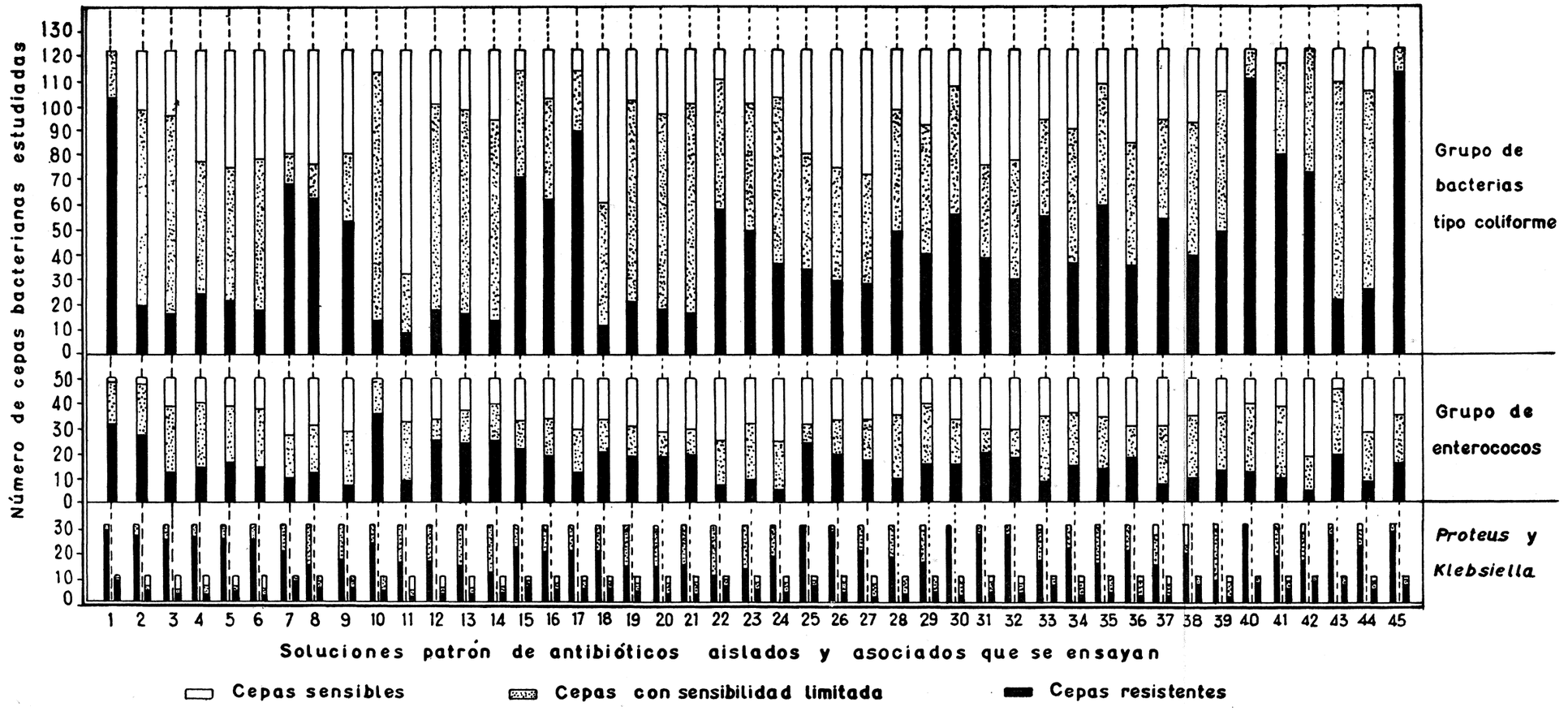

Número de cepas bacterianas estudiadas
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50
40
30
20
10
0
30
20
10
0
Grupo de bacterias tipo coliforme
Grupo de enterococos
Proteus y Klebsiella
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
Soluciones patrón de antibióticos aislados y asociados que se ensayan
Cepas sensibles
Cepas con sensibilidad limitada
Cepas resistentes

Figura 1

RESUMEN

Se realiza el examen bacteriológico de 107 muestras de heces procedentes de lactantes de diferentes edades y ambiente social, sacando conclusiones acerca de las características de su flora bacteriana aeróbica.

Se estudia su comportamiento frente a 9 antibióticos aislados y sus 36 combinaciones binarias posibles.

Se concluye acerca de la utilidad de determinadas asociaciones, en especial dihidroestreptomicina + cloramfenicol, y penicilina + eritromicina, para la inhibición de flora Gram-negativa y Gram-positiva, respectivamente, con vistas a contribuir al estudio de la antibioterapia de cuadros atípicos diarreiformes infantiles.

SUMMARY

In this work the authors have realized the bacteriological test on 107 samples of feces from babies of differents ages.

Conclusion have been made about the aerobic microorganisms. Their behaviour with 9 antibiotics and their 36 binary combinations has been studied.

It has been proved the advantage of same combinations specially, dihydrostreptomycin with chloramphenicol, and penicillin with eritromycin for the inhibition of the respectivelly Gram-negative and Gram-positive microorganisms.

To contribute to the study of the antibiotherapy of not typical children diarrhoeas.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso Puertas, M.ª L., y Portolés, A. 1958. Medicamenta, 20, 213-217.
2. Portolés, A. 1958. Medicamenta, 19, 103-108.
3. Portolés, A. 1958. Medicamenta, 19, 135-140.
4. Portolés, A. 1958. Medicamenta, 19, 260-266.
5. Portolés, A. 1958. Medicamenta, 19, 339-343.
6. Portolés, A. 1958. Medicamenta, 20, 18-26.
7. Socías, A., y Portolés, A. 1956. Microbiol. Españ., 9, 353-374.

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

NUEVO ESTUDIO BIOLOGICO DEL GENERO *AZOTOBACTER* (DESCUBRIMIENTO DE SUS FORMAS *L*)

(Conclusión.)

POR
J. MORALES

FORMAS Y CICLOS BIOLOGICOS

Antecedentes

Las formas y ciclos biológicos del *Azotobacter* han sido muy estudiados desde antiguo y nos interesan especialmente dos puntos de vista: uno, pleomorfista, que se inicia con las ideas de Prazmowsky (93), y posteriormente ha sido muy desarrollado por Löhnis (65 y 67-69); y otro, monomorfista, cuyo principal representante es Winogradsky (117), a quien siguen por lo general los autores modernos.

Löhnis, en sus numerosos trabajos, algunos de ellos muy extensos, como el de 1921, hace un estudio experimental y especialmente bibliográfico sobre las formas y el ciclo biológico del *Azotobacter*. En estos trabajos describe muchas formas, diversidad de ciclos, pero de manera confusa y desordenada, sin explicar perfectamente el origen ni el significado que puedan tener estas formas y sin describir métodos concretos de obtención. En sus trabajos encuentra las pequeñas formas filtrables, las llamadas gonidios, cuyo nombre toma del botánico Sachs (100), como describiremos más adelante. Los gonidios han sido posteriormente descritos por Bisset. Otras formas que describe Löhnis son: grandes bacilos esporulados, bacilos no esporulados, formas filamentosas y elementos pequeños. Hemos podido, por las descripciones que hace este autor y por la forma que tienen de originarse, comparar algunas de ellas con las que

hemos encontrado en los ciclos *L.* Otras no podemos compararlas con ninguna de las que hemos observado; los bacilos esporulados, por ejemplo. Además, el citado autor se basa para establecer estas formas de bacilos esporulados en unas observaciones microscópicas, que dan la sensación de esporas. Creemos que, teniendo en cuenta el número tan grande de inclusiones que existen en este género, la confusión resulta extremadamente fácil; este autor no recurre a las pruebas de resistencia, mucho más seguras, que a nosotros nos han dado resultados negativos en todos los casos.

Si de las formas pasamos a los procesos de reproducción que describe Löhnis a lo largo de sus trabajos, y especialmente en el correspondiente al año 1921, la confusión resulta aún mayor. Para este autor existen en esta bacteria todos los procedimientos conocidos de reproducción; fusión de células, fusión de gonidios, procedimiento análogos a la gemación, endosporas y exosporas; hasta, en ciertos momentos, artrosporas. Estos procedimientos de reproducción los trataremos nuevamente en páginas posteriores.

Las presentes formaciones y ciclos han sido estudiadas por Lewis (61 y 62) y Jones (50 y 51), sin confirmar estos autores las experiencias de Löhnis de una forma total, tan sólo en algunos aspectos, como la formación de formas filamentosas y gonidios, pero no en la conjugación ni en la formación de bacilos esporulados.

Mención especial, entre las formas descritas por Löhnis, merecen los simplasmas, masas a modo de plasmodios, por las características que él describe, formadas por corpúsculos pequeños o bacilos, que forman una masa única. Para este autor dichas formas tienen movimientos ameboideos y los elementos que las componen no son independientes.

Bisset (7) modernamente también estudia estas formaciones, y las llama simplasmas, formadas por gonidios. Floethmann (37) las considera como una masa de elementos pequeños, que se encuentran unidos por un mucílago característico que envuelve estos elementos, el cual se puede disgregar con agua y fuerte agitación, continuando viables estas formas. Para nosotros, como luego veremos, estos elementos no son mas que formas intermedias del ciclo *L*, unidas por el mucílago característico que envuelve siempre a estas formaciones.

Las ideas monomorfistas de Winogradsky, que lleva a cabo aplicando lo que él llama "principio ecológico", le llevan a la conclusión de que

existen muy pocas formas que se puedan considerar como normales en esta bacteria; para este autor sólo existen bacilos, bacilos con los extremos apuntados mostrando una forma de huso, cuerpos levaduriformes y quistes. En algunos casos describe los quistes pequeños *(nannoquistes),* que no los considera perfectamente normales.

Por "principio ecológico" Winogradsky considera una serie de normas encaminadas a producir en el laboratorio unos medios muy parecidos al natural; él sostiene que para estudiar en el laboratorio estos gérmenes y en general todas las bacterias del suelo, es conveniente acercarse lo más posible a los medios naturales. Teóricamente, este punto de vista es muy biológico, pero la manera de llevarlo a la práctica es muy difícil, y este autor, en los medios que describe, a nuestro juicio, no lo consigue. Los medios que él llama naturales están constituídos por una serie de sales imprescindibles, que ya hemos descrito, y una fuente de carbono única, tal como la glucosa, manitol, acetato cálcico, benzoato de sodio, etc. Tanto las sales como la sustancia carbonada se encuentran muy diluídas, con lo que pretende Winogradsky acercarse exraordinariamente a los medios naturales. Estamos de acuerdo que en el suelo, medio natural del *Azotobacter,* se encuentran las sustancias muy diluídas, pero no es una sustancia única, sino multitud de ellas y, en cuanto a las sales. no sólo existen los cationes imprescindibles, sino muchos más; pero, además, no podemos prescindir de la enorme complejidad química y biológica que existe en el mismo, que le hacen muy diferente de estos medios llamados naturales, enormemente simples, que describe este autor y que debían llamarse, a nuestro juicio, medios sintéticos o sencillos.

Winogradsky ha observado también las formas filamentosas, elementos más o menos hinchados y los pequeños cocos y bacilos que acompañan a los *Azotobacter,* pero este autor interpreta que las formas filamentosas y las hinchadas son elementos degenerados, aberrantes como él llama, originados por cultivos en condiciones desfavorables, y de ahí precisamente la idea del "principio ecológico" para evitarlas. Los pequeños cocos y bacilos que acompañan al *Azotobacter* en sus aislamientos, este autor los considera como formas contaminantes, muy difíciles de separar; este autor se esfuerza en demostrar su naturaleza contaminante y aplica unos métodos rigurosos de aislamiento, como describimos anteriormente, o sea, medios sintéticos, gelatina silícea, pulverización del

inóculo, etc. Por estos procedimientos consigue separar los elementos levaduriformes, únicas formas normales que él considera.

Nosotros interpretamos estos pequeños cocos y bacilos como formas *L* y formas intermedias, y la purificación de Winogradsky se consigue más bien por el empleo de esos medios sencillos, en los cuales las formas *L* no pueden desarrollarse, que por los procedimientos de aislar en sí.

Muchos autores modernos son partidarios de las ideas monomorfistas y emplean estos medios sencillos para sus trabajos, como les ocurre a Floethmann y Eisenstark en sus estudios sobre el núcleo del *Azotobacter*.

Las formas L *en* Azotobacter

Las formas *L* de las bacterias fueron aisladas por primera vez por Klieneberger-Nobel (52) en el año 1935, del *Streptobacillus moniliformis*. Posteriormente, se ha enriquecido enormemente el número de bacterias que son capaces de dar origen a las formas *L*, y son muchos los investigadores que se dedican a estos estudios, siendo Dienes en América, Tulasne en Francia y Klieneberger-Nobel en Inglaterra las figuras más representativas.

Se consideran como formas *L* de las bacterias a elementos sumamente reducidos, con vitalidad individual, y algunos autores, además, consideran como formas *L* a elementos de gran tamaño, después de originar otras formas intermedias entre las bacterias normales y aquellas cuyos elementos de gran tamaño son los que pueden dar origen a las formas pequeñas. Pueden cultivarse en medios artificiales y dar en ellos colonias, fácilmente identificables a simple vista o a la lupa. Estas formas poseen muchas de las propiedades de las bacterias que las han originado, reacciones serológicas, acciones patógenas, cuando existían en las bacterias normales, etc. Poseen, además, otras nuevas surgidas en este cambio: resistencia a ciertos antibióticos, más exigentes en los medios de cultivo, etc. En algunos casos son capaces de dar origen a las formas bacterianas, de las que provienen.

Todas estas formas, en su desarrollo, describen un ciclo, que ha sido estudiado en muchas bacterias, destacando, entre otras, *Proteus*, Dienes (25) y Stempen (110); salmonelas, Dienes (26); siguelas, Howard (46);

Vibrio cholerae, Minck (74), etc., y por el contrario, ningún autor ha descrito estas formas en el género *Azotobacter.*

Nosotros hemos investigado el ciclo del *Azotobacter* buscando las formas *L* y las hemos encontrado. Vemos que en algunos aspectos y formas de este ciclo se pueden encontrar antecedentes en algunos autores anteriores, los cuales no supieron interpretar dichas formas como correspondientes al ciclo *L.*

En el ciclo complejo que origina las formas *L* de las bacterias, hay que distinguir distintos elementos citológicos y momentos del mismo; para las denominaciones, es necesario seguir ciertas normas y son generalmente adoptadas, entre otras, las de Tulasne (112), que resume lo siguiente:

Forma enana. El más pequeño elemento viviente, resultante de la compleja transformación sufrida por las bacterias normales.

Forma gigante. Los elementos mayores resultantes de esta transformación.

Forma intermedia. Todos los elementos de transición que existen entre las formas normales, las formas enanas y las formas gigantes; o viceversa.

Formas L. Término general con que se designan los elementos antes definidos, o sea, las formas enanas, gigantes o intermedias.

Colonias L. Colonias constituídas por los elementos *L,* aislados o mezclados.

Ciclo L. Conjunto de cambios y transformaciones sufridos por las bacterias normales hasta convertirse en las formas *L,* y también todos los cambios que sufren estas formaciones *L* para convertirse en bacterias normales.

Estas denominaciones de Tulasne, a pesar de haber sido muy adoptadas y aclarar gran número de cuestiones, tienen a nuestro juicio algunos aspectos que se prestan a confusión. El término forma intermedia, que utiliza tanto para las que originan las formas que él llama enanas como para las otras formas que dan origen a las bacterias normales, hace que no se sepa claramente cuándo se trata de un proceso u otro. Los términos formas *L* gigantes y formas *L* enanas tampoco nos son satisfactorios,

pues las formas gigantes han sido denominadas desde los primeros tiempos de la Bacteriología como formas de involución, y a nuestro juicio podía continuarse usando este término y reservar la denominación formas *L* para lo que este autor llama formas enanas.

Proponemos las denominaciones siguientes:

Forma L. El más pequeño elemento viviente originado por las formas de involución.

Formas de involución. Elementos de gran tamaño que se originan en la transformación del ciclo *L.*

Formas intermedias de involución. Todos los elementos que se encuentran entre las bacterias normales y las formas de involución.

Formas intermedias de regresión. Todas las formas que se encuentran entre las bacterias *L* y las normales y que van a dar origen a estas últimas.

Colonias L. Colonias constituídas por las formas *L,* que en nuestro caso son las formas enanas de Tulasne. En estas colonias distinguimos dos tipos, las propiamente dichas y las colonias *T,* más pequeñas y de distintas características que las anteriores.

Ciclos L. Conjunto de cambios y transformaciones sufridos por las bacterias normales para convertirse en formas *L* e igualmente la regresión de estas formas a las normales.

Posición sistemática de las formas L

Desde el primer momento, las formas *L* de las bacterias fueron comparadas a los organismos de la pleuroneumonía de los bóvidos, descubiertos por Nocard y Roux (81) en el año 1898 y estudiados modernamente por Sabin (97 y 98), y a los gérmenes que originan la agalaxia contagiosa en las ovejas y cabras, descubierta por Bridre y Donatien en el año 1925. En el "Bergey's Manual", 6.ª ed., están colocados en un apéndice, pág. 1.287, todos ellos mezclados, y concretamente los denomina "organismos de clasificación incierta". Describiendo unas cuantas bacterias o formas *L* de las mismas, de las que se presentan más comúnmente.

El parecido de los organismos del grupo de la pleuroneumonía (o. g. p. n.) y las formas *L* de las bacterias es muy grande. En ambos grupos se originan elementos filamentosos, de gran tamaño, formas redondeadas, también de gran tamaño, y formas pequeñas filtrables, cuyo tamaño es muy semejante para los dos grupos. Macroscópicamente, los dos grupos dan colonias muy parecidas: microscópicas, rugosas, que, según Tulasne (112), es imposible distinguir si no se conoce su procedencia, y no se sabe si se trata de organismos de la pleuroneumonía o las formas *L* de las bacterias.

Fisiológicamente, también los dos grupos son muy parecidos, pues ambos necesitan medios muy ricos en proteínas hidrolizadas, y son especialmente indicados medios que contienen suero, hidrolizado de corazón, extracto de hígado. La resistencia a la penicilina es grande para estos microorganismos. Klieneberger-Nobel, Smith y Mudd consideran estos dos grupos de organismos como distintos, mientras que Oerkow y Freundt, en sus primeros trabajos, como igualmente Dienes y Tulasne, suponen que los organismos de la pleuroneumonía son formas *L* procedentes de antiguas bacterias fijadas y muy adaptadas a la vida parasitaria de un organismo determinado.

Modernamente, casi todos los autores están de acuerdo en formar dos grupos. Tulasne, recientemente (114), las considera, a las primeras, como pertenecientes a lo que él llama orden Pleuropneumoniales, y a las segundas, como las Bactepneumoniales; Klieneberger-Nobel (54) también considera en este trabajo a los organismos del grupo de la pleuroneumonía distintos de las formas *L* de las bacterias. Aunque las analogías son grandes, se pueden citar modernamente como diferencias, que las formas *L* no siempre producen colonias pequeñas como el grupo de los o. g. p. n., sino que algunas veces son de gran tamaño. En los medios líquidos, las formas *L* se desarrollan formando grumos, a diferencia de los o. g. p. n. Edward y Freundt (31) los consideran como dos grupos bien definidos y han comprobado que existen diferencias fisiológicas como, por ejemplo, que los o. g. p. n. necesitan colesterol para crecer y las formas *L* pueden prescindir de él. Estos autores han comprobado que las colonias pueden también distinguirse entre los dos grupos y hacen una experiencia mezclando o. g. p. n. aislados de un absceso submaxilar de una rata y formas *L* de un cultivo de *Streptobacillus moniliformis,* que, incubados, daban colonias fácilmente distinguibles según el or-

ganismo a que pertenecían. Estos autores clasifican en 15 especies los organismos del grupo de la pleuroneumonía, las incluyen en el género *Mycoplasma,* familia *Mycoplasmataceae,* orden Micoplasmatales, para Freundt, o Mollientales, para Edward.

Las relaciones con los virus han sido desde el primer momento menos claras. Las formas de los o. g. p. n. tienen quizá más relaciones con los virus, por su parasitismo sobre animales, principalmente. Edward ha observado que el virus de la influenza produce ciertas formas filamentosas en algunos momentos, semejantes a los organismos antes citados; por otra parte, los o. g. p. n. parecen en ciertos momentos virus adaptados, pues además de la tendencia parasitaria poseen una disposición intracelular muy similar a la de los virus. Las relaciones de los virus con las formas *L* de las bacterias son tan sólo en cuanto a tamaño y composición química.

Técnicas de obtención de las formas L *para el* Azotobacter

Los procedimientos para obtener formas *L* en las bacterias, por lo general, son muy variados, y pueden ser desde el simple envejecimiento de los cultivos, cambios de pH, temperaturas bajas, altas concentraciones de sustancias orgánicas, en especial del tipo de las proteínas, sustancias químicas como las carboxiletoxialanina, la metionina, el fenilmetano, etc. Muchas de estas sustancias son necesarias, no sólo para producir estas formas, sino para aislarlas y conservarlas; Dienes (27) considera necesaria una concentración 0,26 M para el aislamiento de las formas *L* de ciertas estirpes de estreptococos, estafilococos y difteroides y en general las altas concentraciones de sales son beneficiosas para estas formas, a excepción del litio, que resulta tóxico para algunas de ellas.

La mayoría de los autores están de acuerdo en utilizar para la obtención de estas formas el antibiótico penicilina, que fue usado por Pierce (88) por primera vez y posteriormente es usado por muchos autores, como Tulasne (114), Dienes (24 y 25), Abrams (1), etc. La concentración de penicilina necesaria para producir estas formas oscila de 10 a 10.000 u i./cm^3 de medio de cultivo. Los medios pueden ser semisólidos, o sea, con poco agar-agar, siendo corriente emplear agar común diluído con caldo, y suele ser necesario, además, enriquecer el medio con suero de caballo, extracto de hígado o corazón. Lavillaureix (58) emplea un me-

dio de sales minerales enriquecido con extracto de corazón. Más raramente se emplean los medios líquidos (Abrams, 1); estos medios, entre otras, tienen la desventaja de no poder observar las microcolonias, pero en cambio son útiles por poder ir añadiendo penicilina en días sucesivos a medida que ésta se va destruyendo, y de esta forma mantener constante la concentración de la misma. En los medios líquidos, las formas intermedias que se obtienen no suelen ser iguales a las de los medios sólidos, siendo más abundantes, por ejemplo, las formas filamentosas. Grasett (41) obtiene formas *L* de *Proteus, in vivo,* inoculando la bacteria a ratones y, posteriormente, inyectando en los mismos penicilina.

Pueden utilizarse independientemente de lo expuesto dos métodos para el estudio de estas formas: el método dinámico y el método estático. El método dinámico utiliza un microcultivo, con las sustancias antes mencionadas, sobre una preparación y observa las distintas formas en el microscopio de fases. El método estático obtiene las formas por los cultivos en medios semisólidos o líquidos, con las sustancias y medios anteriormente descritos.

De lo expuesto se deduce que para obtener las formas *L* es necesario disponer de un medio de cultivo apropiado, generalmente muy rico en sustancias alimenticias, con la excepción de las bacterias Gram-positivas que producen estas formas en medios más pobres, y además disponer de un procedimiento físico o sustancia química que provoque dicha formación y que corrientemente suele ser la penicilina. La concentración adecuada de esta sustancia hay que determinarla experimentalmente para cada estirpe.

Nosotros, para obtener las formas *L* en *Azotobacter,* hemos empleado el medio de cultivo que designamos por C, que contiene la solución de sales base, alcohol etílico al 0,8 por 100 y está enriquecido con extracto de suelo, según describimos en el capítulo correspondiente. A este medio le agregábamos una cantidad de penicilina, que oscilaba según las estirpes entre 10 y 300 u. i./cm^3 de medio de cultivo. Una de las estirpes estudiadas necesitaba excepcionalmente hasta 1.500 u. i. de penicilina/cm^3 de medio para originar las formaciones, pero la cifra más corriente era de 150 u. i./cm^3 de medio. Usábamos medios sólidos y semisólidos, y en los primeros agregábamos del 1 al 1,5 por 100 de agar-agar, como hemos descrito en la parte de medios de cultivo.

Las estirpes ensayadas han sido: la D-A123 de *Azotobacter chroococcum,* la B-A124 de *Azotobacter vinelandii* y la D-A125 de *Azotobacter agilis,* de la colección de Delft, y las estirpes números 24 y 72 de nuestra colección. En todas ellas obtuvimos las formas *L,* aunque la estirpe 72 de nuestra colección necesitó altas concentraciones de penicilina.

La siembra la efectuábamos sobre la superficie del agar utilizando una pipeta Pasteur, con la que colocábamos una gota de una suspensión preparada con un asa de gérmenes de un cultivo sólido suspendida en 2 cm^3 de agua estéril; después la extendíamos con dicha pipeta doblada en forma de cayado, de manera análoga a como hacíamos al efectuar los aislamientos. Las placas eran incubadas a 27° C. y algunas a la temperatura ambiente. A los diez días empezaban a aparecer unas microcolonias visibles al binocular, de dos tipos, como luego describiremos. Los medios líquidos eran sembrados con una gota de la suspensión que habíamos preparado anteriormente para los medios sólidos.

Cuando las cantidades de penicilina no son suficientes para alcanzar la concentración óptima de la estirpe que se estudia, se obtienen colonias parcialmente transformadas, como puede verse en la figura 31 de *Azotobacter agilis,* que en el centro han dado origen a formas *L,* pero que los bordes siguen siendo las formas normales. Por el contrario, en la figura 34 la transformación ha sido completa por tener una concentración de penicilina adecuada. Si la cantidad de penicilina es excesiva no hay crecimiento de ninguna clase, y a lo sumo, en ciertos casos, el tiempo en que aparecen las colonias es mucho mayor, pues es posible que aparezcan cuando parte de la penicilina se ha destruído.

Existen muchos factores que pueden provocar el ciclo *L* del *Azotobacter* en la naturaleza y en los medios de cultivo empleados por anteriores investigadores. Cultivados los *Azotobacter* en medios con patata, o medios muy ricos en proteínas, no es extraño que investigadores de otras épocas hayan obtenido un gran pleomorfismo. Winogradsky, que no es partidario de las formas pleomórficas de *Azotobacter,* logra, a base de un medio muy pobre, con sólo sales minerales y alcohol etílico, benzoato, acetato, etc., a concentraciones muy pequeñas, obtener cultivos que él llama puros, exentos de pequeños bacilos y cocos que acompañan al *Azotobacter,* y también sin las formas grandes, gigantes o aberrantes, como él llama. Para nosotros, este medio significa unas circunstancias poco favorables para el desarrollo del ciclo *L.* Beijerinck, utilizando la técni-

ca de enriquecimiento, observa que acompañan al *Azotobacter* numerosas formas pequeñas que resulta muy difícil separarlas de este género, y Winogradsky, para liberar al *Azotobacter* de estas formas que él denomina contaminantes, recurre a los rigurosos procedimientos de aislamiento que hemos descrito al principio, con los medios de cultivo sintéticos a base de sales minerales, una sustancia carbonada y gel de sílice, con lo cual la purificación del *Azotobacter* se consigue más por la composicion del medio que por el procedimiento de aislar en sí y se debe considerar más bien como que en este medio el *Azotobacter* no puede desarrollar su plenitud de formas.

Eisenstark (33) obtiene unas formas filtrables al final de su ciclo evolutivo, a pesar de emplear el medio de Ashby, las cuales aparecen por simple envejecimiento del cultivo, y en otro trabajo (34) estudia unas formas grandes de involución del *Azotobacter agilis.*

Lawrence (59), en 1955, hace unos estudios sobre las formas filtrables del *Azotobacter,* las cuales obtiene por envejecimiento de estas bacterias sobre medios de patata.

Ninguno de los autores que se han dedicado al estudio de estas formas del *Azotobacter* las relaciona con las formas *L* de estas bacterias, ni menciona ningún medio especial para obtenerlas en el laboratorio.

Además de los procedimientos que hemos descrito para provocar las formas *L* del *Azotobacter* en el laboratorio, y los procedimientos más o menos espontáneos de que los autores anteriores se han valido para la observación de las formas que acabamos de describir, hemos observado nosotros colonias *L* y diversas formas *L* que surgían por otras causas. En la figura 30 se observa una colonia de *Azotobacter chroococcum,* de un cultivo viejo, sobre medio A, que presenta su parte interior transformada en pequeñas colonias, las colonias *L,* transformación que describen algunos autores como origen de estas formas en otras bacterias (Minck, 73).

En los cultivos envejecidos, si éstos son ricos en sustancia alimenticia, hemos observado la aparición de las formas *L,* que coexisten con las formas normales y se desarrollan perfectamente en muchos casos.

En la proximidad de colonias de mohos, nosotros hemos observado la aparición de colonias *L,* constituídas con las formas pequeñas exclusivamente; en la figura 33 pueden observarse colonias *L* del tipo normalmente observado, que se desarrollan alrededor de colonias de *Aspergillus*

niger y de *Penicillium notatum,* respectivamente. Estos mohos, no sólo inducen a la formación de elementos *L,* sino que favorecen el desarrollo de los mismos, que de otra forma le resulta más difícil.

Para la obtención de las preparaciones de estas formas cultivadas en los medios sólidos o semisólidos, nosotros hemos seguido dos procedimientos, principalmente: en primer lugar, el procedimiento llamado de "calcado", muy usado en Bacteriología cuando no se quiere alterar en modo alguno los microorganismos, o cuando se quiere observar la disposición que poco más o menos tenían en el medio, colonia, etc. Cortábamos con un bisturí un cubito de agar de 1 cm. de arista y después, con unas pinzas estériles, con objeto de no contaminar la placa ni proseguir posteriormente su incubación, tomábamos dicho bloque e impresionábamos con él un porta, teniendo especial cuidado en no producir frotamiento alguno durante esta impresion. La otra técnica que hemos empleado es conocida por "agar coloreado", técnica que, algo modificada por nosotros, recuerda a la empleada por Minck (73). Se comienza por separar un bloque de agar como en el procedimiento anterior, y de este bloque, con un bisturí fino, separamos una lámina bastante delgada de la superficie del agar, cuya lámina se puede colocar sobre un porta y tratarla de forma parecida a un corte histológico, pudiéndose colorear y montar entre porta y cubre. Después de coloreada, colocábamos un cubre encima, teniendo mucho cuidado de no frotar, y por capilaridad rellenábamos el espacio que quedaba entre porta y cubre con parafina fundida, que, una vez enfriada, sujetaba el cubre y evitaba la desecación de la lámina de agar, lo que permitía la conservación de ésta durante un cierto tiempo. Por este procedimiento se ha obtenido la figura 49.

Las preparaciones correspondientes a los cultivos líquidos las obteníamos por centrifugación a 3.500 r. p. m. y en algunas ocasiones lavábamos el centrifugado en agua destilada, que no resulta nociva para las formas *L,* y en otras se hacía la preparación por medio del asa, directamente del centrifugado.

Las técnicas de coloración utilizadas han sido muy diversas, alguna de las cuales la hemos desechado por no darnos buenos resultados. Para las formas normales, los mejores resultados los obteníamos con la coloración de Giemsa, que colorea los cuerpos microbianos en azul y la mucosidad en rojo, las formas enanas y formas intermedias se colorean en

muchos casos también de rojo. La coloración de May-Grünwald-Giemsa, entre otras, no nos dió resultado por precipitar con facilidad.

Para las formas enanas que nosotros llamamos *L*, es recomendable usar colorantes que se tenga la completa seguridad de que no precipitan, para evitar posibles confusiones o dudas, y por otra parte, la precipitación es fácil en este tipo de preparaciones por inducción del mucílago o medio de cultivo que contiene. Hemos empleado con este fin azul de metileno, genciana, etc., pero los mejores resultados los hemos obtenido con un colorante ideado por nosotros, a base de fucsina, de la empleada en la coloración de Ziel-Nielsen, diluida con agua y alcohol (40 cm^3 de fucsina, con 45 cm^3 de agua y 15 cm^3 de alcohol); el alcohol etílico aumenta la solubilidad del colorante y disminuye la precipitación. Con este colorante hemos teñido las formas *L* de rojo y el mucílago de un rojo claro o rosa, distinguiéndose perfectamente. Con la citada coloración no se consigue diferenciar la estructura de los corpúsculos, pero dada su pequeñez y medios de que disponemos, este posible contraste no tiene objeto.

Para todas las formas hemos empleado coloraciones nucleares bacterianas modernas, pues el estudio de la localización del ácido oxirribonucleico y del ácido ribonucleico tiene interés en el ciclo *L*. Hemos utilizado la técnica de Chance (15), que emplea cristal violeta, cloruro mercúrico como mordiente y nigrosina como colorante de fondo. El riguroso ajuste del pH de los colorantes, imprescindible para lograr buenas preparaciones, lo efectuábamos potenciométricamente.

La técnica DeLamater (17-19) usa metionina como colorante y la deshidratación por congelación. El montaje de las preparaciones teñidas por este procedimiento lo efectuábamos según la técnica descrita por Minsavage (75).

Como coloraciones nucleares de tipo Giemsa utilizamos la de Robinow (95) y la de Piechaud (87); este último no emplea hidrólisis clorhídrica, sino una combinación cuidadosamente determinada de eosina y azur, que permite distinguir el núcleo del citoplasma; es una técnica insegura, que sólo se emplea en circunstancias muy especiales.

Finalmente, hemos empleado el procedimiento de Cassel (14), que utiliza el ácido perclórico, de acción semejante a la ribonucleasa.

Con todas estas técnicas hemos llegado a la conclusión de que las formas *L*, enanas de otros autores, se colorean bastante bien y se deduce

que están formadas por ácido desoxirribonucleico; en las formas de involución, en ciertos momentos, se observan corpúsculos de gran afinidad para los colorantes, cuyos corpúsculos están formados por ácido desoxirribonucleico, que posteriormente darán lugar a las formas *L*. En las formas filamentosas la coloración aparece a bandas alternativamente claras y oscuras, lo que demuestra que hay unas con gran cantidad del mencionado ácido. En cuanto al ácido ribonucleico, en las formas de involución existe este ácido, pero en menor proporción que en las normales, y a veces es tan pequeña que las porciones nucleares se colorean y distinguen fácilmente con la coloración de Giemsa (figura 38).

Las formas L

Nosotros llamamos formas *L* exclusivamente a lo que Tulasne llama formas enanas; tienen unas dimensiones que, según los distintos autores, es de 0,2 a 0,3 micras; están, por consiguiente, en el límite del poder de resolución del microscopio óptico. Tulasne, incluso, da como medida 0,125 micras, y Klieneberger-Nobel (54) es también de la misma opinión. El tamaño es deducido por las observaciones microscópicas, ultramicroscópicas, con el microscopio electrónico y mediante filtración. Klieneberger-Nobel hace una discusión de que el tamaño es difícil de determinar; de una parte son visibles al microscopio óptico, y por consiguiente deben estar dentro del poder de resolución de éste; pero, por otra, la facilidad de aglutinación de estas partículas, que siempre van acompañadas de una sustancia mucilaginosa, hace que no se sepa realmente si se trata de una sola forma, de varias o si está rodeada de mucílago, aparentando mayor tamaño. La filtración, por otra parte, es muy difícil, por estos grumos que se forman, y este autor recomienda una serie de operaciones previas, filtrados y resuspensiones, para lograr filtrar estos elementos; de todas formas, sólo atraviesan el filtro en pequeña proporción y a través de membranas de 700, 600, 500, 400 milimicras de diámetro. En esta última sólo pasa el 1 por 100 de la cantidad filtrada.

También es muy interesante tener en cuenta que las formas *L* pueden empezar a aumentar de tamaño desde el momento de su formación, y por consiguiente, hay que tenerlo presente en las medidas de las mismas.

El microscopio las revela como organismos formando masas aglutinadas por una sustancia mucilaginosa, que a veces se presenta como forma-

da por pequeños filamentos que contienen las partículas *L*; si las partículas están muy próximas, de forma que no se puedan resolver con el microscopio, da la sensación de filamentos con el borde dentado. Estas formas pueden lavarse con agua destilada o solución fisiológica, y por ello no pierden vitalidad. Han sido estudiadas al microscopio electrónico después de sombreadas con metales (Tulasne, 113) y se muestran como corpúsculos finamente granulosos, lo que parece ser un efecto artificial de la impregnación.

Bajo el punto de vista citológico, las formas *L* están formadas por ácido desoxirribonucleico y dan todas las reacciones de coloración de este ácido, como la de Feulgen, Dondero (29) y coloraciones nucleares que hemos descrito. Tulasne describe que se puede distinguir un núcleo en posición central, formado por ácido desoxirribonucleico y un citoplasma en la parte periférica, que contiene ácido ribonucleico; este autor, además, sostiene que estas formas no poseen una membrana citoplasmática. A esta opinión de Tulasne tenemos que objetar que, dada la pequeñez de estas formas, es muy difícil precisar si contienen una parte central nuclear y una parte periférica citoplasmática, y además si contiene una parte citoplasmática; por lógica y por razones universalmente admitidas en Biología, deben contener una membrana citoplasmática. Nosotros, por deducciones lógicas, y teniendo en cuenta que estas formas por aumento de tamaño son susceptibles de transformarse en una bacteria normal, como ocurre al menos en *Azotobacter,* si admitimos que una bacteria normal está compuesta, entre otras cosas, de membrana, citoplasma y núcleo, podemos suponer que también existen en éstas sus precursoras. Las observaciones con el microscópico electrónico, que parecen inducir a la falta de membrana, deben, a nuestro juicio, considerarse como imágenes erróneas del sombreado metálico.

Metabólicamente, las formas *L* muestran las mismas propiedades que las formas normales, aunque más atenuadas. En algunos casos desaparecen ciertas enzimas y también pueden desaparecer ciertos antígenos como los H de los bacilos tíficos y los O que se encuentran muy superficiales, pero éstos se regeneran posteriormente.

Las propiedades patológicas cambian en algunos casos, desapareciendo algunas que existían anteriormente y apareciendo otras nuevas.

Desde antiguo se conocen formas filtrables más o menos del género *Azotobacter.* Löhnis, desde sus primeros trabajos, llama la atención so-

bre los gonidios, elementos pequeños que encuentra en los cultivos viejos sobre medios ricos, de patata, caldo común, etc. La palabra gonidio la toma Löhnis del botánico Sachs (99), que en 1895 describía con este nombre unos elementos que intervenían en un tipo de reproducción de las algas y que transcribe Löhnis (68): "órganos de reproducción sexual, formados por la condensación del contenido plasmático celular, que abandona la célula progenitora por rotura de la pared de la misma o que llega a ser liberado cuando las células se disuelven."

De la misma opinión de Löhnis son otros autores rusos comentados por Winogradsky. Jones (50 y 51) confirma parcialmente las experiencias de Löhnis como existencia de gonidios, pero no la reproducción sexual y los bacilos esporulados.

Lawrence (59) ha estudiado recientemente las formas filtrables del *Azotobacter,* que considera como una parte de su ciclo vital. Las cultiva en medios de patata y las separa por filtración en filtros de poro muy grande, hasta de 3 micras de diámetro, por donde pueden pasar partículas hasta de 0,8 micras, dando este tamaño para las formas filtrables del *Azotobacter.* Los cultivos los emulsiona en líquido Ringer. De estos filtrados, que según el autor no contienen formas normales, regenera los cultivos de *Azotobacter.* Estamos de acuerdo en líneas generales con el autor, pero no con el tamaño de las partículas, pues debido a la mucosidad que acompaña a estas formas y a dificultades que nosotros consideramos como propias de las formas *L,* el tamaño no depende sólo de la partícula, sino del mucílago y demás consideraciones que hicimos en otro lugar.

Hemos encontrado formas *L* de este género por el método estático, con las técnicas que hemos descrito anteriormente. Las han producido todas las estirpes que hemos ensayado. En los medios líquidos, además de las formas filamentosas, como luego describiremos, se encuentran las formas *L,* enanas de otros autores, como pueden apreciarse en las figuras 32, 38, 48 y 50, que representan un cultivo de *Azotobacter* en medio líquido con penicilina. Estas formas *L* ya tienen un cierto desarrollo en relación a cuando se originaron, y se puede apreciar una tendencia a la aglomeración y mucosidad que les une. Este aumento de tamaño también puede ser un motivo de error en el cálculo de la medida de las formas *L,* pues desde su origen han aumentado de tamaño.

Para observar las formas *L* auténticas, da mejor resultado el cultivo en medio sólido y obtener la preparación por calcado y coloración con fucsina, como hemos dicho anteriormente, pues de esta manera las formas *L* tienen el tamaño que les corresponde por tratarse de un ciclo *L* interrumpido, el cual, como posteriormente describiremos, termina en estas formas que no evolucionan a formas superiores. El tamaño para las formas *L* del *Azotobacter* le consideramos de 0,2 a 0,4 micras, y la forma, esférica o más o menos alargada. El tamaño es algo mayor que el correspondiente a las formas *L* de otras bacterias, pero debemos tener en cuenta que en el *Azotobacter* todas las formas son por lo general mayores que las correspondientes a otras bacterias. Las figuras 51 y 53 muestran formas *L* de las dos especies que se consignan en la descripción; en ellas se aprecia la tendencia a la aglutinación, sustancia mucilaginosa que las acompaña y tendencia a la formación de hilos, que ha sido descrita como una característica de las formas *L* de las bacterias.

De la posible existencia de estas formas en el suelo, ya Löhnis, en 1905, describe unas formas pequeñas que aparecen en algunos momentos, especialmente durante el verano, en los suelos de Alemania, y que coinciden con la desaparición casi total de las formas consideradas como normales. La fijación del nitrógeno, por el contrario, no disminuye de manera ostensible, y achaca la fijación del nitrógeno a las formas pequeñas encontradas. Nosotros, después de haber descubierto las formas *L* en *Azotobacter*, consideramos que pueden ser éstas las mencionadas por Löhnis en su trabajo, pues como es sabido, las formas *L* procedentes de una determinada bacteria siguen conservando la mayoría de las propiedades de ésta, y en este caso sería la propiedad de fijar el nitrógeno. Esta fijación se demuestra, como hemos observado nosotros, porque estas formas *L* son capaces de crecer en medios sin nitrógeno. Nosotros no sabemos qué circunstancias concurrían para originarse estas formas *L*, que suponemos conservaba Löhnis; nos extraña que fuese en verano, pues en general las formas *L* se obtienen a bajas temperaturas; pero después de averiguar que el contacto y crecimiento de los *Azotobacter* con mohos puede provocar la aparición de formas *L*, su existencia nos parece lógica.

Cómo llegó Löhnis al conocimiento de estas formas en el suelo no lo describe de forma clara, y nos da la impresión que fue como una especie de intuición; nosotros hemos intentado averiguarlo por distintos pro-

cedimientos: el examen directo del suelo no es bueno, pues existen en él tantos corpúsculos coloreables que no es posible distinguir al microscopio si realmente se trata de formas *L* de *Azotobacter* u otras cosas. No es tampoco procedimiento apropiado estudiar las formas normales y las formas *L* por aislamiento del suelo, pues si utilizamos medios muy pobres del tipo de la sílice gelatinosa y sales minerales, las formas *L* no se desarrollan, y si el medio es más rico, con extracto de suelo por ejemplo, se pueden desarrollar mohos, que inducirían a la transformación *L*, y además estos mohos, una vez iniciado el primer crecimiento, se desarrollan bastante bien a expensas del nitrógeno fijado por el *Azotobacter*. Otro inconveniente de los medios de cultivo sintéticos, impropios de las formas *L*, es que pueden inducir a estas formas a revertir a las formas normales. Se recurrió a la filtración para la determinación de estas formas *L*. Como ya dijimos al principio de este capítulo, la filtración de estas formas es difícil y especialmente resulta más para las formas *L* del *Azotobacter*. Lawrence ha filtrado estas formas y tiene que recurrir a filtros de poro muy grande para conseguirlo. En la suspensión de suelo las dificultades son mayores, por ser más complejas y difíciles de purificar que un medio de cultivo. De todas maneras, con este procedimiento hemos logrado filtrar y cultivar formas *L* aisladas directamente del suelo, descartando con buen criterio las posibilidades de error que antes hemos mencionado. Pero este último procedimiento sirve a lo sumo para determinar cualitativamente su existencia en el suelo, pero no cuantitativamente, por su complejidad.

La determinación del nitrógeno en el suelo no es tampoco muy segura, pues además del *Azotobacter* hay otros microorganismos, bacterias y mohos principalmente (Morales, 77), que pueden ser capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y falsearían la experiencia.

En las aguas hemos observado formas que podemos asegurar casi de manera absoluta se trata de *Azotobacter agilis*, obtenidas de centrifugados de estas aguas; la fig. 37 muestra unas formas parecidas al *A. agilis* junto con corpúsculos, que pueden ser formas *L* u otras sustancias cualesquiera. En las aguas donde existe el *Azotobacter agilis*, como hemos dicho en otro lugar, no es corriente encontrar mohos, y probablemente aquí no existen las formas *L*. Nosotros, desde luego, en los filtrados y cultivos de estas aguas no las hemos observado.

Las formas de involución

Estas corresponden a las formas *L* gigantes de otros autores y a las formas de involución clásicas, y nosotros seguiremos llamándolas formas de involución, aunque con el concepto moderno. Vamos a distinguir dos tipos: las que se obtienen normalmente en los medios sólidos, y son formas bacilares más o menos con tendencia a la forma esférica, de gran tamaño, unas 20 micras o más; y las formas que se obtienen en los medios líquidos, que resultan más o menos filamentosas. Las formas encontradas en los medios sólidos se dividen en ciertas ocasiones como las formas normales, pero no son estables y tienen que hacer una de estas tres cosas:

a) Regresar en su transformación, dando origen a las formas normales de las que proceden, formando lo que llamaremos ciclo de involución, el cual es denominado por otros autores ciclo *L* incompleto.

b) Lisarse y terminar desapareciendo, produciéndose en algunas ocasiones unos corpúsculos, pero éstos no son viables.

c) Originar interiormente una serie de corpúsculos, que terminarán saliendo al exterior, originando las formas *L*.

Estas formas fueron observadas en el género *Azotobacter* desde hace mucho tiempo y han sido consideradas de formas muy diversas; por lo general, las interpretaron como formas de involución o formas completamente anormales, monstruosas, como las considera Winogradsky.

La forma de involución, desde el punto de vista citológico, está formada por un citoplasma más o menos viscoso, con corpúsculos que contienen abundante ácido desoxirribonucleico; en el citoplasma existe ácido ribonucleico en poca cantidad y la coloración de los corpúsculos se hace por ello con más facilidad. Si el medio es muy pobre, estas formas se lisan y desaparecen, pues las formas *L* que debían surgir no pueden subsistir ni desarrollarse en estos medios pobres.

Cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables a las formas normales, estas formas anteriores de involución pueden revertir y originar las primeras. Finalmente, si las formas de involución se encuentran en un medio rico, sobre todo en proteínas y otras sustancias que permitan el desarrollo de las formas *L*, terminan convirtiéndose en estas

últimas formas. Volveremos a insistir sobre este particular al hablar de los ciclos de los *Azotobacter.*

Las formas de involución filamentosas que se originan en los medios líquidos fueron observadas por Löhnis, que las denominó crecimiento fungoideo; las encuentra relacionadas con la producción de gonidios y compara estas formas filamentosas con los bacilos tuberculosos y con lo que él llama *Bacterium lactis viscosum.* En ciertos capítulos de sus obras describe estas formas como elementos sexuales, que se unen y fusionan.

Para Klieneberger-Nobel, Tulasne y Smith estas formas representan una reconstrucción de las formas *L,* enanas para estos autores, hacia las formas normales, originando bacilos por fragmentación de sus extremos, cuyos bacilos originarán las formas normales.

Eisenstark (34) ha visto formas de gran tamaño en *Azotobacter agilis,* que se pueden considerar como formas de involución o formas gigantes del ciclo *L.*

Estas formas filamentosas no aparecen al final de los ciclos, sino que al menos en *Azotobacter* provienen de las formas del tipo normal o levaduriformes que comienzan alargándose como puede apreciarse en las figuras 35 y 38 y que sucesivamente se van alargando cada vez más. En un principio se tiñen uniformemente con el Giemsa, lo que indica que el ácido ribonucleico del citoplasma es abundante. Los extremos se hacen más finos (figuras 32 y 48) y en estos extremos la coloración de Giemsa no es uniforme, lo que indica que el ácido ribonucleico del citoplasma va desapareciendo. Estos extremos terminan fragmentándose en pequeños corpúsculos, que son los que se observan en las figuras 48 y 50. Por todo lo cual, vemos que lo que se origina son pequeños corpúsculos, y no bacilos como decían los citados autores. En las figuras que hemos citado se encuentran mezcladas estas formas filamentosas con corpúsculos y pequeños bacilos, que provienen probablemente de estos corpúsculos, pero no se encuentran formas de tipo normal, como debía ocurrir si las formas filamentosas las originasen.

Las interpretaciones que da Löhnis de las formas filamentosas en cuanto a su parecido con los bacilos tuberculosos, se salen fuera de nuestro tema. Las relaciones con las formas enanas, gonidios de este autor o formas *L,* como llamamos nosotros, nos parecen lógicas, pues como hemos dicho estas formas bacilares en *Azotobacter* dan origen a formaciones de este tipo. Respecto a las colonias que describe Löhnis en su

trabajo de 1923, formadas por estos elementos filamentosos, nosotros no las hemos encontrado, y además todos los autores describen estas formas en los ciclos *L* como originadas en medios líquidos, y no formando colonias en los medios sólidos. Es muy probable que las colonias que describe Löhnis sean formas distintas mezcladas, en las que pueda existir algún filamento de este tipo.

Teniendo en cuenta que estas formas originan los elementos *L*, debemos considerarlas, de acuerdo con la nomenclatura que hemos establecido al principio, como formas intermedias de involución, y no como formas de regresión, como las consideran otros autores.

Las formas intermedias

Las formas intermedias se pueden considerar en dos grupos: aquellas que se encuentran situadas entre las formas de tipo normal y las formas de involución o formas gigantes, y que nosotros llamamos formas intermedias de involución, y otras formas que se encuentran entre las de tipo *L* y las normales, a las que nosotros llamamos formas intermedias de regresión. En el primer caso es muy fácil de establecer, pues desde una bacteria normal hasta la forma de involución existen una serie de pasos con unas bacterias de caracteres intermedios entre los elementos de tipo normal y los de involución. Todas estas formas han sido en Bacteriología clásica consideradas como elementos de involución y el *Azotobacter* las produce con extraordinaria facilidad cuando se cultiva en un medio con cierta riqueza en proteínas. Otro tipo de formas intermedias de involución son las filamentosas, que ya hemos descrito, y que originan, al parecer por fragmentación de sus extremos, los elementos *L*, aunque dichos elementos no sean exactamente iguales a los que se originan en los medios sólidos. En los medios líquidos es mucho más difícil estudiar el proceso porque se mezclan todas las formas, y los elementos que observamos no podemos decir si se trata de formas *L* recién originadas o de estas mismas que han sufrido ya cierto desarrollo.

Otro tipo de formas intermedias que nosotros vamos a considerar es aquel que se encuentra entre las formas *L*, o formas enanas para otros autores, y las formas de tipo normal; las llamamos formas intermedias de regresión. Algunos autores consideran a las formas filamen-

tosas como pertenecientes a este grupo, pero nosotros, teniendo en cuenta que originan formaciones, las hemos colocado en el grupo anterior. En cuanto a formas de tipo gigante, que sirven de paso para las formas normales y que han sido descritas para las bacterias en general, nosotros no las hemos observado para el *Azotobacter,* sino que el paso de las formas *L* a las normales se realiza por sucesivo desarrollo dando origen a las formas normales, como describiremos al hablar de los ciclos. El desarrollo de estas formas directamente para dar forma normales no ha sido descrito para ninguna bacteria, aunque haya habido algunos autores, como Tulasne, que han sospechado que esto puede ser posible; todos los autores explican el paso de las formas enanas o normales, indirectamente, o sea, por mediación de lo que llaman formas intermedias gigantes.

Estas formas intermedias de regresión para el *Azotobacter* están formadas por cocos o bacilos pequeños rodeados de abundante mucosidad y cuyo tamaño es muy distinto, según los momentos en que se encuentran. Löhnis, en sus trabajos de 1921, describe unas formas parecidas que él llama simplasmas y que opina son formas por las que pasan todas las bacterias en ciertos momentos de sus ciclos evolutivos. Estos simplasmas son estados organizados en que han desaparecido las paredes y separaciones celulares y todos los corpúsculos y elementos forman un estado único de organización, a modo, pudiésemos decir, de un plasmodio o sincitio. Este punto de vista, nosotros no podemos sostenerlo morfológicamente; como puede observarse en la figura 43 puede interpretarse en este sentido, pero dichas formaciones pueden disgregarse y sus elementos siguen viviendo, como ha realizado Floethmann (37) y nosotros en el laboratorio. Bisset también describe formaciones de este tipo que él llama simplasmas de gonidios; algunas de ellas las estudia con el microscopio electrónico y encuentra que son pequeños bacilos con flagelos lofotricos. Nosotros interpretamos, como hemos dicho, que estas formaciones son las formas intermedias de regresión, presentando un tamaño variable según el momento en que se encuentren, y unidas por abundante mucílago, como es propio de todas las formaciones *L* y derivadas de las mismas.

Las colonias L

Estas colonias han sido estudiadas, entre otros, por Dienes (22) y son una de las formaciones peculiares y características de las formas *L* y tienen aplicación para identificarlas y situarlas biológicamente.

Las colonias varían según el organismo que se considere y pueden presentar distintos aspectos en los sucesivos momentos del desarrollo. En un principio se encuentran formadas por los elementos *L* procedentes de la rotura de las formas de involución, pero poco después van desarrollándose, y a los diez días aproximadamente comienzan a verse estas colonias a simple vista o con auxilio de la lupa. Suelen tener de 20 a 500 micras de diámetro y se describen estas colonias como formadas por una parte central y unas aureolas; en estas aureolas es donde se encuentran las formas de involución que originan los elementos *L*. En el interior es donde están situadas las formas *L* y en algunos casos se encuentran filamentos junto con las formas *L*. Estas colonias *L* se parecen a las colonias de los organismos de la pleuroneumonía, aunque modernamente se encuentran diferencias, como ya hemos descrito.

Shepard (101), en unos estudios sobre las colonias *L* de los organismos de la pleuroneumonía, averigua que además de las colonias propias de éstos existen otras más pequeñas, de unas 10 micras de diámetro, que llama colonias *T*, las cuales están formadas por corpúsculos y tienen una forma rugosa más o menos irregular. Utiliza un medio de cultivo muy rico con extracto de corazón y fueron aisladas en distintas ocasiones. También encuentra colonias *T* de un caso de uretritis no gonocócica, cuyas colonias las compara con las encontradas para los organismos de la pleuroneumonía. Las colonias *L* de tipo corriente suelen ser en la mayoría de las bacterias rugosas y de contorno muy irregular.

En el *Azotobacter* hemos encontrado también dos tipos de colonias, tanto en las que han sido obtenidas de una manera provocada con la penicilina como las que han surgido en nuestros trabajos de una manera más o menos espontánea. También podemos considerar como colonias *L* de *Azotobacter* aquellas colonias que cambian, porque los elementos que las forman dan origen a los elementos de involución.

En la figura 36 se pueden apreciar unas colonias de *Azotobacter chroococcum* lisas, redondas, levantadas y con los bordes lisos, y por con-

siguiente no se parecen a las colonias *L* descritas para otros organismos. El tiempo que necesitan de inoculación y tamaño de estas colonias es semejante al de otras bacterias. Por su aspecto se parecen morfológicamente a las colonias de *Azotobacter* de tipo normal, en especial a las colonias de *Azotobacter chroococcum,* pero difieren en su tamaño y en los elementos que las componen. Observadas colonias de este tipo en el microscopio muestran el aspecto que se indica y que puede apreciarse en la figura 49, o sea, una serie de corpúsculos o formas *L* con algunos elementos levaduriformes, que podemos considerar normales, o que se encuentran iniciando la transformación a las formas de involución o formas madres de los elementos *L*.

Además de este tipo de colonias existe otro formado más bien por crecimiento en masa o aisladas en algunas zonas de unas colonias pequeñísimas, rugosas. Estas colonias están formadas por elementos *L* exclusivamente. En la figura 31 se observan unas colonias normales parcialmente transformadas en este otro tipo de colonia, y en la figura 34 estas últimas colonias se presentan puras, formando masas rugosas sobre la superficie del medio. (Las manchas negras de las figuras 31 y 34 se deben a burbujas de aire o impurezas del medio, que impresionan la fotografía al ser iluminada por la parte inferior.) Estas colonias pequeñas se encuentran también en la figura 36, acompañando a los otros tipos de colonias *L* que hemos descrito. En las figuras 51 y 53 se pueden apreciar los elementos que forman las colonias muy pequeñas. La preparación ha sido obtenida por calcado y coloración según las técnicas descritas, y puede observarse cómo estos elementos se encuentran agrupados y aglutinados por abundante mucosidad, muy propia de las formas *L*.

Dada la analogía de esta colonia descrita por nosotros y la colonia *T* descrita por Shepard, y por no crear un nombre nuevo que siempre supone una confusión, adoptamos la denominación de colonia *T* para la misma en *Azotobacter*. Este tipo de colonia le producen todas las especies de *Azotobacter* por nosotros estudiadas, y que enumeramos al principio del capítulo.

Las colonias *L* que nos han surgido en el curso de nuestro trabajo de manera más o menos espontánea pertenecían al primer tipo, o sea, a las colonias *L* propiamente dichas; en la figura 33 pueden observarse estas colonias y compararlas con las correspondientes de la figura 36. Debemos considerar que si las colonias *T* de *Azotobacter* aparecen ais-

ladamente en un medio de cultivo, dada su pequeñez, transparencia, etc., tienen gran posibilidad de pasar desapercibidas; nosotros nos veíamos obligados a hacer una siembra en masa de *Azotobacter* para poder observar cómodamente estas colonias y, además, para poder lograr preparaciones observables de las mismas.

Los ciclos biológicos del Azotobacter

El estudio del ciclo o ciclos biológicos del *Azotobacter* ha sido una de las cuestiones más discutidas y que presenta más discrepancias, según los distintos autores.

Nosotros, después del descubrimiento de las formas *L* y comparando nuestros resultados con los ciclos *L* de otras bacterias, hemos optado por establecer, en vez de un ciclo único, cuatro ciclos distintos, teniendo en cuenta las circunstancias que concurren y estados finales de los mismos. Distinguiremos: un ciclo en medios pobres, que coincide en líneas generales con las ideas monomorfistas; un ciclo de involución, que estudia los cambios de las formas de este nombre; a otro le denominamos ciclo *L* incompleto, que da finalmente formas *L* fijas, que no continúan su evolución a las formas normales; y por último, el ciclo *L* completo, que comprende la formación de elementos enanos o formas *L*, y de éstas la regeneración de las formas normales. En estos ciclos no hemos observado, por tanto, todas las formas descritas por los pleomorfistas, y solamente por analogía entre sus descripciones y las formas observadas, algunas de ellas las podemos comparar con las nuestras.

Ciclo en medios sintéticos

Este ciclo coincide en general con el descrito por Winogradsky en su morfología y ecología del *Azotobacter* (117), donde hace un estudio bibliográfico y experimental sobre este género. Este autor no se encuentra de acuerdo, como hemos dicho, con los pleomorfistas y hace un estudio bibliográfico detallado de los mismos para rebatirles en sus consideraciones; considera a los cocos y bacilos pequeños como formas contaminantes y a los elementos grandes como formas hinchadas, aberrantes, de involución.

Utilizando medios sintéticos de composición muy simple y aplicando su "principio ecológico" llega a la conclusión de que las formas propias del *Azotobacter* son: bastones de bordes redondeados de 2-2,5 micras de longitud por 1 - 1,5 micras de diámetro; estas formas pasan luego a otras de extremos afilados y algo más ensanchadas por el centro, de éstas a elementos redondeados o formas cocoides menores, y finalmente, a los elementos ovalados, levaduriformes. Las formas ovaladas pueden originar quistes permanentes, y este autor procura por todo los medios que la etapa final sea enquistamiento, estudiando el mismo para cada estirpe y fuente de carbono suministrada. Los quistes son formaciones que contienen una pared muy gruesa y presentan gran resistencia a la sequedad, principalmente. En algunos casos describe los quistes pequeños como formas de resistencia de significado análogo a los quistes, pero de menor tamaño. Todas las formas grandes con granos de volutina, grasa y las formas filamentosas, son consideradas por este autor como elementos anormales.

Petchenko (86) describe en trabajos posteriores que de los quistes se forman elementos ovalados en cultivos frescos, los cuales pasan a bacilos que se dividen por escisión normal, y finalmente estos bacilos se acortan y forman células redondas de menor tamaño. Además de estas formaciones que él llama de propagación y que por lo general tienen forma alargada, describe los elementos de fructificación, que por lo común poseen forma redonda; igualmente describe unas formas ameboideas que se dividen según las tres direcciones del espacio y que al final terminan enquistándose o dando lugar a gonidios.

Eisenstark (33), utilizando el medio de cultivo de Ashby, señala que en el primer día de incubación aparece un bacilo rechoncho, que a los dos o tres días se hace más pequeño; a las dos o tres semanas se producen formas ramificadas y filamentosas, y termina por contener, después de mucho tiempo, formas cocoides pequeñas.

Jensen (47), en su amplio estudio bibliográfico, se muestra partidario de las ideas de Winogradsky, admitiendo únicamente algunas formas filamentosas y gonidios, de naturaleza muy dudosa, según este autor.

Bisset (7 y 8) estudia los gonidios, formas bacilares y cocáceas, distintos tipos de simplasmas, etc. Los estudios los realiza con el microscopio óptico y el electrónico.

Nosotros hemos estudiado este ciclo con las técnicas recomendadas por Winogradsky, y en efecto, en estas condiciones, el ciclo se realiza de forma análoga a la descrita por el anterior autor. En la figura 21 se puede observar la germinación de un pequeño quiste o espora, que origina un bacilo típico, pequeño, de extremos más bien cuadrados; estos bacilos siguen creciendo y se forman otros algo mayores, de bordes redondeados, como puede apreciarse en la figura 24. En el *Azotobacter chroococum,* que es el que vamos a tomar de modelo, estos bacilos originan unas formas algo ovales, de extremos afilados, como puede apreciarse en la figura 27, y de éstos se originan los elementos levaduriformes o formas propias, de gran tamaño, que pueden verse en la figura 25. El *Azotobacter agilis* tiene unas formas en general más redondeadas en todos los momentos de su ciclo, como puede observarse en las figuras 22 y 37.

Las variaciones de tamaño en este medio sin nitrógeno obedecen principalmente a que la capacidad fijadora del nitrógeno y el proceso de división celular son independientes. Cuando comienza el desarrollo en un medio, la capacidad fijadora del nitrógeno suele ser muy pequeña por no tener adaptada su capacidad enzimática y no puede aumentar la cantidad de protoplasma; si en este momento se divide, los individuos son cada vez más pequeños. Cuando fija nitrógeno intensamente aumenta la cantidad de protoplasma, y si este proceso es más intenso que la división celular, los individuos aumentan de tamaño hasta un límite. Llegado a este límite de tamaño, si la fijación aún es muy intensa, estos microorganismos excretan al medio ambiente el exceso de nitrógeno fijado en forma de amoníaco.

El ciclo que acabamos de describir no siempre ocurre de la misma manera, y repitiendo las experiencias en las mismas condiciones no siempre se observan todas las formas bacterianas descritas.

También utilizamos un medio no exactamente igual al que recomienda Winogradsky, el medio que hemos designado por C, que contiene extracto de suelo y es un poco más rico en sustancias nutritivas, pero no por ello consideramos que sea este medio menos natural que el que describe Winogradsky. En este caso no aparecen más formas prácticamente que unos bacilos e inmediatamente los elementos levaduriformes, y el cultivo se mantiene con estas formas durante mucho tiempo hasta que se enquista o lisa.

Además de las formas descritas se han observado por nosotros y otros autores anteriores que ya hemos descrito, los quistes, formas de resistencia, por lo menos a la desecación y que pueden observarse en la figura 26, los cuales presentan una resistencia a la desecación, como igualmente cierta resistencia a la temperatura; los microquistes (*nannoquistes* de Winogradsky) poseen igualmente cierta resistencia a la temperatura. Hemos observado igualmente unos corpúsculos gruesos en el interior de las células, que germinan originando un pequeño bacilo y que consideramos como una especie de espora por su forma, manera de originarse y germinar. Bisset considera a estas formas como un tipo de gonidios. Otra de las formaciones es la célula, de aspecto muy mucoso y que puede observarse en la figura 29. Se observan también unas células especiales que contienen gránulos en el interior y que son consideradas por Winogradsky como los estados prequísticos, que pueden corresponder realmente a estos estados o a formas intermedias de involución.

De lo expuesto anteriormente, deducimos que cultivando estos organismos en medios pobres, que, como dijimos en el capítulo anterior, no son propios para originar las formas *L*, solamente aparecen las formas descritas que coinciden con las ideas monomorfistas, pero teniendo en cuenta que pequeñas variaciones hacen cambiar el ciclo y que incluso en estos medios aparecen los gonidios y otras formas, según varios autores, y que nosotros estudiaremos como formas del ciclo *L*.

Las formas normales (figura 54, núm. 6) presentan un ciclo interno donde se reproducen por escisión; de éstas se originan los elementos con cápsula (núm. 7) y posteriormente se pueden originar los quistes (núm. 8) o los estados previos para la esporulación (núm. 9) que originan la espora (núm. 11). Los quistes pueden germinar dando las formas normales y las esporas germinan igualmente produciendo unos pequeños bacilos, como describimos anteriormente.

Ciclo de involución

Este ciclo es denominado ciclo *L* incompleto por Tulasne. Comprende unos elementos grandes, las formas de involución, de 25 ó más micras, para las bacterias corrientes. Se originan por crecimiento y aumento de tamaño, por consiguiente, de las formas normales hasta alcanzar el tamaño máximo, formando las llamadas de involución. Las formas de

involución pueden dividirse transversalmente y originar un ciclo interno directo, como puede observarse en la figura 55, parte inferior derecha; las formas designadas con los números 1 y 3 de la misma figura son las consideradas como formas intermedias de involución, siguiendo nuestro criterio. Algunas de las formas de involución pueden lisarse (núm. 4) y originar una serie de corpúsculos y mucosidades que no tienen vitalidad (núm. 8). En otros casos, si las condiciones del medio se hacen favorables para las formas normales, las de involución regresan y producen nuevamente las formas normales de las que proceden. Es un ciclo que se presenta muy fácilmente en el *Azotobacter*, y la literatura de este género está llena de citas que aluden a las mencionadas formas; en cuanto se utilizan medios no tan sintéticos como los recomendados por los monomorfistas, en seguida surgen las formas más o menos hinchadas que contienen corpúsculos de grasa, volutina, etc., que corresponden a estas formas de involución.

Cómo dan origen las formas de involución a las normales es un problema que no está aclarado; para unos, las formas normales se originan en el interior de las otras; para otros, las formas de involución se dividen sucesivamente y van perdiendo tamaño hasta alcanzar el de la forma de tipo normal; nosotros nos inclinamos por esta última, y así lo consignamos en la figura 55.

Ciclo L *interrumpido o incompleto*

Este ciclo es denominado por Tulasne ciclo interrumpido, y es aquel que da origen a formas *L*, o sea, formas enanas viables, las cuales continúan indefinidamente en esta forma y se reproducen dando origen a formas análogas. El hecho de que las formas *L* no reviertan a las formas primitivas que las originaron, se conoce con el nombre de "fijado", y puede conseguirse sembrando durante mucho tiempo en medios favorable a éstas y desfavorables para las formas normales. Tulasne ha fijado formas *L* de una estirpe de *Proteus* sembrándolas sucesivamente en medios con penicilina, y Minck ha conseguido lo mismo con el *Vibrio* del cólera. Las estirpes fijadas no vuelven a las formas normales, aunque Dienes cita una excepción, diciendo que ha hecho regresar, sembrando en medios normales, a una estirpe de *Streptobacillus moniliformis* fijada por Klieneberger-Nobel hacía cinco años.

En el *Azotobacter* nosotros hemos conseguido este ciclo con bastante facilidad; basta sembrar en el medio C, con penicilina, para conseguir los dos tipos de colonias anteriormente descritos y de éstas las colonias *T* se encuentran formadas por elementos *L* fijados. Estas colonias se pueden resembrar en el mismo medio, creciendo y dando origen a formas *L* exclusivamente. Por circunstancias que no nos hemos podido explicar, en algunas ocasiones las resiembras no se desarrollan. El otro tipo de colonias, si se coloca en circunstancias favorables para las formas normales, suele regenerar éstas; incluso sobre las mismas placas de la penicilina, cuando se dejan transcurrir en estufa veinticinco días o más y se evita la desecación de estas placas, aparecen unas colonias de tipo normal; la proporción de las colonias de tipo normal que aparecen es muy pequeña en relación al número total de colonias *L* existentes. Estas formas fijadas nosotros las consideramos como las auténticas formas *L*, y en ellas es donde se han de hacer las medidas de tamaño y estudiar las propiedades de las mismas. Las figuras 51 y 53 muestran estas formas *L* completamente puras, y allí puede apreciarse el tamaño, forma un poco irregular y mucosidad que les acompaña. En éstas, nosotros, por medidas efectuadas con el microscopio óptico, consideramos que tienen de 0,2 a 0,4 micras de diámetro.

De la manera de reproducirse estos elementos poco es lo que puede observarse; es de suponer que se reproducen por división directa, pero las observaciones microscópicas no pueden aclarar esta circunstancia. Sin embargo, que se reproducen es absolutamente seguro, pues aumentan de número, incluso forman colonias, prueba evidente de su multiplicación. Para algunos autores las formas *L* se multiplican por intermedio de formas gigantes, lo que llaman ciclo interno y directo, o sea, que las formas enanas, que nosotros llamamos *L*, originan unas formas gigantes y éstas vuelven a dar las formas *L*. En el caso de *Azotobacter* no se observan estas formas grandes, sino que únicamente se encuentran formas pequeñas y la multiplicación tiene que ser forzosamente directa, y no indirecta, como describen algunos autores para otras bacterias.

En la figura 55 este ciclo comprende: la formación de los elementos (núms. 2 y 3), la ruptura de estas formas de involución (núm. 4), dando formas viables (núm. 5), las cuales describen un ciclo interno —reproduciéndose entre sí—, esquematizado en la parte inferior izquierda de la figura.

Ciclo L *completo*

Este ciclo comprende la formación de elementos de involución que, posteriormente originan formas enanas y luego estas formas enanas o *L* revierten, originando las formas normales de que proceden. En la mayoría de los autores, la reversión de las formas *L* a las formas normales no se hace directamente, aunque algunos sospechan, como Tulasne, que podía hacerse, sino que se hace con la intervención de unas formas intermedias que pueden ser parecidas a las formas intermedias de involución que originaron dichas formas *L*, o a formas filamentosas, en los medios líquidos, en los que, según algunos autores, dichos filamentos originan bacilos por fragmentación.

La manera de originarse las formas *L* en las bacterias no está aclarada. Para unos se forman granulaciones en el interior, de un tamaño parecido a las formas *L* y muy ricas en ácido desoxirribonucleico, las cuales salen al exterior por ruptura de la célula. Para otros, como Klieneberger-Nobel, algunas células se hacen menos coloreables y aumentan de tamaño, en su interior aparecen unos corpúsculos situados como en una especie de filamento, que pueden vivir bastante tiempo en el interior de la bacteria que se ha originado, pero posteriormente dichos corpúsculos pueden salir y originar una vida independiente.

También es motivo de discusión si previamente a la formación de los elementos *L* existe una fusión de células o posible reproducción sexual, lo cual trataremos posteriormente al hablar del significado del ciclo *L*.

Dentro de este ciclo pueden originarse otros subciclos por multiplicarse por división directa o indirecta (subciclo directo o indirecto) algunos de los elementos que componen el ciclo general o completo.

Debemos consignar que un pequeño número de formas de involución son las que originan las formas *L* o corpúsculos pequeños viables; otras muchas se lisan y desaparecen, originando corpúsculos no viables y no interviniendo por consiguiente en este ciclo.

En el *Azotobacter* se origina un ciclo análogo al descrito, con algunas modificaciones que transcribimos. Vamos a distinguir ciclo *L* en medios líquidos exclusivamente o ciclo *L* completo en medios sólidos, aunque

nos auxiliemos del medio líquido en algunos momentos como, por ejemplo, para cerrar el ciclo.

El medio C con penicilina es idóneo para la obtención de las formas *L*, pero el paso de las formas *L* a las normales no se realiza fácilmente y hay que recurrir a los medios líquidos. En los medios sólidos, como describimos en el ciclo incompleto, hay gran tendencia a que se fijen las formas *L*, y esto dificulta la obtención del ciclo completo, aunque algunas de las colonias sobre este mismo medio evolucionan, al menos parcialmente, y revierten a las formas normales, realizándolo por crecimiento directo. Para forzar el cierre del ciclo, o sea, la transformación de las formas *L* a las formas normales, nosotros resembramos en medio C líquido sin penicilina. Por este procedimiento, aunque con dificultades, como ocurre en general con los trabajos sobre formas *L*, nosotros lográbamos cerrar el ciclo completo y obtener las formas normales a partir de las enanas por desarrollo directo. En las figuras 40, 41 y 46 pueden observarse tres etapas en el crecimiento y desarrollo de las antiguas formas *L* para convertirse en formas normales de *Azotobacter chroococcum,* del cual procedían. Este proceso también se da espontáneamente. En cultivos viejos se originan formas de involución que se rompen y deshacen dando lugar a formas *L* como puede apreciarse en la figura 39 de *Azotobacter chroococcum,* y en la 42 de *Azotobacter beijerinckii,* en donde pueden apreciarse cómo algunas células se han roto originándose unos corpúsculos que darán origen a las formas *L*. Si nosotros tomamos de un cultivo de estos un asa y resembramos en medio C sin penicilina, las formas *L* empiezan a desarrollarse y transformarse en formas normales, y las normales que existían en el medio primitivo, pues todas las células no se transformaron, comienzan a desarrollarse en este nuevo medio, surgiendo así un crecimiento asociado de ambas formas. Las formas normales al pasarlas al nuevo medio, suelen iniciar una tendencia filamentosa, como puede apreciarse en la figura 45 correspondiente a *Azotobacter chroococcum.* En esta figura 45 puede apreciarse cómo las formas *L* se han desarrollado y han adquirido un tamaño algo mayor, y ya en este momento podemos considerarlas como formas intermedias de regresión, que darán lugar a las normales por desarrollo directo. En las figuras 40, 41 y 43 pueden observarse estos sucesivos desarrollos de las formas intermedias de regresión, que se presentan en masas unidas por abundante mucílago y que son, como hemos

dicho, muy parecidas a las que Lohnis y Bisset han llamado simplasmas. Lawrence posiblemente toma estas formas intermedias de regresión en sus primeros estados de desarrollo como formas filtrables y las utiliza para medir el tamaño de las mismas, por lo cual es lógico que considere 0,8 micras de diámetro para estos microorganismos. Bisset también es probable que considere a éstas como los gonidios que describe y observa con el microscopio electrónico y que encuentre en ellas flagelos lofotricos.

Hemos observado que entre las bacterias normales y estas formas intermedias existe una especie de simbiosis, o al menos un parasitismo de estas formas intermedias, pues el desarrollo de las formas últimas se realiza más fácilmente y puede realizarse en medios más pobres cuando se encuentra en unión de las formas normales. Nosotros suponemos que la excreción de ciertas enzimas o productos intermedios estimula el crecimiento y desarrollo de las formas *L*, las cuales no deben poseer dichas enzimas o las tienen en menor proporción. La figura 37, además de las que hemos citado, muestra unas formas intermedias de *Azotobacter agilis* en unión de alguna forma normal.

En ciertas ocasiones las formas *L*, liberadas como hemos dicho, empiezan a transformarse en formas intermedias, camino de las normales, pero si el medio se encuentra agotado y lleno de sustancias nocivas para las formas normales, las intermedias no llegan al final, quedándose en el cultivo durante un cierto tiempo, conservando la vitalidad en forma de bacilos pequeños o cocos, formas intermedias detenidas en su evolución; si el cultivo no es renovado terminan desapareciendo.

El ciclo *L* completo en los medios líquidos exclusivamente, cuando se realiza en el medio C con penicilina, nosotros le interpretamos de muy distinta forma a como se suele interpretar para los elementos *L* de otras bacterias.

Cuando sembramos bacterias normales de *Azotobacter chroococcum* en medio líquido C con penicilina y concretamente la estirpe número 72, que fue la que mejor resultado nos dio en este sentido, pues necesitaba altas concentraciones de penicilina y se podía controlar mejor el proceso, se observan unas formas irregulares con tendencia a originar filamentos, como puede apreciarse en la figura 35; posteriormente, la mucosidad aumenta y los bacilos se hacen filamentosos; aunque se conservaban algunos cortos, el ácido desoxirribonucleico se agrupaba en ban-

das y el ribonucleico desaparecía en gran parte. Los filamentos, en los primeros momentos, presentaban un diámetro uniforme y seguían desarrollándose engrosando por la parte central y afinándose por los extremos, terminando por resolverse en granulaciones al final de los mismos. En las figuras 32, 48 y 50 pueden apreciarse distintos aspectos de estos filamentos o formas intermedias de involución y formas *L*, junto con pequeños bacilos procedentes de las formas *L* o de los bacilos primitivos que no se han convertido en filamento.

El ciclo *L* en los medios exclusivamente líquidos resulta muy difícil de interpretar, pues los distintos elementos que lo componen se encuentran mezclados y además se superponen varios ciclos a la vez.

En la figura 55 el ciclo *L* completo comprende desde el número 1 hasta el 7. Desde el 1 al 4 se representan las formas de involución que dan origen a las formas *L*; el 5 comprende las formas *L* con la mucosidad característica y hasta aquí se realizan los medios sólidos; el 6 y el 7 representan las formas intermedias de regresión, que van aumentando progresivamente de tamaño y perdiendo mucosidad. Estas últimas formas se originan con más facilidad en los medios líquidos, y se han obtenido sembrando las formas *L* del número 5 en medios líquidos C, sin penicilina.

Significado del ciclo L *en* Azotobacter

Se considera el ciclo L, en general, de distintas formas: una de ellas como regeneración celular, pues hay unos cambios nucleares que afectan a la forma y a la cantidad de ácido desoxirribonucleico que hacen sospechar en una posible regeneración bacteriana.

Otros consideran que el ciclo *L* significa un proceso de degeneración, y se basan en que las formas gigantes representan células degeneradas o monstruosas, pero no tienen en cuenta que estas formas pueden reproducirse normalmente y además que originan las formas *L*, las cuales pueden vivir indefinidamente en forma autónoma y presentan para ciertas sustancias mayor resistencia que las formas normales.

Puede interpretarse como un proceso sexual. La sexualidad en el *Azotobacter* ha sido estudiada por Löhnis y Smith (67), que atribuían a los gonidios una función sexual, aunque no existen pruebas concluyentes que lo demuestren. Modernamente, Dondero y Zelle (28) han estu-

diado la sexualidad en *Azotobacter* y sostienen que las células normales pueden dar origen a otras de gran tamaño, de 20 micras de largo por 10 micras de ancho, y que dichas formas provienen de una división nuclear repetida sin que el citoplasma se divida. Estos autores observaron el *Azotobacter* en microcultivo, y durante cuarenta y ocho horas aparecieron las formas de involución, pero no observaron fusión de células. Las células de involución se dividen normalmente, y ellos lo interpretaron diciendo que las sustancias tóxicas inhiben el crecimiento de las células normales hasta una determinada relación núcleo/protoplasma de un cierto valor, pero después éstas vuelven a dividirse normalmente. Utilizan un cultivo con extracto de levadura 1 por 100 de alcohol. Lo que obtienen estos autores son las formas de involución, pues el medio es suficientemente rico con el extracto de levadura. La reproducción sexual en las formas *L* o enanas de otros autores, es muy difícil de interpretar morfológicamente, dada su pequeñez; no puede observarse la fusión y por otros procedimientos de tipo genético la interpretación resulta muy difícil. Dienes ha cultivado *Proteus* de distintas características y ha obtenido de ellos las formas *L;* posteriormente ha hecho revertir dichas formas a los *Proteus* normales y obtuvo los mismos tipos de que había partido.

Puede considerarse también el ciclo *L* como una forma de resistencia para ciertas sustancias, pero si bien es cierto que las formas *L* son más resistentes, por ejemplo, a la penicilina, en cambio son más lábiles que las formas normales, y además, las características de resistencia que adquieren las formas *L* no las transmiten en su regresión; las formas normales obtenidas de elementos *L* siguen siendo tan sensibles a la penicilina como antes.

Parece ser, de todas formas, que el ciclo *L* vigoriza las estirpes de *Azotobacter*. Petchenko aconseja dejar envejecer los cultivos para que describan el ciclo completo y no degeneren en el laboratorio.

EL *AZOTOBACTER* EN LA NATURALEZA

¿Cuáles de estas formas y ciclos descritos son los que tiene esta bacteria en la naturaleza? Las ciencias experimentales tropiezan siempre con que los hechos no son exactamente reproducibles en unas circunstancias completamente idénticas. Como oí muchas veces a mi maestro,

Dr. Socías, las cosas que suceden son eventos, hechos que no se pueden reproducir exactamente en el espacio y en el tiempo; ahora bien, de todas las ciencias experimentales, las ciencias biológicas son las que presentan más dificultad en este sentido. En la Microbiología del suelo, la enorme complejidad de circunstancias de orden físico-químico y biológico que concurren hacen muy difíciles de reproducir los hehos estudiados por la misma. No ya el "principio ecológico" de Winogradsky, sino cualquier medio que pueda idearse siempre será distinto de la realidad y no se podrán estudiar en el laboratorio los hechos en las mismas circunstancias en que se encuentran en la naturaleza.

Hay que tener en cuenta la gran diversidad de suelos que existen, las reacciones químicas que se desarrollan que están continuamente variando su composición, las oscilaciones de temperatura y otras variantes de tipo físico y las acciones biológicas de lucha de microorganismos que, como ha demostrado Afrikiane (2), algunas son nocivas para el *Azotobacter;* por ejemplo, los microorganismos del grupo del *Bacillus subtilis* y ciertos mohos, como hemos encontrado nosotros.

En el suelo existen causas capaces de provocar el ciclo *L,* pues todos los cambios y circunstancias son favorables para este fin, y se une a esto que el *Azotobacter* es una de las bacterias que con más facilidad puede dar origen a las formas *L.* Se cita al *Streptobacillus moniliformis* y otras bacterias como productores de las formas *L* de una manera natural y normal, pero debemos añadir que el *Azotobacter* debe figurar en este grupo.

Hemos observado algunas colonias *L* directamente aisladas del suelo, y aunque no se observan éstas con facilidad, ya dijimos las causas por las que se ponían de manifiesto. El examen directo de la microflora del suelo y otros métodos que pudieran ir encaminados a comprobar la existencia de formas *L* en el suelo, no suelen dar buenos resultados, pero ello no quiere decir que estas formas no existan.

El *Azotobacter* que se encuentra en las aguas tiene menos probabilidad de producir el ciclo *L.* En las aguas, los cambios químicos y luchas microbiológicas tienen menos importancia que en el suelo. Cuando aislábamos *Azotobacter agilis* no solíamos encontrar colonias de mohos, como hemos visto en otro lugar; los mohos pueden ser una causa para inducir a la formación de elementos *L* en estas bacterias. En la figu-

ra 37 se observan unas formas normales de *Azotobacter agilis* y unos corpúsculos que no se pueden interpretar morfológicamente. Los filtrados de estas aguas no dieron lugar en ningún caso a formas *L*.

RESUMEN

Se analizaron 300 muestras de suelos y 100 muestras de aguas, efectuándose el recuento de *Azotobacter* y determinando el pH, cantidad de calcio y cantidad de materia orgánica en cada una de ellas. Con los resultados de estos análisis se determina la relación del porcentaje de *Azotobacter* con el pH, cantidad de calcio y materia orgánica en las muestras de suelos. En las muestras de aguas pudimos comprobar que el único factor que ejercía alguna influencia era la cantidad de materia orgánica. Si las aguas se encontraban en descomposición no se aislaba *Azotobacter,* aunque la materia orgánica fuese relativamente abundante.

Fueron aisladas y clasificadas numerosas estirpes, encontrando las especies típicas *A. chroococcum* y *A. agilis,* claramente diferentes, como también las especies de *A. beijerinckii* y *A. vinelandii,* aunque también encontramos una serie de formas intermedias entre *A. chroococcum* y *A. beijerinckii* y entre *A. agilis* y *A. vinelandii.*

Nos ocupamos de ciertos aspectos de la actividad bioquímica de la citología y crecimiento asociado especialmente con mohos.

Se estudió el ciclo biológico y las distintas formas que en él se originan cuando se cultiva este género en medios sintéticos sin nitrógeno, pobres en sales minerales y en materia orgánica.

Describimos por primera vez las formas *L* de esta bacteria y los diversos ciclos *L* que pueden producirse. Observamos una colonia *L* típica y otra colonia distinta que denominamos *T,* por analogía con la colonia *T* descrita por Shepard en otras bacterias. Se averiguó la manera de producir estas formas en el laboratorio y de estudiarlas y se compararon con otras formas descritas anteriormente por diversos autores.

Se determinaron los cambios de la sustancia nuclear en las diversas formas *L* de los distintos ciclos utilizando coloraciones nucleares para bacterias.

Describimos las posibles causas que puedan producir una transfor-

mación *L* espontánea y los ciclos que normalmente pueda tener esta bacteria en la naturaleza.

Comprobamos que las distintas formas *L* son capaces de fijar el nitrógeno.

Finalmente, creemos haber aportado una solución definitiva sobre el viejo y debatido problema de la biología del *Azotobacter.*

SUMMARY

300 soil and 100 water samples were investigated.

The percentage of *Azotobacter* in conection with the pH, calcium amount and organic matter amount were determined.

The percentage of *Azotobacter* in water samples were determined in connection with the organic matter amount and showed to be dependent on the amount of organic matter present.

The isolated strains were identified. Two of them were *A. chroococcum* and *A. agilis.* There were two more strains: *A. beijerinckii* and *A. vinelandii,* but they had intermediate forms between *A. chroococcum* and *A. beijerinckii* and between *A. agilis* and *A. vinelandii.*

We studied some aspects of their biochemical activity, citology and certain asociated growth with molds.

We studied the bacterial forms of this generum in its habitat and in laboratory, the biological cycle in poor salts and organic matter synthetic media.

We described for the first time the *L* forms on this bacterium and also the various *L* cycles, the typical colonies *L* and *T* (by analogy with the work of Shepard in other bacteria), also we studied how to produce it in the laboratory and the relationship with other forms and cycles previously described on this generum.

It seems that dip changes take place in the nuclear substance during the several forms of the *L* cycle.

We described the possible causes that induce to the espontaneous *L* transformation of this generum in nature.

We saw that the *L* forms can also fixe nitrogen.

Finally we thinck we have apported a solution to the old problem on the biology of this generum.

BIBLIOGRAFIA

1. ABRAMS, R. Y. 1955. A method for cultivation of *L* forms in liquid media. J. Bacteriol., 70, 251.
2. AFRIKIANE, E. K. 1954. Action antagoniste des bactéries sporulées sur les cultures d'*Azotobacter*. Trouidi. Ins. Microbiol., 3, 154-165. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01908.)
3. ALEXANDER, M., y MORSE, E. V. 1956. Intracelular distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., 71, 252-253.
4. ALLEN, O. N. 1951. Experiments in soil bacteriology. Unversity of Wisconsin.
5. BEIJERINCK, E. 1901, 1902. Centr. Bakt. Parasitenk. II, 7, 562 y 9, 3. (Ref. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1948. 6.ª ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.)
6. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. 7.ª ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
7. BISSET, K. A., y HALE, C. M. 1953. The cytology and cycle of *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol., 8, 442-448.
8. BISSET, K. A. 1955. Evidence from the cytology of *Azotobacter chroococcum* of a relationship with *Rhizobium* and the *Bacillaceae*. J. Gen. Microbiol., 13, 442-445.
9. BLINKOV, G. N. 1955. Influence de l'adjonction de sels sur *A. chroococcum* et *A. galophilum*. Mikrobiologija, 24, 43-48. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01903.)
10. BLINKOV, G. N. 1955. Sur les *Azotobacter* résistans a réaction acide du milieu ambiant. Mikrobiologija, 24, 415-421. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01904.)
11. BONAZZI, A. 1915. Cytological studies of *Azotobacter chroococcum*. J. Agr. Res., 4, 225-239.
12. BURDON, K. L. 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. J. Bacteriol., 52, 665-678.
13. BURK, D., y LINEWEAVER, H. 1930. The influence fixations of nitrogen on *Azotobacter*. J. Bacteriol., 19, 389-414.
14. CASSEL, W. A. 1950. The use of perchloric acid in bacterial cytology. J. Bacteriol., 59, 185-188.
15. CHANCE, H. L. 1952. Crystal violet as a nuclear stain for *Gaffkya tetragena* and other bacteria. Stain Tech., 27, 253-258.
16. DASTE, P. 1954. Action simultanée de la colophane et de l'amidon sur le development de l'*Azotobacter* dans le sol. C. R. Soc. Biol., 148, 515-518. (Ref. Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01906.)

17. DeLamater, E. D. 1951. A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms. Stain. Tech., 26, 199-204.

18. DeLamater, E. D. 1953. A new cytologycal basis for bacterial genetics. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, XVI, 381-395.

19. DeLamater, E. D. 1952. A consideration of the newer methods for the demostration of nuclear structure in bacteria and other microorganisms. Mikroskopie, 7, (9/10), 358-362.

20. De Rossi, G. 1932. La fixation de l'azote elementaire dans le sol. II Les *Azotobacter* dans differents terreins d'Italie. Boll. Sez. It. Soc. Int. Micr., IX.

21. Derx, H. G. 1953. Sur les causes de la distribution geographique limitée des *Beijerinckia*. Rias. Comm. VI Int. Congr. Microbiol. Roma, 3, 116-117.

22. Dienes, L. 1942. The significance of large bodies and the development of *L* type colonies in bacterial cultures. J. Bacteriol., 44, 37-73.

23. Dienes, L. 1946. Complex reproductive processes in bacteria. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 11, 51-59.

24. Dienes, L. 1948. The isolation of tipy cultures from *B. funduliformis* with the aid of penicillin and their reversions into the usual bacilli. J. Bacteriol., 57, 529-546.

25. Dienes, L. 1949. Development of *Proteus* cultures in the presence of penicillin. J. Bacteriol., 57, 529-546.

26. Dienes, L.; Howard, J.; Weinberger, S., y Madoff, S. 1950. The transformations of typhoid bacilli into *L* forms under various conditions. J. Bacteriol., 59, 755-764.

27. Dienes, L., y Sharp, J. T. 1956. The role of electrolite concentration in the production and growth of *L* forms of bacteria. J. Bacteriol., 71, 208-213.

28. Dondero, N. C., y Zelle, M. R. 1953. Observations on the formation and behavior of "conjugation" cells and big bodies in *Azotobacter agilis*. Science, 118, 34-36.

29. Dondero, N. C.; Adler, H. L., y Zelle, M. R. 1954. Quantification of the Feulgen reaction in bacteria. J. Bacteriol., 68, 483-492.

30. Duchanfour, Ph., y Pochon, J. 1955. Note sur la biologie des humus forestaires. Ann. Inst. Pasteur, 88, 261-265.

31. Edward, D. G., y Freundt, E. A. 1956. The classification and nomenclature of organisms of the pleuroneumonia group. J. Gen. Microbiol., 14, 197-207.

32. Eisenstark, A., y McMahon, K. J. 1949. Some phase microscope observations of *Azotobacter agilis*. Soil. Sci., 68, 329-331.

33. Eisenstark, A.; McMahon, K. J., y Eisenstark, R. 1950. A cytological study of a pleomorphic strain of *Azotobacter* with the electron and phase microscopes and the Robinow nuclear-staining technique. J. Bacteriol., 59, 75-81.

34. EISENSTARK, A.; WARD, C. B., y KYLE, T. S. 1950. A study of large bodies in *Azotobacter agilis*. J. Bacteriol., 60, 525-531.

35. FEDOROV, M. V., y ERNANDES, A. 1955. Proprietés physiologiques des atténuées et atypiques d'*Azotobacter* isolés de sols herbeux sablonneux. Mikrobiologija, 24, 170-179. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 196. 54, 56 01902.)

36. FISHER, P. J., y CONN, J. E. 1942. A flagella staining technic for bacteria. Stain Tech., 17, 117-121.

37. FLOETHMANN, E. 1955 Cytologische Untersuchungen an *Azotobacter chroococcum*. Arch. Mikrobiol., 20, 243-260.

38. GAYNEY, P. L., y FOWLER, S. 1945. Growth curves *Azotobacter* at different pH levels. J. Agr. Res., 70, 219-260.

39. GOUCHER, C.; WALDMAN, D. A., y KOCHOLATY, W. 1955. Photoinactivations and photoreactivations of constitutive and adaptative respiratory system of *Azotobacter*. J. Bacteriol., 69, 703-705.

40. GOUCHER, C. R.; KAMEI, I., y KOCHOLATY, W. 1956. Ultraviolet inactivations and photoreactivations of *Azotobacter*. J. Bacteriol., 72, 185-188.

41. GRASSET, E., y BONIFAS, V. 1951. Modalités de transformations in formes *L in vivo* de *Proteus vulgaris* et d'autres *Enterobacteriaceae* sous l'action de la penicilline. Ann. Inst. Pasteur, 88, 651-656.

42. GREEN, M.; ALEXANDER, M. y WILSON, D. V. 1923. Mutants of the *Azotobacter* unable to use N_2. J. Bacteriol., 66, 623-624.

43. HARRIS, J. O. 1946. A study of effect of growth substrate on the respiration of *Azotobacter*. J. Biol. Chem., 162, 11-20.

44. HELY, F. W., y BONIER, G. 1954. The effects of induced soil agregation on the occurrence of *Azotobacter* and *Streptomyces*. Ant. van Leeuwenhoek, 20, 359-373. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01910.)

45. HOFER, A. W. 1944. Flagelation of *Azotobacter*. J. Bacteriol., 48, 697-701.

46. HOWARD, J.; WEINBERGER, S.; MADOFF, S., y DIENES, L. 1950. The properties of *L* forms isolated *Salmonella* and the isolation of forms *Shigella*. J. Bacteriol., 59, 765-770.

47. JENSEN, H. L. 1954. The *Azotobacteriaceae*. Bact. Rev., 18, 195-213.

48. JOHNSTONE, D. B. 1955. *Azotobacter* fluorescence. J. Bacteriol., 69, 481-482.

49. JOHNSTONE, D. B., y FISHBEIN, J. R. 1956. Identification of *Azotobacter* species by fluorescence and cell analysis. J. Gen. Microbiol., 14, 330-335.

50. JONES, D. H. 1913. A morfological and cultural study of some *Azotobacter*. Centr. Bakt. Parasitenk., II, 38, 14-24.

51. JONES, D. H. 1920. Further studies on the life cycle of *Azotobacter*. J. Bacteriol., 34, 191-204.

52. KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1935. The natural occurrence of P. P. L. O. in apparent symbiosis with *Streptobacillus monilliformis* and other bacteria. J. Path. Bacteriol., 40, 93-98.

53. KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1950. *Fusiformis necrophorus* and *Streptobacillus moniliformis* show a primitive form of sexuality according to Mellon's views. J. Gen. Microbiol., 4, 223-230.

54. KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1954. Problems actuels de virologie. Masson et Cie. París.

55. KLUYVER, A. J. 1933. Über *Azotobacter agilis* Beijerinck. Arch. Mikro., 4, 280-300.

56. KNAYSI, G. 1950. Elements of Bacterial Cytology. Comstock Publishing Company Inc.

57. LAVERGNE, D., y AUGIER, J. 1955. Numération de la microflore totale et microestructure des sols. Ann. Inst. Pasteur, 89, 446-457.

58. LAVILLAUREIX, J. 1956. Obtention de formes naines (formes *L*) des bactéries sur un milieu pénicilliné enrichi en sels minéraux. Ann. Inst. Pasteur, 90, 376-378.

59. LAWRENCE, J. C. 1955. Filterability of the swarmers of *Rhizobium* and *Azotobacter*. Nature (Lond.), 176, 1033-1034.

60. LEIFSON, E. 1951. Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bacteriol., 62, 377-390.

61. LEWIS, I. M. 1937. Cell inclusions and the life cycle of *Azotobacter*. J. Bacteriol., 34, 191-205.

62. LEWIS, I. M. 1941. The cytology of bacteria. Bact. Rev., 5, 181-230.

63. LINBIMOV, B. I., y KAGAN, Z. C. 1954. Urease et arginase dans certains formes d'*Azotobacter*. Dokladi Akad Naouk. S. S. S. R. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01917.)

64. LÖHNIS, F. 1905. Beiträge zur Kenntnis der Sttickstoffbakterien. Centr. Bakt. Parasitenk., II, 14, 582-604.

65. LÖHNIS, F., y WESTERMANN, T. 1909. Ueber Sttickstoffixierende Bakterien. Centr. Bakt. Parasitenk. II, 22, 234-254.

66. LÖHNIS, F., y HANZABA, I. 1914. Die Stellung von *Azotobacter* im system. Centr. Bakt. Parasitenk. II, 52, 1-6.

67. LÖHNIS, F., y SMITH, N. R. 1916. Life cycles bacteria. Agr. Res., 6, 675-702.

68. LÖHNIS, F. 1921. Studies upon the life cycles of the bacteria. Mem. Nat. Acad. Sci., 16, 1-252.

69. LÖHNIS, F., y SMITH, N. R. 1923. Studies upon the life cycles of the bacteria, J. Agr., 23, 401-432.

70. MANTEIFIELD, A. J., y KOZLOWA, E. I. 1955. Azotofixateurs libres dans les sols sous les steppes et sous les bois des régions de Kamichine, Stalingrad et Tingout. Mikrobiologija, 24, 36-42. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01905.)

71. MENSCHIK, Z. 1933. Nile bleu histochemical méthod for phospholipids. Stain Tech., 28, 13-18.

72. MICHOUSTINE, E. N. 1954. Répartition écologique-géografique d'*Azotobacter* dans les sols d'U. R. S. S. Procesus de formation des sols et associations microbienes. Trouidi. Ins. Mikrobiol., 19, 80-97. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01907.)

73. MINCK, M. 1954. Curso de Microbiología del Instituto Pasteur (apuntes).

74. MINCK, M. 1950. Obtention de formes naines (formes *L*) à partir d'une souche de vibrion cholerique soumise a l'action de la pénicilline. C. R. Soc. Biol, 145, 927-931.

75. MINSAVAGE, E. J. 1953. A permanent mounting procedure for bacteria. Stain. Tech., 30, 231-233.

76. MORALES, J. 1956. Estudio bacteriológico de la curtición de pieles mediante taninos. Microbiol. Españ., 9, 315-326.

77. MORALES, J. 1956. Fijación del nitrógeno atmosférico por microorganismos distintos del *Azotobacter, Rhizobium* y *Clostridium*. Microbiol. Españ., 9, 281-292.

78. MORTENSON, L. E., y WILSON, P. W. 1954. Initial stages in the breakdown of carbohydrates by the *Azotobacter vinelandii*. Arch. Biochem. Biophys., 53, 425-435.

79. MOUSOUR, V.; WYSS, O.; DOUGLAS, S., y KELLOG, Jr. 1945. A bacteriofage for *Azotobacter*. J. Bacteriol., 70, 486-487.

80. MOZEN, M. M.; BURRIS, R. H.; LUNDBOM, S., y VIRTAMEN, A. I. 1955. The effect of nitrous oxide on nitrate utilization by *Azotobacter vinelandii*. Acta Chem. Scand., 9, 1232-1234.

81. NOCARD y ROUX, DUJARDIN, SALEM. 1898. Le microbe de la peripneumonie. Ann. Inst. Pasteur, 12, 240-245.

82. PARKER, C. A. 1954. Effetect of oxygen on the fixations of nitrogen by *Azotobacter*. Nature (Lond.), 173, 780-781.

83. PARKER, C. A. 1955 Non symbiotic nitrogen-fixing bacteria in soil. Studies on *Azotobacter*. Aust. J. Agric. Res., 6, 388-397.

84. PEROTTI, R. 1906. Distribuzioni del l'Azotobacterio in Italia. Rend. Ac. Lincei, XV, 295-302.

85. PETERSEN, E. J. 1925. Studies on the *Azotobacter* test and the reaction condition of the soil. Tidskr. Planteavl., 31, 246-337.

86. PETCHENKO, B. 1930. Über die Biologie, die Morphologie und den Entwicklungszyklus von Mikroorganismen der *Azotobactergrupe*. Zentr. Bakt. Parasitenk. II, 80, 161-162.

87. PÍECHAUD, M. 1954. La colorations sans hydrolyse du noyau de bactéries. Ann Inst. Pasteur, 86, 787-793.

88. PIERCE, A. 1942. *Streptobacillus moniliformis* its associated forms *L* and other P. P. L. O., J. Bacteriol., 43, 780-791.

89. POCHON, J., TCHAN, Y. T., y WANG, T. L. 1958. Recherches sur le cycle morphologique et l'appareil nucléaire des *Azotobacter*. Ann. Inst. Pasteur, 74. 182-188.

90. POCHON, J. 1955. Technique de préparation des suspensions-dilutions de terre pour analyse microbiologique. Ann. Inst. Pasteur, 89, 464-465.

91. POCHON, J. 1956. Parenté microbiologique des Mor forestier et des tourbes acides. Ann. Inst. Pasteur, 90, 353-354.

92. POLIANSKE, N. A. 1955. Efficacité de l'azotobactérine prépareé sur le milieu sapropel. Mikrobiologija, 24, 57-61. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01919.)

93. PRAZMOWSKI, A. 1912. Centr. Bakt. Parasitenk., II, 33, 292. (Ref.: WINOGRADSKY, S. 1949. Obras completas. Masson et Cie. París.)

94. REPASKE, R. 1954. Succinic dehidrogenase of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., 68, 555-561.

95. ROBINOW, C. F. 1942. A study of the nuclear apparatus of bacteria. Proc. Roy. Soc. B. (Lond.), 130, 299-324.

96. RUBIO-HUERTOS, M. 1954. Estudio del ciclo *L* y formas filtrables de las bacterias. Premio "Ramón y Cajal" del C. S. I. C.

97. SABIN, A. B. 1941. The filterable microorganisms of the pleuropneumonia group. Bact. Rev., 5, 331-342.

98. SABIN, A. B. 1947. The filterable microorganisms of human derivation. J. Bacteriol., 56, 589-602.

99. SALLE, A. J. 1955. Laboratory manual on principles of bacteriology, 167. 3.ª ed.

100. SACHS, J. 1875. Textbook of Botany. Oxford (véase 68).

101. SHEPARD, C. 1956. *T* form colonies of pleuropneumonialike organisms. J. Bacteriol., 71, 362-369.

102. SHIRLEY, E.; GUNTER, I., y KOHN, H. I. 1956 The effect of rays on *Azotobacter*. J. Bacteriol., 71, 571-581.

103. SCHUTTER, J., y WILSON, P. W. 1955. Patterns of enzymic adaptation in species of the genus *Azotobacter*. J. Gen. Microbiol., 12, 446-454.

104. SMITH, N. R. 1935. The occurrence of a strain of *Azotobacter chroococcum* which does not ferment mannitol. J. Bacteriol., 30, 323-328.

105. SMITH, W. E. 1944. Observations indicating a sexual mode of reproduction in a bacterium *(B. funduliformis)*. J. Bacteriol., 47, 417-418.

106. STARKEY, R. L., y DE, P. K. 1939. A new species of *Azotobacter*. Soil Scien., 47, 329-343.

107. SOCÍAS, A. 1949. Un hongo (Eumiceto), se transforma en bacteria (Esquizomiceto). An. Edaf. y Fis. Veg., VIII, 2.

108. SOCÍAS, A. 1951. De la metilación orgánica como factor de transformación moho-bacteria y su papel en la etiología microbiana del tracoma. Microbiol. Españ., 4, 33-38.

109. SOCÍAS, A.; GONZÁLEZ, C., y RAMÍREZ, C. 1952. Transformación de varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* en *Bacillus subtilis*. Microbiol. Españ., 5, 133-143.

110. SOUCHKINA, N. N., y SERGOUNINA, L. A. 1955. Répartition et développement d'*Azotobacter* dans les sols sablonneux conuverts de gazon. Mikrobiologija, 24, 408-414. (Ref.: Bull. Inst. Pasteur. 1956. 54, 56 01909.)

111. STEMPEN, H., y HUTCHINSON, W. C. 1951 The formation and development of large bodies in *Proteus* CX 19. I: Bright phase contrast observations of living bacteria. II: Comparative citology of bacilli and large bodies. J. Bacteriol., 61, 321-335.

112. TOPLEY, W. C.; WILSON, G. S., y MILES, A. A. (traducción de J. Estellés). 1949. Bacteriologia e Inmunidad, 489-491. Salvat Editores, S. A.

113. TULASNE, R. 1953. Le cycle *L* et les formes naines des bactéries. *Symposium* on bacterial cytology. Roma.

114. TULASNE, R., y BRISOU, J. 1955. Les pleuropneumoniales. Taxonomie des "pleuropneumonialike organisms" et des formes *L*. Ann. Inst. Pasteur, 88, 237-239.

115. WILLIAMS, M., y WILSON, P. W. 1954. Adaptation of *Azotobacter* cells to tricarboxylic acid substrates. J. Bacteriol., 67, 353-360.

116. WILSON, T. G. G. 1950. The terminal oxidation system of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., 70, 30-34.

117. WINOGRADSKY, S. 1949. Obras completas. Masson et Cie. París.

118. WYSS, O., y WYSS, M. B. 1950. Mutants of *Azotobacter* that do not fix nitrogen. J. Bacteriol., 59, 287-291.

119. ZETTOW (véase 45).

Figura 5. Se aprecian algunas colonias de mohos y Azotobacter. *Esta placa se encuentra colocada sobre una cuadrícula que utilizábamos para contar las colonias, como igualmente para medir su diámetro. Reducción: 2/5.*

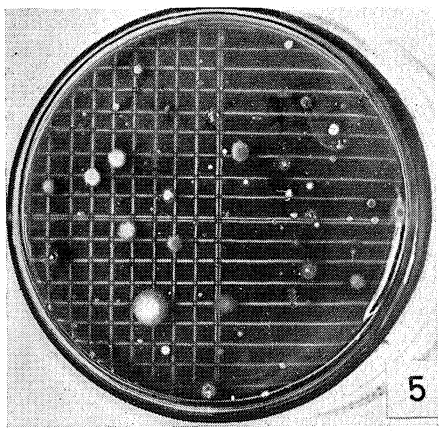
Figura 6. La fotografía ha sido obtenida sobre fondo oscuro y mucha exposición, para lograr hacer visibles las colonias de Azotobacter chroococcum, *muy transparentes. Se observan algunas colonias de mohos, como puntos blancos. Reducción: a 2/5.*

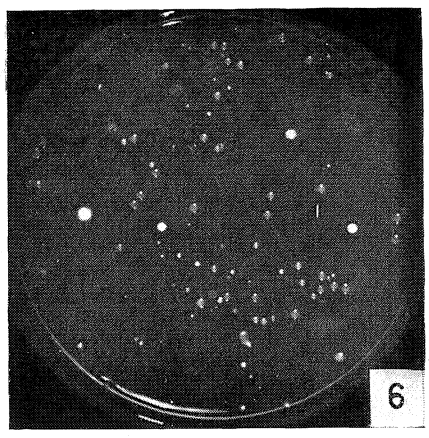
Figura 7. Se aprecian colonias de Azotobacter chroococcum *con unos halos blancos alrededor y algunas colonias de mohos. Reducción: a 2/5.*

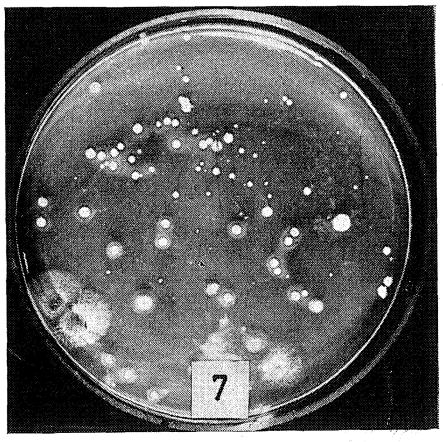
Figura 8. Crecimiento abundante de mohos presentando antibiosis contra los mohos producidos por una colonia de Actynomices. *Reducción: a 2/5.*

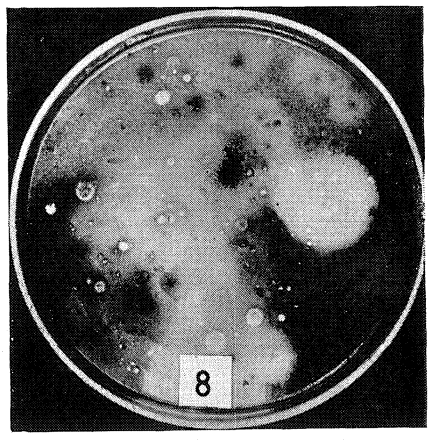
Figura 9. Placa sembrada con el agua número 84 de las muestras ensayadas. Fotografía obtenida iluminando la placa por transparencia. Reducción: a 2/5.

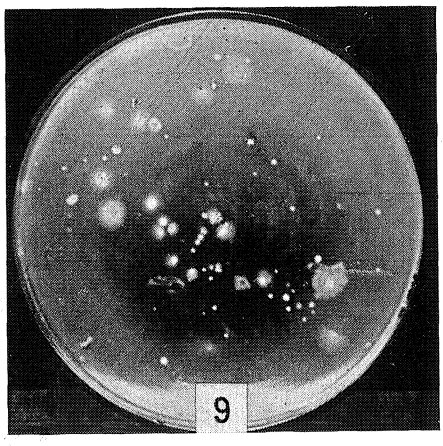
Figura 10. Se aprecian colonias de mohos y de Azotobacter *semejantes a fotografías anteriores y, además, una colonia de* Aspergillus niger *que se desarrolla perfectamente en medio sin nitrógeno. Reducción: a 2/5.*


5


6


7


8


9

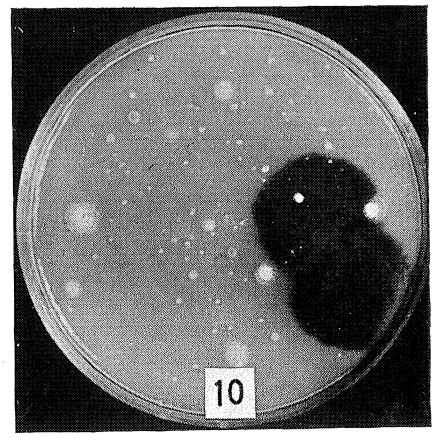

10

Figura 11. Sobre fondo oscuro. Colonia de Azotobacter chroococcum *y algunos mohos.* × *1,5.*

Figura 12. Colonia de Azotobacter vinelandii, *cultivada en medio C a 27° C.* × *20.*

Figura 13. Borde de una colonia de Azotobacter vinelandii *en medio C.* × *27.*

Figura 14. Colonias de Azotobacter chroococcum *cultivadas a la temperatura ambiente y presencia de luz. Aparece pigmento en la parte central de las mismas.* × *10.*

Figura 15. Colonia joven de Azotobacter agilis *presentando borde liso.* × *20.*

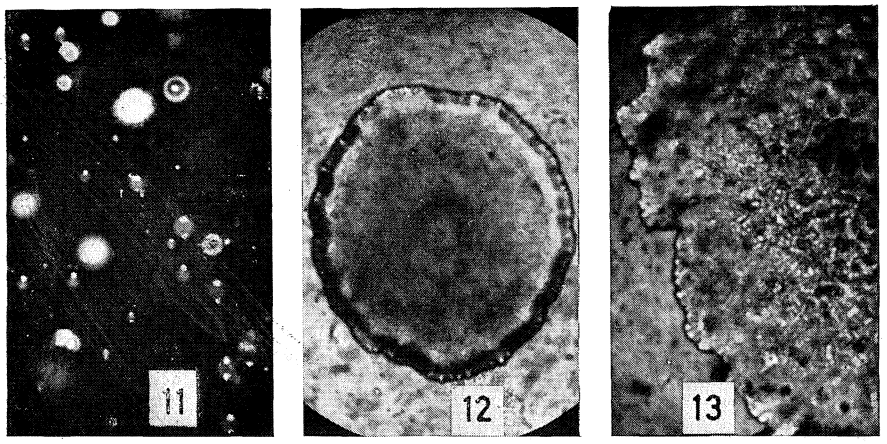
Figura 16. Borde de una colonia de Azotobacter vinelandii. × *27.*

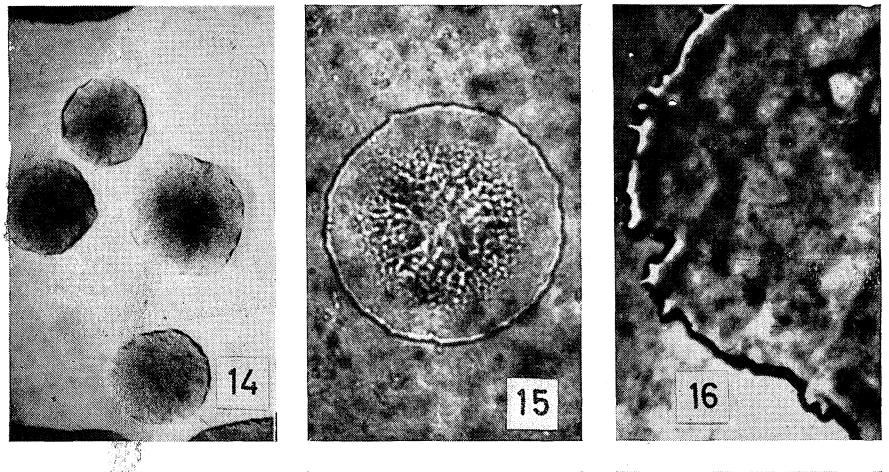
Figura 17. Fotografía de una placa de medio B sembrada con agua de la muestra 92. Se aprecian colonias lisas y levantadas de Azotobacter chroococcum *y otras extendidas de* Azotobacter agilis. × *12.*

Figura 18. Colonia joven de Azotobacter agilis. × *20.*

Figura 19. Borde de una colonia de Azotobacter vinelandii. × *27.*

Figura 20. Borde de una colonia de Azotobacter agilis *muy extendida y de borde irregular. Se puede apreciar cómo cambia el borde en los sucesivos estados de crecimiento.* × *27.*


11
12
13


14
15
16

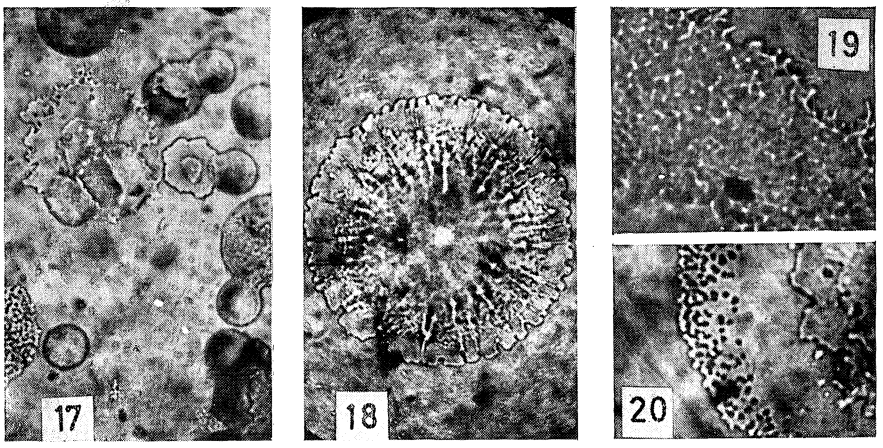

17
18
19
20

Figura 21. Espora de Azotobacter chroococcum *germinando sobre medio B Coloración por Giemsa.* × *800.*

Figura 22. De un cultivo joven de Azotobacter agilis. *Pueden observarse formas muy redondeadas.* × *860.*

Figura 23. Azotobacter chroococcum *mostrando las esporas. Coloración por Giemsa.* × *860.*

Figura 24. Formas bacilares de un cultivo joven de Azotobacter chroococcum. *Coloración por Giemsa.* × *860.*

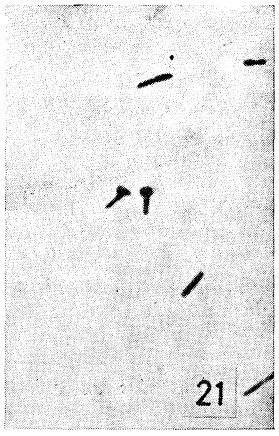
Figura 25. Azotobacter chroococcum *coloreado por Gram. Formas de levadura sobre medio B.* × *1.200.*

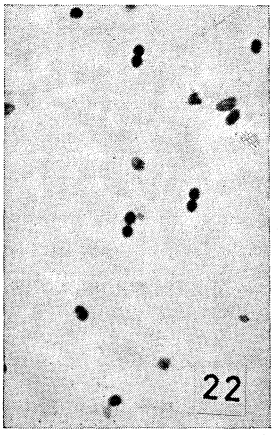
Figura 26. Quistes de Azotobacter chroococcum. *Coloración por Giemsa.* × *860.*

Figura 27. Formas de extremos afilados de Azotobacter chroococcum *sobre medio C. Coloración por Giemsa.* × *800.*

Figura 28. Azotobacter chroococcum *con unos gránulos en el interior de las células. Se considera como estado prequístico. Coloración por Gram.* × *930.*

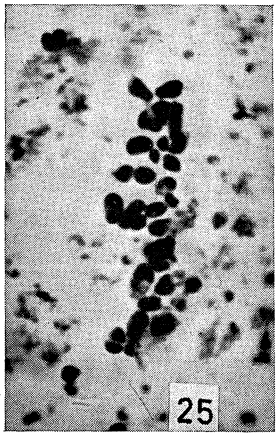
Figura 29. Células con cápsula de Azotobacter chroococcum. *Coloración por Giemsa.* × *860.*


21


22

23

24


25

26

27

28

29

Figura 30. Colonia de Azotobacter chroococcum *en cultivo viejo. En el centro de la colonia se han desarrollado otras pequeñas de formas* L. *Sobre el medio existen algunas hifas de mohos que se aprecian desenfocadas en la fotografía.* × *20.*

Figura 31. Colonias de Azotobacter agilis *parcialmente transformadas en colonias* T *sbore medio C con penicilina.* × *27.*

Figura 32. Cultivo de Azotobacter chroococcum *en medio C líquido con penicilina en un estado avanzado. Formas filamentosas muy largas y formas bacilares.* × *930.*

Figura 33. Colonia de Penicillium notatum *y colonias* L *provocadas por la presencia de* Penicillium. × *20.*

Figura 34. Colonias de Azotobacter agilis *sobre medio C con penicilina.* × *27.*

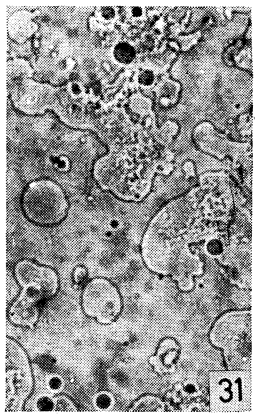
Figura 35. Cultivo de Azotobacter chroococcum *en medio C con penicilina. Formas filamentosas y otras normales pequeñas con abundante mucílago, sobre medio líquido.* × *860.*

Figura 36. Colonias L *de tipo corriente y colonias* T *que aparecen como una zona blanca.* Azotobacter chroococcum *sembrado en medio C con penicilina.* × *27.*

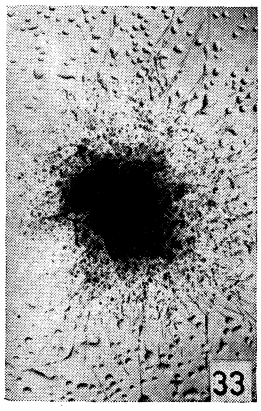
Figura 37. Preparación obtenida de un centrifugado de agua, coloroeada por Giemsa. Se aprecian elementos levaduriformes que pueden ser interpretados como Azotobacter agilis. × *660.*

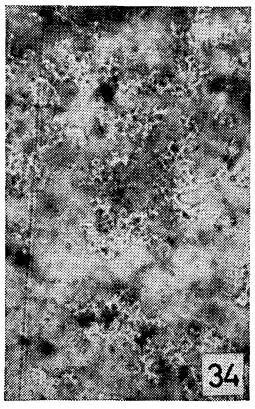
Figura 38. Azotobacter chroococcum *sobre medio C con penicilina. Se aprecia el ácido desoxirribonucleico coloreado en bandas por Giemsa.* × *860.*

30

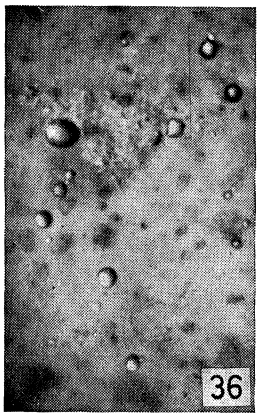

31

32


33


34

35


36

37

38

Figura 39. Azotobacter chroococcum *de un cultivo viejo. Algunas formas de involución se han roto, como puede apreciarse en el centro de la fotografía.* × *930.*

Figura 40. Azotobacter chroococcum *en un cultivo sobre medio C, sembrado de un medio viejo. Formas normales y formas intermedias de regresión.* × *930.*

Figura 41. Formas intermedias de regresión en un estado muy avanzado, casi formas normales. × *930.*

Figura 42. Azotobacter beijerinckii *de un cultivo viejo. Pueden observarse formas de involución de mayor tamaño y menos coloreadas.* × *930.*

Figura 43. Formas intermedias de regresión de Azotobacter chroococcum *con abundante mucílago y algunas formas normales. Esta formación suponemos que la denominaban simplasmas otros autores.* × *930.*

Figura 44. Azotobacter beijerinckii *coloreado por Gram.* × *200.*

Figura 45. Azotobacter beijerinckii *de un cultivo en medio C, resembrado de un cultivo viejo. Elementos levaduriformes un poco alargados y formas* L. × *930.*

Figura 46. Formas intermedias de regresión de Azotobacter chroococcum *en un estado avanzado.* × *930.*

Figura 47. Azotobacter agilis *coloreado por Gram. Cultivado en medio B.* × *1.200.*

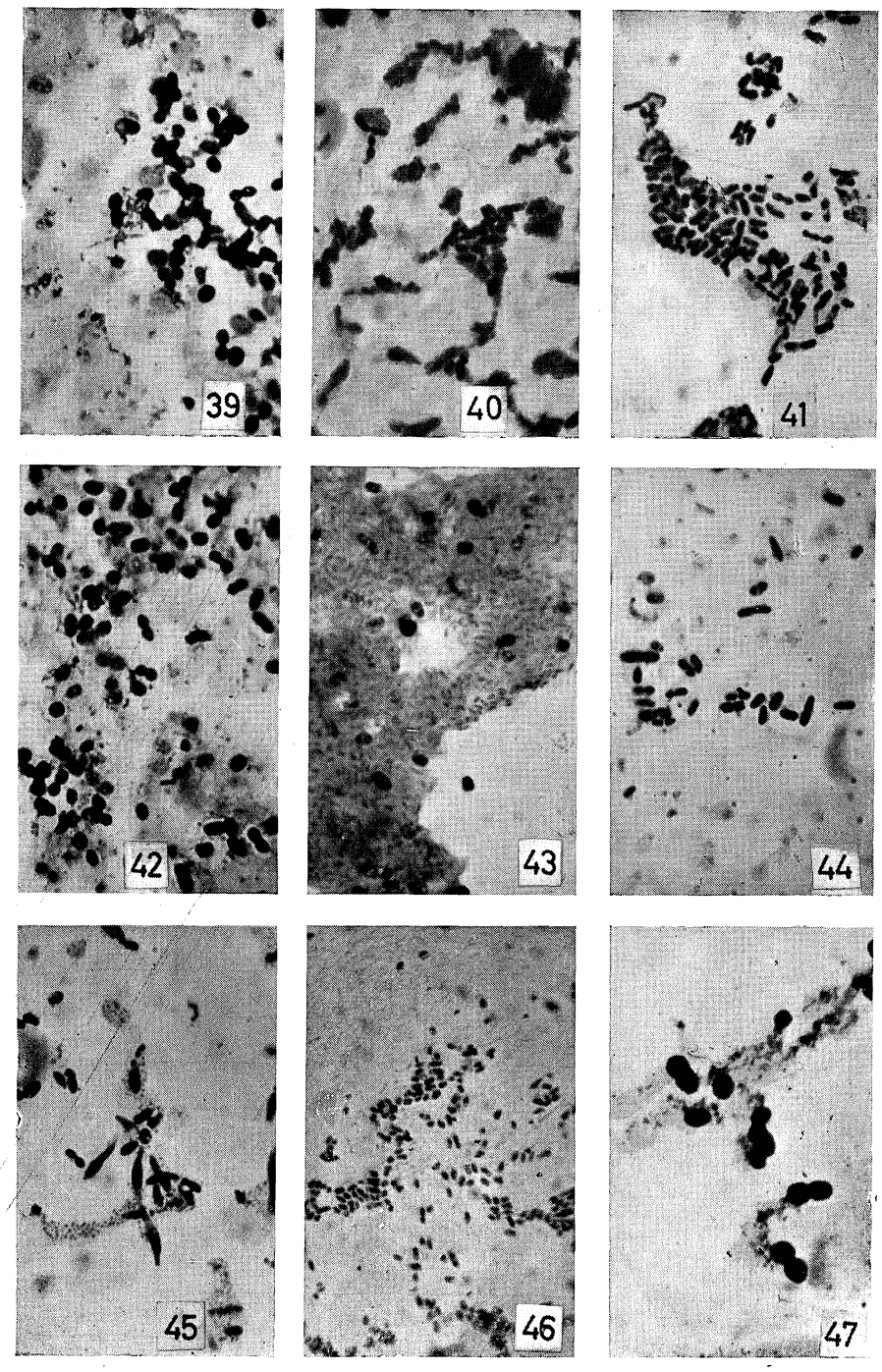

39
40
41
42
43
44
45
46
47

Figura 48. Azotobacter chroococcum *en medio C líquido con penicilina. Formas filamentosas mostrando claramente los extremos transformados en gránulos. Masas de formas* L *envueltas por mucílago.* × *1.400.*

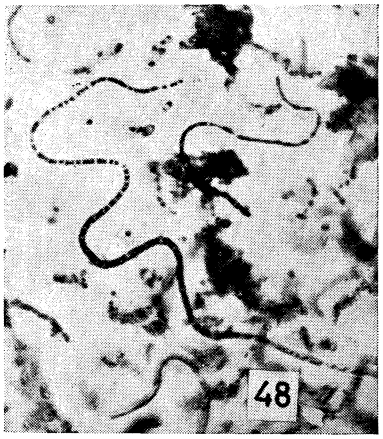
Figura 49. Colonia L, *coloreada y montada según la técnica descrita en el capítulo correspondiente, de* Azotobacter chroococcum *sobre medio C con penicilina.* × *900.*

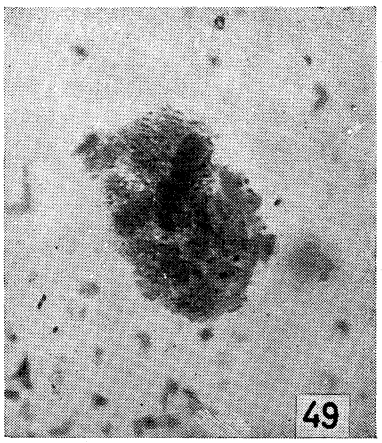
Figura 50. Azotobacter chroococcum *en medio C líquido con penicilina. Formas filamentosas cuyos extremos se resuelven en gránulos.* × *1.400.*

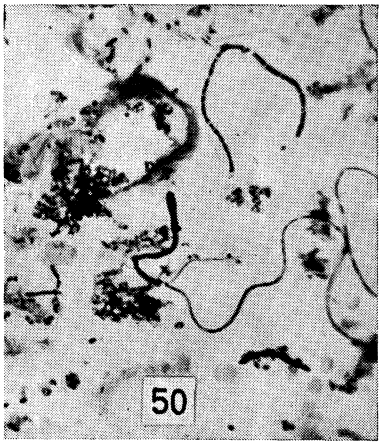
Figura 51. Colonias T *de* Azotobacter chroococcum *sobre medio C sólido con penicilina. Preparación por calcado y coloración con fucsina alcohólica. Formas* L *fijadas.* × *1.800.*

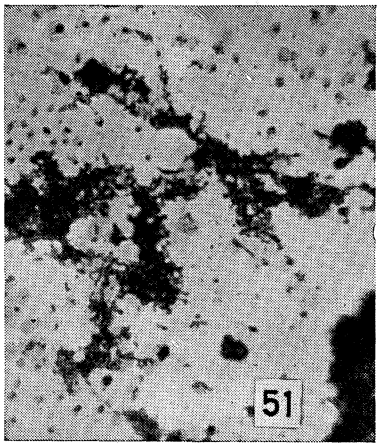
Figura 52. Azotobacter beijerinckii *sobre medio C líquido con penicilina. Formas filamentosas muy finas y pequeños cocos.* × *1.300*

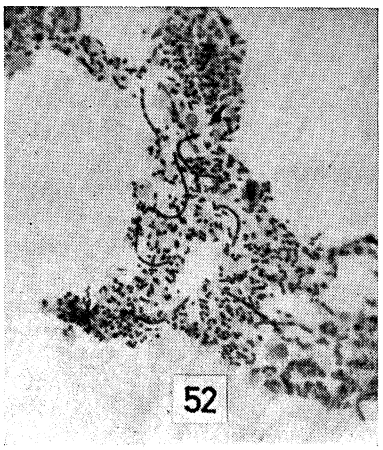
Figura 53. Formas L *fijadas de* Azotobacter agilis. *Coloreadas con fucsina alcohólica y preparación por calcado. Se observan unos filamentos de mucílago con las formas* L. × *1.800.*

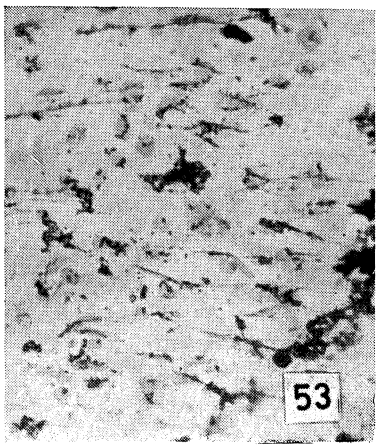

48


49


50


51


52


53

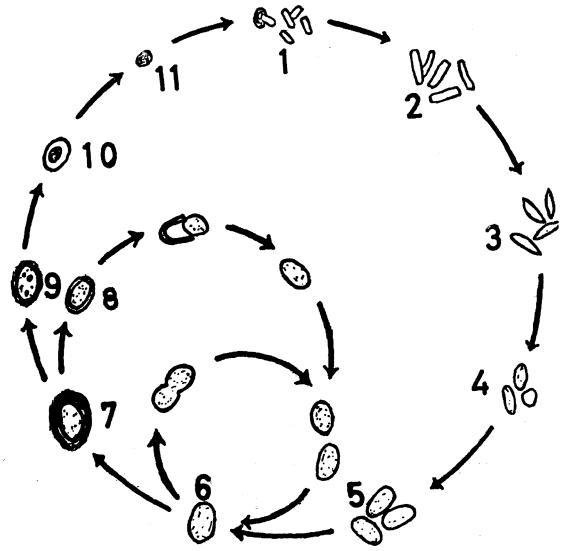


Figura 54. Ciclo en medio sencillo

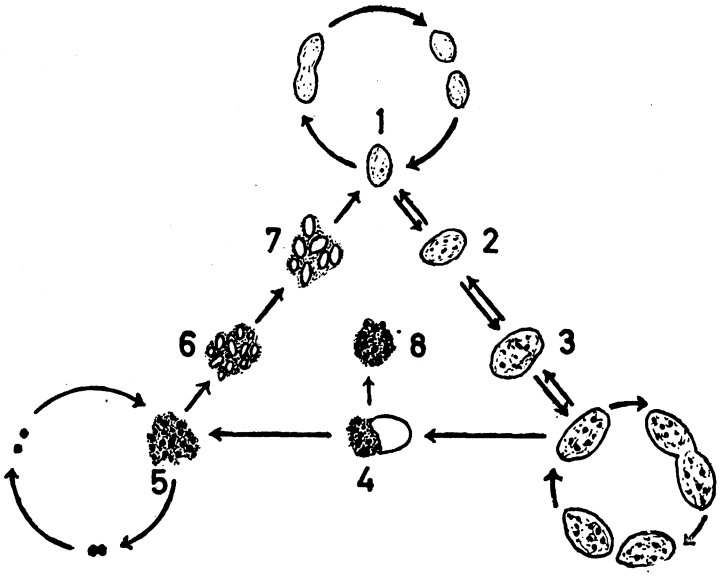


Figura 55. Ciclos L

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

CHARACTERIZATION OF A NEWLY ISOLATED STRAIN OF ACTINOMYCETE IDENTIFIED AS *NOCARDIA V.*

BY

JULIO RODRIGUEZ-VILLANUEVA

Numerous studies on nitro-reductase systems have been carried out with microorganisms. Apart from a few exceptions most of the reports are based on experiments carried out with bacteria, especially *Escherichia coli.* This paper describes the isolation and characterization of a new strain of Actinomycete identified as *Nocardia V.* capable of provoking the biological reduction of the nitro groups of the aromatic nitro compounds.

MATERIAL AND METHODS

Growth media

The media used for growing the organism utilized in this work have the following composition.

a) Complex media.

BPL medium. Peptone, 1 per cent (w/v) and Lab-lemco, 0,3 per cent (w/v) are added to the following basal system: glucose, 2 per cent;

(*) The experimental work recorded in this paper was carried out in the Laboratory of the Medical Research Council Unit for Chemical Microbiology, Departament or Biochemistry, University of Cambridge, and forms part of a Thesis entitled "Reduction of Aromatic Nitro compounds by a Species of *Nocardia*" submitted for the Degree of Doctor of Philosophy at that University.

Na_2HPO_4, 0.5 per cent; KH_2PO_4, 0,2 per cent; $MgSO_4.7H_2O$, 0.02 per cent and $FeSO_4.7H_2O$, 0.001 per cent, all expressed in w/v tap water 100 ml, made up to 1 l with distilled water. Glucose is sterilized separately and added to the medium after autoclaving. Analar reagents have been used where possible.

Strep medium. This medium consists of a tryptic digest of casein buffered at pH 7 and supplemented with 1 per cent glucose and 1 per cent marmite. Agar was added to 2 per cent.

b) Synthetic media.

These media contain substantially the same basal system as BPL medium with the following additions.

Ammonium sulphate medium. $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 per cent.

Glutamic acid medium. l-glutamic acid, 0.2 per cent, added as a neutralised solution.

Growth conditions

For most of the experiments the organism was grown in a 5 l flask containing 2 l of medium. Satisfactory aeration of the cultures was obtained by stirring in the apparatus as described by Peel (16). In other instances 1 l flask containing 500 ml of medium was used and shaken in a water bath at 30° C. The cells were harvested on the centrifuge and washed twice with 0.85 per cent saline solution. The sedimented orgaisms were then resuspended in 0.067 M phosphate buffer pH 7.6. Sterile conditions were maintained throughout when necessary.

Determination of the growth curve

The growth curve of the organism was determined by measuring the optical density of the culture at given times in a Beckman Model DU spectrophotometer at 700 μ. Water was used as a blank for the measurement of the optical density of cultures in synthetic media; those in BPL medium being measured against a sample of the same medium before inoculation. An absorption of 0.3 in the Beckman corresponded to about 5×10^8 cells per ml.

Dry weight determinations

Dry weights of the cells were determined by drying samples to constant weight at 105° C. and correcting for the amount of salt present in the suspending medium.

Viable count determinations

The number of living cells was determined by plating out, in triplicate, known dilutions of culture on BPL medium solidified by addition of 2 per cent agar. Colonies were counted after 48 hr incubation at 30° C.

Inocula

The inocula for some experiments were grown in sterile 50 ml flask containing 5-10 ml volume of the same medium to be used.

For experiments where a larger inoculum was required, the organism was grown in a 500 ml flask containing 100 ml of medium shaken in a water bath at 30°C, harvested on the centrifuge and suspended in sterile 0.067 M phosphate buffer pH 7.6. The required amount of this cell suspension was then used as the inoculum.

IDENTIFICATION OF THE ORGANISM

a) Isolation

Enrichment cultures were prepared in a medium which consisted of: K_2HPO_4, 0.05 per cent; $MgSO_4.7H_2O$, 0.02 per cent; $FeSO_4.7H_2O$, 0.001 per cent; yeast extract, 0.1 per cent and tap water, 1000 ml. To this were added sterile (by Seitz filtration) solutions of the sodium salts at 0.2 per cent (w/v) concentration of 1) p-nitrophenol, 2) 2:4 dinitrophenol, 3) picric acid, and 4) 5:6-dinitro-o-cresol. The medium was adjusted to an initial pH value of 7.8 - 8.0.

The medium was distributed in 25 ml quantities in 100 ml Erlenmeyer flasks and each flask was inoculated with about 1 g of soil. The enrichment cultures were incubated with shaking in a water bath at 25°C and examined microscopically at intervals for the presence of coryneform bacteria. After three successive transfers in the same medium, the desired organisms appeared in some of the soil cultures after ten days.

Samples from the same cultures were diluted 1/10, 1/100, 1/1000 with sterile distilled water and then streaked on a solid medium of similar composition to that described above but adding: glucose, 1 per cent; asparagine, 0.1 per cent and agar, 2 per cent. After incubating for eight to ten days at 25° C. a few well isolated, light pink colonies of small size and pasty appearance could be seen. Pure colonies were obtained by restreaking, first on the same medium on fresh plates and later on Strep medium. Five cultures of coryneform-like bacteria were isolated and tentatively identified by their morphological and cultural properties.

b) Morphological observations

The organism appear in young cultures (1-2 days growth at 25° C.) on solid BPL or Strep medium, as irregularly branched, chiefly non-septate filaments, 25-30 mμ in length (figure 1), often with small swelling at intervals in their length. After three days incubation at 25°C shorter fiilaments occur, about 5-8 mμ in length. After five days incubation fragmentation starts, giving rise to bacillary forms (3 × 0.5 mμ) (figure 2) which are then the predominant form observed in the cultures. Fragmentation was not observed to be preceded by cross wall formation, although in electronmicrographs it was possible to note the presence of some isolated septa (figure 1, indicated by arrow). However it is possible to see longer filaments until the fifteenth day, by which time the short rods have divided to form coccoidal cells (figure 3). These coccoid spore-like forms, when contained in filaments, form chains, which, when examined by phase contrast microscopy, are hyaline in appearance. After one month colonies consist almost entirely of short rods and coccoid forms. These latter are heat sensitive (10 min at 70°C being enough to kill them).

Growth in shaken liquid medium generally gives rise to short cells during the exponential phase and, after this, to coccoid forms. At the stages when the bacillary and coccoidal forms occur the cells tend to aggregate, giving rise to large clumps, under all the enviromental conditions tested. This may be due to a sticky nature of the cell wall or to the layer of the slime layer of the organism (7). In preliminary experiments (designed to fragment cells in the Mikle disintegrator (13) it was found difficult to obtain suitable broken preparations. This may be in part attributed to the sticky properties of the cells described above.

c) Cultural characters

After three days at 25°C on Strep medium, the organism produces a vigorous, light cream filamentous growth, the colonies having a paste-like consistency, with finely-wrinkled margin. The colonies are in general circular, without aerial mycelium and never brightly coloured; a light pink coloration is produced in the colony after 25-30 days incubation at 25°C when the culture consists mainly of coccoid forms.

No soluble pigment is produced in the growth medium under any of the conditions tested. In liquid BPL medium, a turbidity is first produced and later a homogeneous white sediment.

d) Biological properties

The organism is obligately aerobic, growing well in shaken cultures, but only produces a tenuous pellicle on the surface of an unshaken medium. It is Gram-positive and acid fast. Acid is produced from glucose, sucrose and glycerol, and there is not apparent liquefaction of gelatine. A weak alkaline reaction is produced in litmus milk, and nitrite is not produced from nitrate. Starch is not hydrolysed. With ammonium sulphate as sole nitrogen source growth is quantitatively less than that in BPL medium. Less growth occurs with *l*-glutamic acid as sole nitrogen source. Growth is poor on *l*-arginine and *l*-cystine, and very poor on *l*-aspartic acid.

In BPL medium the organism grows well and with identical characteristics at pH values between 5.8 and 7.8. Growth is poor at pH values lower than 5.8.

The organism grows readily at temperatures between 21°C and 32°C, the rate of growth falling sharply above 34°C, and ceasing at temperatures above 35°C. When cultured at low temperature (22°C) the early filaments formed in liquid BPL medium are more ramified than those observed when growing at 30° C.

c) Maintenance

The organism is maintained by subculturing every 10-12 days on slopes of BPL medium agar, and grown aerobically at room temperature. Organisms are kept in the collection of the M.R.C. Unit for Chemical Microbiology in the frozen dried state.

f) Classification

The organism can be placed taxonomically, by its general cell morphology, in the general class of coryneform-like soil bacteria.

Recently a number of different classifications have been proposed for these organisms and, as reported by Cummins and Harris (10), there has been much disagreement among the different workers. They have proposed, by using the composition of the cell wall as a basis, what would appear to be a logical classification for the Actinomycetales. Other recent papers by Romano and Sohler (18), Romano and Nickerson (17), Sohler, Romano and Nickerson (20), Hoare and Work (11), Avery and Blank (1), and Bishop and Blank (3 and 4) have confirmed the value of this method as providing evidence for the taxonomic relationships of this group of microorganisms. On purely morphological grounds, the organism may be placed in the *Actinomycetaceae,* as described by Bergey (2) but in order to define the taxonomic position more narrowly it was decided to investigate the composition of the cell wall, so enabling a direct comparison to be made with the scheme of classification proposed by Cummins and Harris (10).

According to Romano and Sohler (18), the differentiation of the genera *Nocardia* and *Streptomyces* is unusually difficult, owing to the wide variation of morphological and colonial characteristics encountered (21), such as the production or not of aerial mycelium and fragmentation

of vegetative hyphae. However, studies of cell wall analysis enable each organism to be placed in its proper grouping.

Growth of the organism to obtain cell wall preparations

Cells were grown in BPL medium as described above. Organisms were harvested from an exponentially growing culture washed four times with distilled water and resuspended in distilled water to a cell density of about 10 mg dry weight of cells per ml. All manipulations were carried out at room temperature.

Isolated cell walls were prepared by the method of Salton and Horne (18) by using the Mickle disintegrator. 10 ml of the cell suspension were added to each cup of the machine and shaken with 10 ml of grade 12 Ballotini glass beads for 20 min at 4°C. The rubber stoppers of the cups were covered with cellophane. Breakage was followed by microscopic examination of Gram-stained material; whole cells were found to be Gram-positive, while liberated cell walls were Gran-negative.

After breakage, intact cells and debris were removed by centrifugation at 2000 × g for 20 min. and the cell walls then spun down at 15000 × g for a further 20 min on a Servall angle centrifuge. The sediment was washed twice with distilled water resuspended in 0.067 M phosphate buffer at pH 7.6 and then digested at 37°C for 5 hr with cystalline trypsin (BDH) at a concentration of 200 µg/ml. This led to a decrease in opacity of the suspensión. The total suspension was then centrifuged at 15000 × g, washed with 0.02 N HCl solution, resuspended again in 0.02 N HCl to which was added 250 µg of crystalline pepsine (Armour) per ml and digested at 37°C for 6 hr. The digest was centrifuged at 15000 × g and washed once with 1M NaCl solution. The sediment was then spun down and washed three times with distilled water. The purity of the preparation was checked by electron microscopic examination (figure 4).

Properties of the cell wall preparations; lysozyme sensitivity

No change in optical density was found when a suspension of cell walls, of optical density about 0.400 in 0.067 M phosphate buffer at pH 6.5 and 0.01 M NaCl was incubated at 37°C in the presence of crys-

tallised egg-white lysozyme (Armour) at 10-100 µg. per ml and read in the Beckman model DU spectrophotometer every 5 min at 420 µ. Similar results are obtained with intact cells and the organism is thus resistant to lysis by lysozyme, under thése conditions.

Cell wall hydrolysis procedure

Cell walls were hydrolysed immediately after preparation using about 40 mg dry weight for the analysis of their sugars and amino acids composition. The general procedure was that described by Cummins and Harris (8).

Chromatography

Chromatography of the cell wall hydrolisates was carried out by descending paper chromatography on Whatman N.° 1 paper. The solvent was ethyl acetate/ pyridine/ water (2:1:2) and the papers irrigated with the solvent solution for 16 hr. Sugars were detected after drying the papers by spraying with aniline hydrogen phtalate, as described by Partridge (15).

Chromatographic analysis, of the amino acids ocurring in the cell wall was effected after acid hydrolysis, by ascending two dimensional paper chromatography on Whatman No. 4 paper. The solvents used were sec butanol/ formic acid/ water (70:10:20) followed by aqueous phenol (80 per cent, w/v) containing 0.3 per cent (v/v) ammonia (sp gr 0.88). After drying, chromatograms were sprayed with ninhydrin (0.2 per cent w/v in acetone) and developed by heating at 105° C. for 5 min. The amino acid spots were identified by comparison with known compounds.

Hoare and Work (11) hace reported the distribution of the steroisomers of α-ε-diaminopimelic acid in the order Actinomycetales. Cummins and Harris (10) confirmed these findings and have used them in taxonomic studies. For that reason, large samples were taken from the amino acid fraction already described and analysed by the method described by Hoare and Work (11) (*). One dimensional chromatography

(*) I am indebted to Dr. K. McQillen for supplying samples of reference diaminopimelic acid isomers and for his valuable advice and suggestions during the amino acid analysis studies.

on Whatman No. 1 paper was used, the solvent being methanol/ water/ 10 N HCl/ pyridine (80:17.5:25:10 v/v). After running the chromatograms for 16 hr the compounds were detected, after drying, by spraying with ninhydrin (0.2 per cent w/v in acetone) and heating at 105°C for 3-5 min. A crude separation of the *l l*-isomer of diaminopimelic acid from the meso form was obtained by this method. The diaminopimelic acid spots appeared with a characteristic green colour, which later changed to a stable yellow colour. Other amino acids tested were found to cause no interference with the separation.

Results from the chromatographic studies. Arabinose and galactose were shown to occur in the hydrolysed cell walls of the organism and were readily separated by the procedure described above. A typical separation is shown in figure 5. In this system, arabinose and glucose cannot be separated. However, they were easily differentiated by the dark red colour given by the pentose when sprayed with aniline hydrogen phthalate as compared with the brown colour obtained with the hexose. This may be seen more clearly when viewed under ultraviolet light (3660 This may be seen more clearly when viewed under ultraviolet light (3660 Å) as the pentose spot fluoresces bright red, while the hexose spot fluoresces brown.

Examination of hydrolysed material by paper chromatography showed that many amino acids were present in the cell wall (figure 7). The predominant components were glutamic acid and alanine, but there were also considerable amounts of serine and threonine present. The results of the diaminopimelic acid studies are shown in figure 6. The hydrolysed cell wall contained only meso-diaminopimelic acid in sufficient amounts to be easily identified. No trace ot the *l l*-isomer could be detected.

DISCUSSION

The most recent classifications of the Actinomycetales are those of Bisset and More (5), based on cell morphology, and of Cummins and Harris (10), based on the chemical composition of the cell wall. The latter authors closely relate the three genera *Nocardia, Mycobacterium* and *Corynebacterium,* placing them together into the family *Mycobacteriaceae.*

The general cell and colonial morphology of the isolated organism in the present study agrees very closely with that of the genus *Nocardia* as described by Waksman and Henrici (21). The latter workers proposed the inclusion of the genus *Nocardia* of obligatory aerobic actinomycetes that produce branched mycelia, which are transitory and, at some stage of their life, fragment into spore-like forms. They are easily separated from the genus *Actinomyces* by their oxygen requirements, the two genera being included in the family *Actinomycetaceae.*

The long and branched mycelium occurring at early stages of growth on a solid medium, might differenciate the organism under study from the *Mycobacterium* and *Corynebacterium.* McClung (12) suggests that a useful criterion to differenciate an actinomycete from the branched bacteria, *Mycobacterium* and *Corynebacterium,* would be the acceptance of the empirical concept of a "branchhed hyphae at least 10 microns long". However, this arbitrary separation was not readily acceptable because, as he later recognised (13), there are strains in which mycelial formation is very ephemeral, being detectable only in very young cultures. On the other hand *Nocardia* strains occur which form a mycelium that is quite permanent, fragmentation ocurring only in old cultures. These morphological investigations reemphasise the wide diversity of mycelial formation in these organisms. Acid-fastness may also be used to distinguish the genus *Nocardia* from *Corynebacterium* (9) but not from *Mycobacterium.*

The results obtained from the studies on the cell wall composition also agree very well with the characteristic cell wall components found by Romano and Sohler (18), Hoare and Work (11) and Cummins and Harris (10). Arabinose and galactose are representative sugars, and alanine, glutamic acid and *d l*-diaminopimelic acid as amino acids, were found consistently in the isolated and hydrolysed cell walls. The absence of a characteristic sugar in *Streptomyces* and *Micromonospora,* together with the presence of *l l*-diaminopimelic acid, readily distinguish the present organism from these genera.

Romano and Sohler (18) have reported that the cell walls of *Streptomyces* species are lysed by lysozyme and that cell walls of *Nocardia* species are resistant to the action of this enzyme. This observation appears to be further evidence for the classification of the isolated

organism in the genus *Nocardia*. However, Bradley (6) has recently reported that *Nocardia paraguayensis* is sensitive to the action of lysozyme which produces protoplasts from intact cells.

A comparison between the reaction of isolated organism and apparently closely related species of *Nocardia* are summarised in table 1. According to Bergey (2), the organism can thus be tentatively classified as a *Nocardia* closely related to the species *N. opaca* and *N. corallina*.

Table 1. Comparison of Nocardia *species*

Properties	*Nocardia V.*	*N. opaca*	*N. corallina*
Acid-fast stain	+	+	—
Gram stain	Positive	Positive	Positive
Optimum growth temperature	28-30° C.	30° C.	25° C.
Optimum growth pH .	6.8-7.6	6.8-7.3	6.8-8.0.
Growth on gelatine ...	No liquefaction	No liquefaction ...	No liquefaction.
Growth on broth	Turbid (sediment)	Turbid	Usually turbid.
Growth on litmus milk	Lightly alkaline	Lightly alkaline ...	Lightly alkaline.
Growth on glucose ...	Acid production	No acid production..	No acid production.
Grovth on sucrose ...	Acid production	No acid production.	Acid production
Growth on glycerol ...	Acid production	?	No acid production.
Production of nitrite	—	+	+

SUMMARY

This paper describes the isolation and characterization of a new strain of Actinomycete able to reduce the aromatic nitro-compounds. Growth conditions and biological properties are described.

The method of Cummins and Harris (10), by using the composition of the cell wall of the organism as a basis, was followed for classification. The purity of the cell wall preparation was checked by electron microscopic examination. The cell wall preparation was resistant to the action of lysozyme. Chromatographic analysis of the sugars and amino

acids occurring in the cell wall was effected after acid hydrolysis. Arabinose and galactose are representative sugars, and alanine, glutamic acid and *d l*-diaminopimelic acid as amino acids were found consistently in the isolated and hydrolysed cell walls.

By a comparison between the general cell and colonial morphology, biological behaviour and cell wall composition of the isolated organism and other related species, suggests that the organism can be tentatively classified as a species of *Nocardia*.

RESUMEN

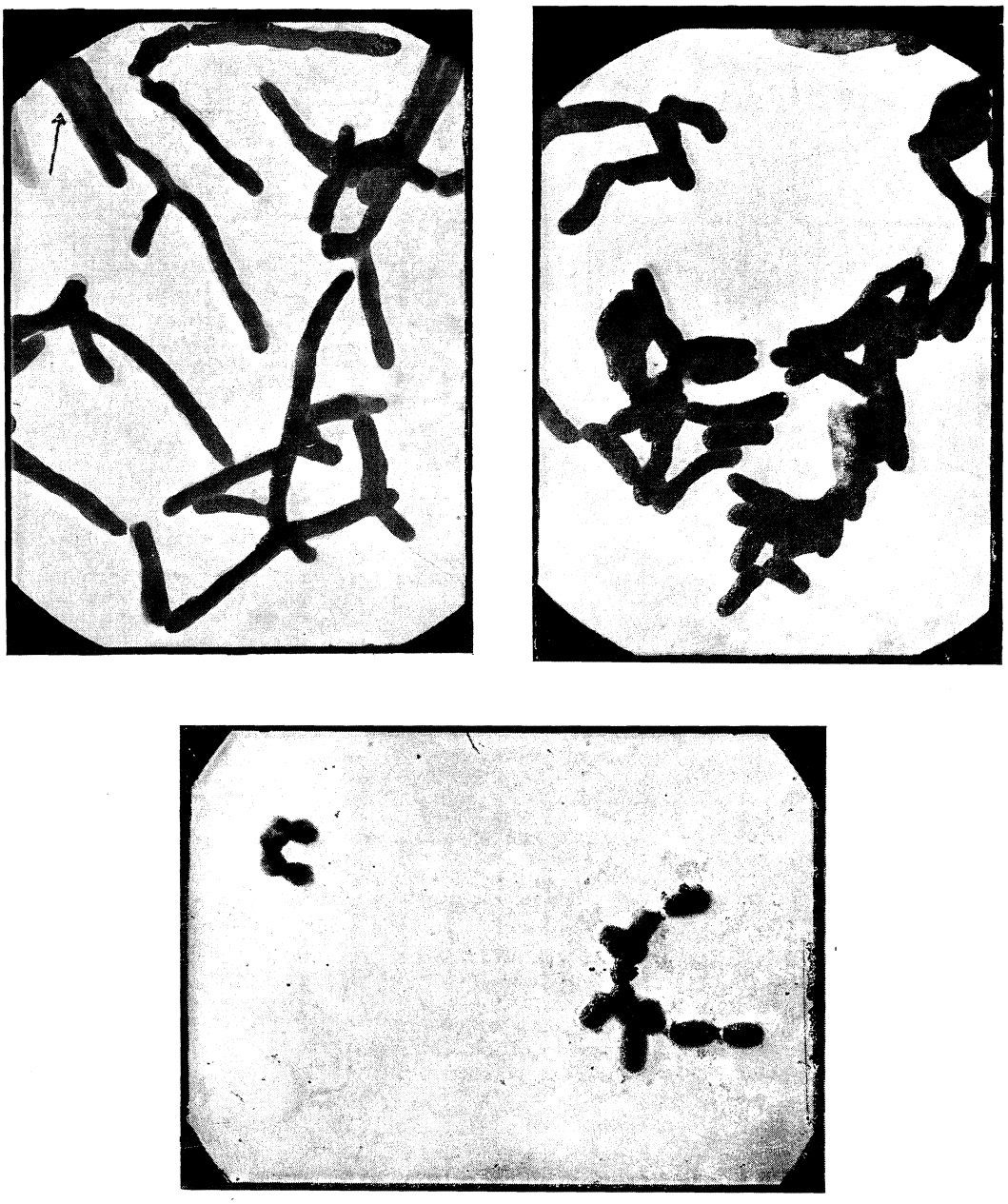
Se describe el aislamiento y caracterización, así como las condiciones de crecimiento y propiedades biológicas de un nuevo actinomiceto capaz de reducir los nitroderivados aromáticos.

Como método de clasificación se sigue el de Cummins y Harris (10), que utiliza como base la composición de la pared celular externa del organismo. La pureza de las preparaciones de paredes celulares es comprobada por examen cuidadoso al microscopio electrónico. Suspensiones de estas paredes son resistentes a la acción de la lisozima. Al efectuar un análisis cromatográfico de los azúcares y aminoácidos que están presentes en la pared celular, previa hidrólisis ácida de este material, se encuentran como azúcares característicos la arabinosa y la galactosa, y como aminoácidos la alanina, ácido glutámico y la forma meso del ácido diaminopimélico.

El organismo aislado se clasifica como una especie de *Nocardia,* después de comparar la morfología general de las células y colonias, propiedades biológicas y la composición de las paredes celulares de este organismo, con las de otras especies íntimamente relacionadas.

REFERENCES

1. AVERY, R. J. and BLANK, F. 1954. Can. J. Microbiol., 1, 140.
2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1948. 6th Ed. Edited by Breed, E. S., Murray, E. G. D. & Hitchens, A. P., Pub. Bailliere, Tindall & Cox. London.
3. BISHOP, C. T. and BLANK, K. F. 1954. Can J. Microbiol., 1, 140.
4. BISHOP, C. T. and BLANK, K. F. 1954.. Can. J. Microbiol., 4, 35.
5. BISSET, K. A. and MORE, F. W. 1949. Nature, Lond., 164, 443.
6. BRADLEY, S. G. 1959. J. Bact., 77, 115.
7. CLARK, J. B. 1958. J. Bact., 75, 400.
8. CUMMINS, C. S. and HARRIS, H. 1956. J. gen. Microbiol., 14, 583.
9. CUMMINS, C. S. and HARRIS, H. 1956. J. gen. Microbiol., 15, IX.
10. CUMMINS, C. S. and HARRIS, H. 1958. J. gen. Microbiol., 18, 173.
11. HOARE, D. S. and WORK, E. 1957. Biochem. J., 65, 441.
12. MCCLUNG, N. M. 1949. J. Bact., 12, 137.
13. MCCLUNG, N. M. 1954. Ann. N. Y. Acad. Sci., 60, 168.
14. MICKLE, H. 1948. J. R. Micro. Soc., 68, 10.
15. PARTRIDGE, S. M. 1949. Nature, London, 164, 443.
16. PEEL, J. L. 1951. Ph. D. Tesis. University of Cambridge, 68.
17. ROMANO, A. H. and NICKERSON, W. J. 1956. J. Bact., 72, 478.
18. ROMANO, A. H. and SÖHLER, A. 1956. J. Bact., 72, 865.
19. SALTON, M. R. J. and HORNE, R. W. 1951. Biochem. Biophys. Acta, 7, 177.
20. SÖHLER, A., ROMANO, A. H. and NICKERSON, W. J. 1958. J. Bact., 75, 283.
21. WAKSMAN, S. A. and HENRICI, A. T. 1943. J. Bact., 46, 337.



Figures 1-3. Electron-micrographs of Nocardia V. *at different stages of growth.*
(5000 × magnification)

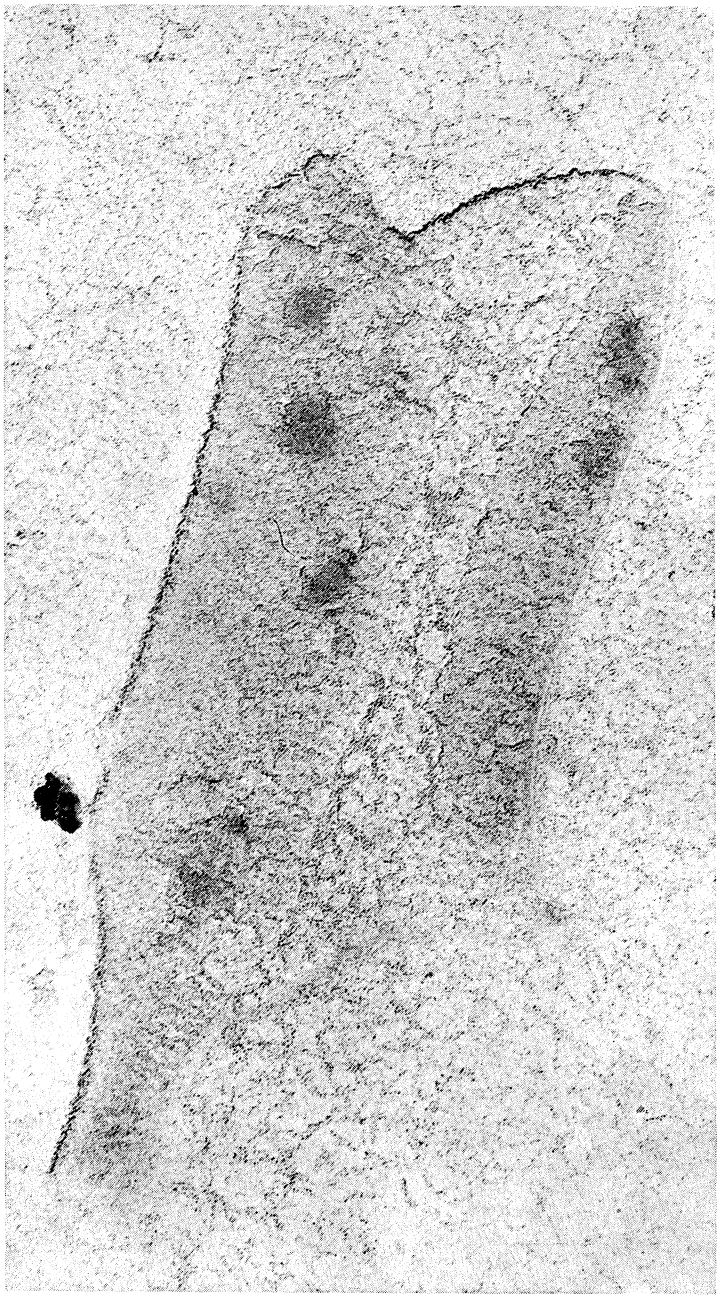


Figure 4. Electron-micrograph of cell wall preparation from Nocardia V. *(50000 × magnification)*

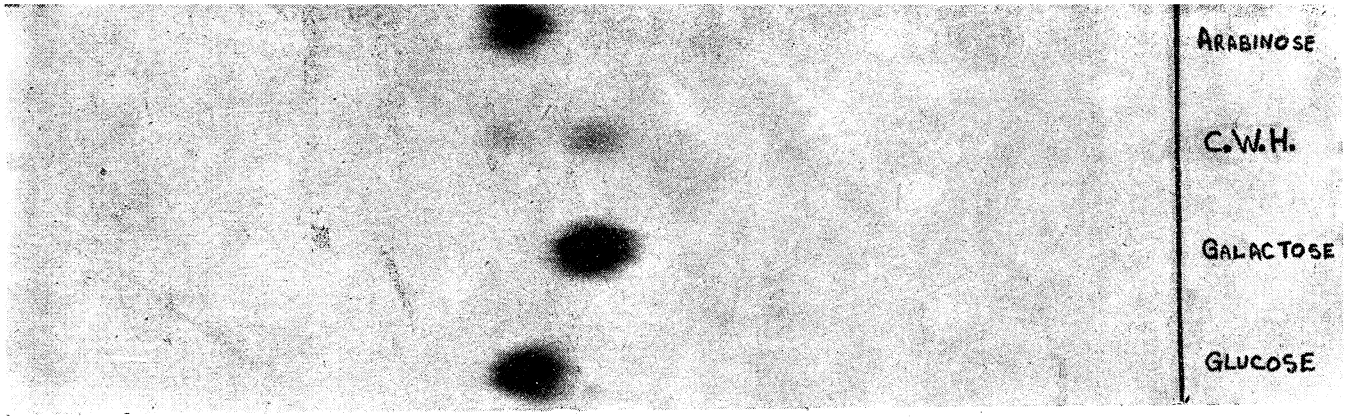


Figure 5

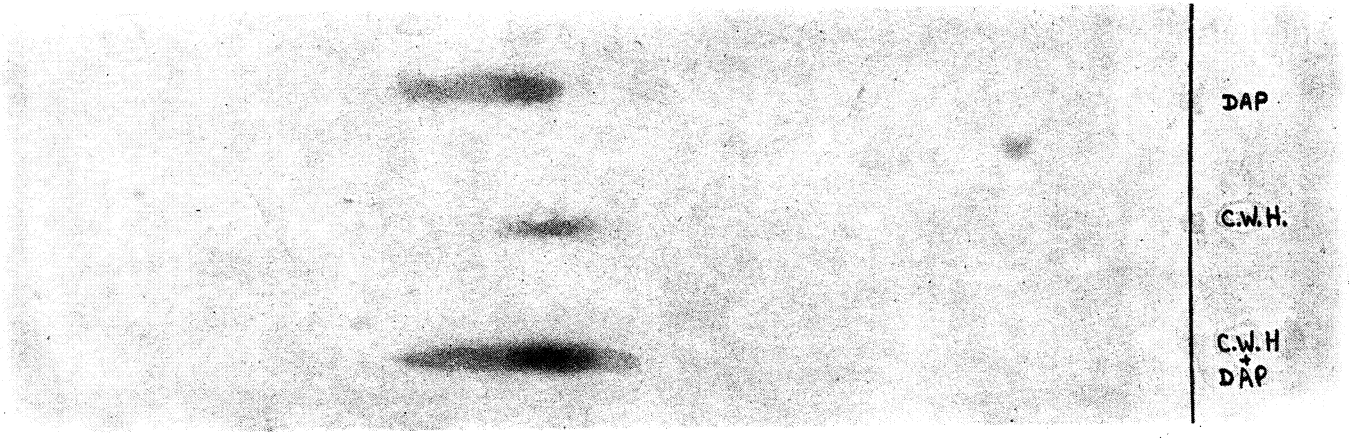


Figure 6

Chromatographic analysis of the sugars (figure 5) and diaminopimelic acid (figure 6) present in the cell walls of Nocardia V. *(C. W. H. v, cell wall hydrolised; DAP, Diaminopimelic acid)*

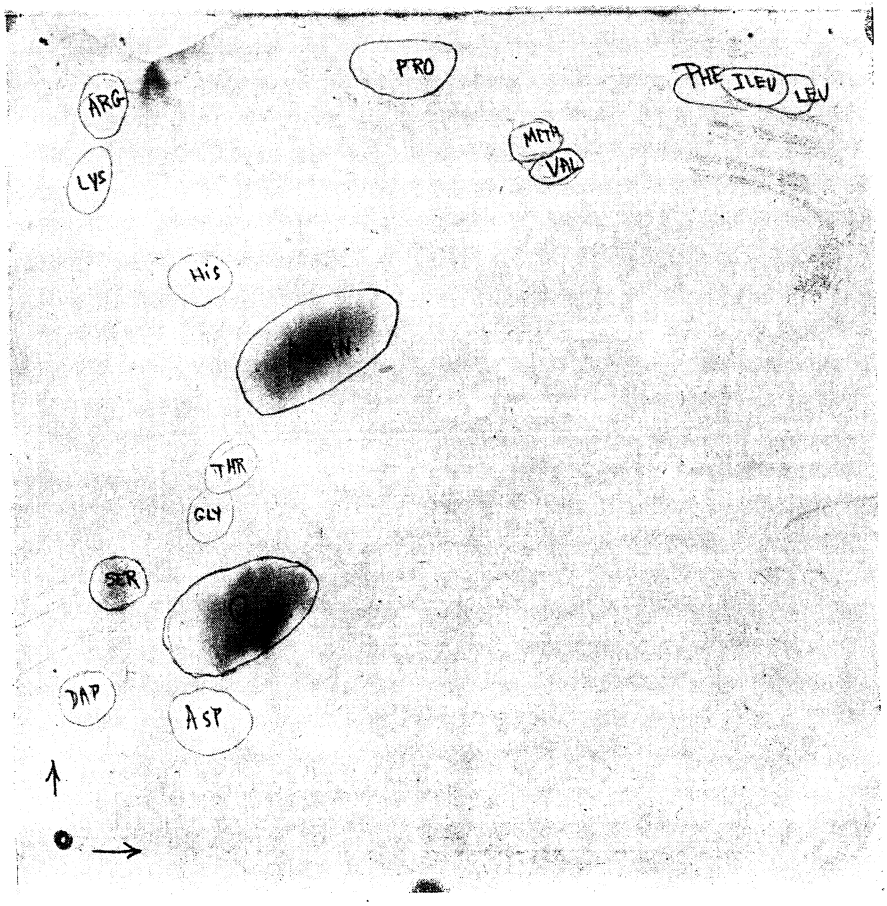


Figure 7. Chromatographic analysis of the amino acids present in the cell walls of Nocardia V.

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

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

POR

EMILIO RONDA LAIN

INTRODUCCION

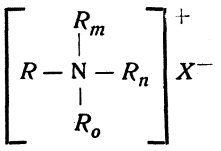
Desde que en 1935 fue señalada por Domagk la actividad desinfectante de los compuestos de amonio cuaternario hasta la actualidad, son numerosas las publicaciones con el propósito de estudiar sus propiedades microbicidas; y sin embargo, es curioso el hecho de que en esta época en que los virus acaparan la actualidad mundial, no hayan aparecido apenas trabajos referentes a las posibles interacciones virus-sales de amonio cuaternario.

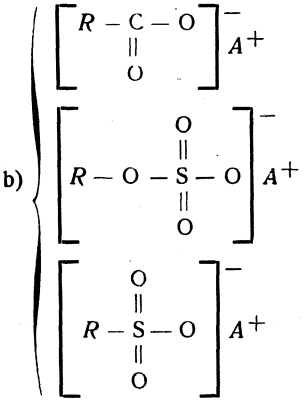
Nuestro propósito, en este trabajo, es el estudio de un grupo de cinco de estos compuestos, cuya verdadera calificación es la de "substancias tensiactivas" de amonio cuaternario.

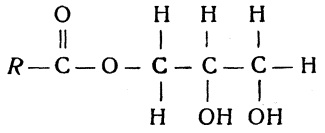
Naturaleza química y propiedades

Estas sustancias, poseyendo largas cadenas de alcohilos, son capaces de disminuir la tensión superficial de las soluciones. Fueron sintetizadas primeramente —según Jacobs (12) por Mannich y Hahn en 1911 (22), pero no se pensó en su utilidad germicida y antiséptica hasta casi un cuarto de siglo más tarde de su estudio por Jacobs. En ellas

es posible diferenciar tres grupos: a) catiónico, b) aniónico y c) no-iónico, que se representan estructuralmente en las fórmulas siguientes:

a)


b)


c)


donde *R* se corresponde con un grupo lipofílico, que puede ser una larga cadena de alcohilos o policíclica y que se une a la porción hidrófila de la molécula; *A* representa el ión positivo, tal como NH_4 en estos casos; *X*, el ión negativo, y *Rm*, *Rn* y *Ro* pueden ser átomos de H, radicales alcohilos, arilos o grupos heterocíclicos. Por tanto, los germicidas del grupo de los detergentes de amonio cuaternario se caracterizarán como grupos aminados de covalencia 5, como sucede en el caso del $ClNH_4$, del cual pueden considerarse derivados estructuralmente sustituyendo sus átomos de H por uno o más radicales alcohilos o fenilos, y sobre todo es indispensable una larga cadena carbonada derivada de resinas o aceites de origen animal o vegetal; a esta cadena, que ha de tener C_8 a C_{18}, están subordinadas las propiedades tensiactivas de las moléculas de estos compuestos cuaternarios de amonio.

Son incoloros, inodoros y altamente estables; carecen de cloro activo, yodo, fenol, mercurio y otros metales pesados que desaconsejen su uso y carecen de toxicidad cuando se manejan a las concentraciones recomendadas.

Los detergentes de amonio cuaternario se pueden obtener por síntesis en perfecto estado de pureza, son solubles en agua y no son tóxicos por sus posibles productos de descomposición.

Actividad y aplicaciones

Si bien todas estas substancias se han mostrado como efectivas en la destrucción de distintos organismos vivientes, como lo avalan la gran cantidad de publicaciones aparecidas desde 1935, es dado encontrar algunas diferencias entre los distintos grupos, respecto a su *actividad.* Así, mientras los catiónicos son igualmente eficaces contra gérmenes Gram-positivos o Gram-negativos, los aniónicos se muestran activos, relativamente, frente a los primeros, y los no-iónicos apenas la tienen para ninguno.

Esta acción sufre también *interferencias,* incluso entre estas mismas substancias; así, no es raro encontrar trabajos que refieran un marcado antagonismo en las actividades germicidas entre los catiónicos y aniónicos, cosa que no sucede con los no-iónicos u otras substancias que se añaden a los catiónicos para conseguir productos de mayor potencia germicido-detergente.

Otras interferencias, de mayor interés para nosotros, son las que se producen entre los compuestos de amonio cuaternario y la materia orgánica, hecho ya comprobado por Schneider (27) al observar como un 10 por 100 de suero, en la mezcla de ensayo, es capaz de reducir la actividad bactericida de un compuesto de este tipo a la décima parte; de modo análogo, Hornung (11) en su estudio de la actividad germicida de los detergentes catiónicos de amonio en presencia de materia orgánica, señala la necesidad de elevar al triple la concentración de una dilución acuosa de estos compuestos para destruir un cultivo de *M. pyogenes* var. *aureus* en quince minutos cuando hay presente un 16 por 100 de suero. Posteriormente, se ocupan Ridenour y Armbruster (25), por un lado, de la influencia orgánica sobre la actividad de los compuestos de amonio cuaternario, y por otro, de la falta de influencia de los cationes sodio y potasio, así como de algunos aniones entre los que se cuenta el cloro; hecho muy importante para nosotros, ya que nos permitió utilizar la solución salina sin temor alguno a influencia en cuanto a su composición química se refiere.

Antecedentes en el campo de la virología

En relación con su actividad sobre los virus, lo poco publicado entra dentro de conclusiones no homologables, como lo prueba el buen acuerdo de Klein (16) al desear el establecimiento de un patrón de actividad viricida análogo al coeficiente de fenol utilizado para las bacterias y sugerir que una substancia de este tipo podría ser definida como aquella que en una dilución dada inactiva rápidamente virus diferentes y por un procedimiento normalizado. El espectro de virus sería a base de virus ECHO, influenza, herpes, vacuna, coxsackie, poliomielitis y alguno del grupo psitacosis-linfogranuloma.

Es cierto que la inactivación de los virus, estudiada bajo diversas condiciones por Lauffer y Geller (20), es bastante más difícil que la de los protozoos, hongos y bacterias, propiedad utilizada por Kaiser (13) para la preparación de una vacuna antivariólica limpia de bacterias contaminantes, por medio de sales de amonio, sin observar efecto letal sobre el virus. El uso continuado del cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio por Ducor (5), para la preparación del abdomen escarificado de terneras antes de la recolección de la linfa vacunal, ha llevado a la consecución de una mínima presencia de bacterias contaminantes.

Maier (21) observa que 1/80.000 a 1/100.000 del germicida mata al *S. aureus* en menos de veinticuatro horas y 1/30.000 a 1/35.000 lo mata en diez a treinta minutos. En contraste con la sensibilidad de este último microorganismo al cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio, el autor encuentra que 1/50.000 del compuesto no interfiere en la reproducción del bacteriófago estafilocócico. Además, la mezcla fago-desinfectante es capaz de presentarse activa después de tres meses de almacenamiento en refrigerador.

Concentraciones de 1/10.000 a 1/20.000 de esta substancia han sido utilizados con éxito franco por la Sanidad de la Marina de Guerra de E. U. A. (23) para la destrucción de bacterias contaminantes en lavados de garganta y en suspensiones conteniendo virus de influenza. Y se halló que, mientras 1/10.000 del germicida destruiría las bacterias patógenas, la misma concentración sería inactiva contra los tipos A y B del virus de influenza al actuar durante una hora a temperatura ambiente.

En siguientes estudios (29), en los cuales fueron examinados cuatro métodos para el aislamiento del virus de influenza a partir de enjuagados de garganta, adsorción sobre hematíes y tratamiento con 1/20.000 de concentración final de esta substancia, dan lugar al más alto número de resultados positivos.

Kalter, Mordaunt y Chapman (15) describen un método para el aislamiento del bacteriófago del *E. coli* procedente de aguas residuales por medio de los detergentes catiónicos: N-alquil-acidoester del colamino-formil-metilo, cloruro de aquil-metil-bencil-amonio y cloruro de cetil-piridinio en una dilución final de 1/5.000, con o sin incubación primaria. Hammon y Reeves (10) hallan que una dilución de 1/10.000 de cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio no tiene efecto viricida sobre los virus de la encefalitis equina Oeste y de San Luis. También son negativos los trabajos de Toomey y Takaes (28) y los de Faber y Dong (6) sobre diluciones acuosas y alcohol-acetónicas de estos detergentes, que no mostraron actividad alguna frente al virus de la poliomielitis.

Por otra parte, los hallazgos precedentes están en desacuerdo con el uso que Crowley y Jackson (3) hacen de ciertos detergentes de este tipo para prevenir contagios hospitalarios por poliovirus; así como con el que otros recomienden el empleo de sus soluciones acuosas para el tratamiento de heridas por mordedura de perros sospechosos de rabia (Worley (31); Vinnard (30); normas de las Fuerzas Armadas de E. U. A., 1956; Sanidad pública de Los Angeles, 1953), hecho que más tarde fue confirmado por varios autores, pero en estudio comparativo con otras varias substancias, obteniendo resultados convincentes frente al virus rábico, cuyo tratamiento en heridas por mordeduras puede lograrse con lavados mediante solución al 1 por 100, que son bien tolerados por los pacientes.

Klein y Stevens (18 y 19) determinaron la actividad *in vivo* e *in vitro* de 20 compuestos, incluyendo detergentes catiónicos, aniónicos y no-iónicos, contra el virus A de influenza. Las pruebas *in vitro* se realizaron haciendo la mezcla a temperatura ambiente del laboratorio e inoculando a ratón blanco por vía intranasal 0,05 cm^3 de la mezcla; en las pruebas *in vivo* el antiséptico fue instilado intranasalmente o nebulizado en cámara cerrada antes e inmediatamente después de la inoculación del virus. Las pruebas *in vitro* han demostrado que los detergentes catiónicos,

cloruro de cetil-piridinio y cloruro de octil-fenoxietoxietil-dimetil-bencil-amonio y cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio tienen una definida acción viricida; sin embargo, *in vivo* no han demostrado poder protector. Añadiendo resultados sobre la efectividad de los detergentes de amonio contra los virus, podemos citar las afirmaciones de Brown, Itatani y Moulder (1) sobre la inactivación rápida por cloruro de cetil-piridinio, del virus de la neumonitis felina.

También, con resultados positivos, tenemos los datos de Stock y Thomas al inactivar la cepa PR-8 de influenza por cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio. Knight y Stanley (19) determinan el efecto de los detergentes catiónicos cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio y cloruro de octil-fenoxietoxietil-dimetil-bencil-amonio sobre esta misma cepa de influenza, obteniendo inactivación rápida a concentraciones 0,5 N y 0,05 N.

El trabajo más interesante desde el punto de vista de las experiencias que efectuaríamos fue el de Klein, Kalter y Mudds (17), pues en él se hacía mención del virus vacunal, con resultados positivos en cuanto a su inactivación. En este trabajo se utilizaron cuatro compuestos catiónicos: cloruro de octil-fenoxietoxietil-dimetil-bencil-amonio (Phemerol), cloruro de cetil-piridina (Ceepryn), cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio (Zephiran) y emulsol de C_8 a C_{16}, nueve compuestos aniónicos y uno no-iónico. El no-iónico no tuvo valor alguno y los aniónicos resultaron negativos en la mayor parte de los casos y dudosos en otros. Por el contrario, los catiónicos se mostraron activos frente al virus vacunal, como arriba indicamos, y también frente a otros organismos utilizados en dichas investigaciones (fagos de *S. paradisenteriae,* de *S. albus* y virus A de influenza).

Los experimentos con el virus vacunal fueron hechos inoculando la mezcla de virus y antiséptico en contacto durante diez minutos a la temperatura del laboratorio, en embriones de pollo de doce a catorce días, y estudiando la presencia o ausencia de pústulas en la membrana para juzgar la actividad de las substancias en estudio.

Este último trabajo con resultados positivos sobre el virus vacunal y el de Hammon y Reeves, más arriba citado, con experiencias negativas sobre el virus encefalítico equino Oeste, son los únicos ante-

cedentes que hemos encontrado respecto a la acción de este tipo de substancias sobre los virus vacunal y encefalíticos equinos Oeste y Este.

Por otra parte, los contados trabajos sobre este tema adolecen, en general, de falta de precisión acerca de datos tan importantes como el título de las suspensiones de los virus empleados en la experimentación, y de otros factores capaces de influir en la actividad de éstos compuestos (temperaturas, concentraciones, tiempos de contacto, toxicidad, etc.); así como la ausencia de normalización en los diferentes métodos experimentales utilizados por los autores que se han oupado de este problema.

Todas las publicaciones coinciden en que la actividad germicida y viricida va ligada en su mayor parte a los compuestos catiónicos de amonio cuaternario, y dentro de éstos a los de molécula más compleja.

El propósito de este trabajo ha sido, de una parte, contribuir al conocimiento de la acción viricida de estos compuestos y, de otra, intentar la normalización de los métodos experimentales que se empleen para la investigación de su actividad en dicho aspecto.

La elección de los compuestos catiónicos de amonio cuaternario se debe a que, si bien eran ampliamente reconocidos y utilizados como bactericidas, con tantas ventajas (incoloros, inodoros, insípidos, estables, no irritantes para piel y mucosas, utilizables incluso en técnica bromatológica y relativamente baratos) habían sido poco estudiados como viricidas.

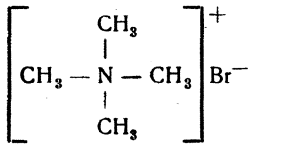
Las cinco substancias representantes de estos compuestos de amonio cuaternario son: bromuro de tetra-metil-amonio, cloruro de bencil-trimetil-amonio, cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio, cloruro de cetil-trimetil-amonio y bromuro de tetra-etil-amonio.

Los virus elegidos para las pruebas de actividad fueron: virus vacunal y virus encefalíticos equinos Oeste y Este de Norteamérica, por razón de su fácil manejo en el laboratorio y por ser productores de cuadros patológicos de evolución corta y claramente identificables en los animales de experimentación.

PARTE EXPERIMENTAL

Substancias ensayadas

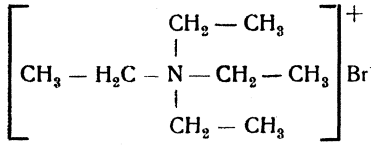
Bromuro de tetra-metil-amonio (T. M. A.).



$C_4H_{12}NBr$. Pm: 163,13.

Polvo blanco con fuerte olor salino, soluble en agua con reacción débilmente ácida (pH = 6,4) y sin producción de espuma; solución límpida en suero fisiológico. Poco soluble en alcohol e insoluble en cloroformo y éter.

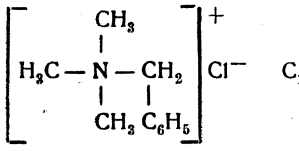
Bromuro de tetra-etil-amonio (T. E. A.)



$C_8H_{20}NBr$. Pm: 210,16.

Es una substancia que aparece en pequeñísimos cristales blancos que se aglomeran en terrones por la humedad, debido a una discreta delicuescencia; olor salino húmedo. Muy soluble en agua, soluble en solución salina y alcohol, algo soluble en cloroformo y acetona e insoluble en éter. Las soluciones acuosas no producen espuma por agitación y tienen reacción débilmente ácida (pH = 6,4).

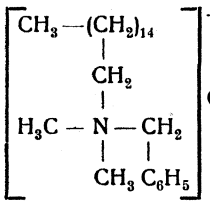
Cloruro de bencil-trimetil-amonio (B. T. A.)



$C_{10}H_{16}NCl$. Pm: 185,69.

Polvo microcristalino aglomerable por humedad, de color blanco, que tiende a amarillear con el tiempo; tiene olor salino. Soluble en agua, sin producir espuma persistente (pH = 6), algo menos soluble en alcohol y cloroformo y casi insoluble en éter. Soluciones límpidas en suero fisiológico.

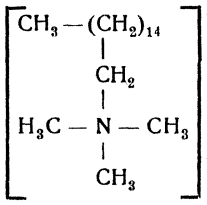
Cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio (C. D. B. A.).



$C_{25}H_{46}NCl$. Pm: 395,45.

Polvo amorfo, ligero olor aromático, sabor muy amargo. Es soluble en agua, aunque bastante menos que el resto de las substancias ensayadas, siendo necesario calentar a 40° C. para una buena disolución, produce abundante espuma persistente; de reacción neutra (pH = 7). Es soluble en alcohol y cloroformo.

Cloruro de cetil-trimetil-amonio (C. T. A.)



$C_{19}H_{42}NCl$. Pm: 320.

Se presenta como un polvo amorfo de color blanco, con olor ligerísimamente cáustico amoniacal. Es muy soluble en agua con producción de abundante espuma persistente por agitación y su reacción es casi neutra (pH = 6,7).

Preparación de las soluciones antisépticas

De cada uno de los compuestos que se estudian, se prepararon diluciones patrón en solución fisiológica estéril al 1/100 y 1/250, empleando para ello matraces aforados y contrastados. Su grado de solubilidad a la temperatura ambiente (20-22°) nos permitió obtener soluciones límpidas que se filtraron por bujía y se mantuvieron en frascos de vidrio neutro, que se almacenaron a 4° C. con tapones de goma, para evitar evaporaciones que variaran la concentración. En cuanto a su conservación, podemos decir que estas diluciones patrón se mantuvieron inalterables durante todo el tiempo de su almacenamiento en nevera; si bien hemos de resaltar que el C. D. B. A. precipita a temperaturas inferiores a 8° C. por variaciones de su grado de solubilidad, y ello nos obligó a prescindir de esta sustancia para los ensayos de inactivación a la temperatura de 4° C.

Teniendo en cuenta las observaciones iniciadas por Domagk (4) y continuadas por diversos autores sobre las interferencias de acción entre los compuestos catiónicos de amonio cuaternario y los aniónicos, todo el material utilizado en nuestros experimentos, aun después de haber sido esterilizado, ha sido enjuagado con solución salina estéril inmediatamente antes de ser empleado, para hacer desaparecer todo vestigio de jabón (agente aniónico) que podría neutralizar los cuerpos catiónicos.

Actividad bactericida

Hemos considerado de interés estudiar el grado de actividad bactericida de las substancias-problema para conocer las interferencias o antagonismos que la presencia del material orgánico puede introducir, restándoles actividad para la interacción virus-antiséptico, que intentamos estudiar.

Para ello, comenzamos el estudio del poder antiséptico frente a los organismos normalmente contaminantes de las pulpas vacunales, tal como se encuentran en su hábitat y aislados.

Esta contaminación bacteriana se examinó sembrando una muestra de la pulpa de ternera utilizada, en caldo glucosado, y de aquí se resembró una gota en sábana sobre medios sólidos adecuados (agar común,

agar sangre y agar malta), obteniéndose los resultados resumidos en el cuadro 1.

Cuadro 1

Medios	Especies aisladas	Frecuencia
Agar sangre 37° C	Cocos Gram-positivos de diversos tamaños	+ + + + +
	Cocos Gram-negativos	+ + +
Agar común 37° C	Cocos Gram-positivos	+ + + + +
	Cocos Gram-negativos	+ +
	Cocos en tétradas	+
Agar malta 25° C	Cocos Gram-positivos	+ +
	Organismos levaduriformes	+
Caldo glucosado 37° C	El crecimiento microbiano en este medio presenta las mismas características en cuanto a clases de especies y frecuencia de las mismas.	

Una vez aisladas las diferentes especies, se identificaron: *Micrococcus pyogenes* de las variedades *albus* y *aureus, Streptococcus faecalis. E. zymogenes,* dos colonias de *Actinomyces,* algunas colonias de *Sarcina lutea* y varias de una especie levaduriforme.

Para la determinación de su sensibilidad frente a los compuestos de amonio cuaternario, se seleccionaron por su mayor abundancia en la pulpa, las siguientes cepas:

Micrococcus pyogenes var. *albus* (especie Gram-positiva).
Micrococcus pyogenes var. *albus* (especie Gram-negativa).
Micrococcus pyogenes var. *aureus* (fuertemente Gram-positiva).
Micrococcus pyogenes var. *aureus* (Gram-positiva).
Streptococcus faecalis.

Estudio frente a los gérmenes aislados

Una vez determinadas las cepas, se siguió la marcha que detallamos:

a) Dilución del antiséptico. Sobre 5 cm^3 de caldo glucosado se hace

una dilución seriada del antiséptico según la escala de 0,05 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,5 2 4 6 8 10 20 40 50 60 70 80 90 100 $\times$ 10^{-4}.

b) Inoculación del cultivo bacteriano. En cada tubo se sembró, con una pipeta Pasteur, tres gotas de un cultivo de dieciocho horas a 37° C. sobre caldo glucosado, a fin de partir de gérmenes en su fase exponencial y con una concentración aproximada de 10^9 células/cm^3. Los gérmenes procedían de cada una de las cinco cepas anteriormente mencionadas.

c) Lectura de los resultados. Se realizó a las veinticuatro horas de mantener los cultivos en estufa a 37° C. La acción bacteriostática se refleja en la concentración del último tubo de la serie que permanece límpido, y esta observación se mantuvo durante catorce días.

La acción bactericida se estudió en un segundo tiempo, para lo cual, en el último tubo límpido y en los tres precedentes a concentraciones superiores, se resembró sobre tubos inclinados de agar glucosado, para ver si a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas había desarrollo bacteriano a 37° C.; en el último de estos tubos en que no se observaron gérmenes se consideró que la concentración era la necesaria para matar al germen de prueba.

Estudio frente a los gérmenes en presencia de la pulpa vacunal

Se ha seguido la marcha que se indica:

a) La pulpa vacunal estabilizada por liofilización ha sido rehidratada con diluciones de antiséptico a los títulos 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 20 $\times$ 10^{-3} en agua destilada; se adiciona 1 cm^3 de cada una de dichas diluciones a otras tantas ampollas del liofilizado de pulpa vacunal que contiene la materia seca correspondiente a 1 cm^3 de dicha pulpa fresca.

b) Se mantuvo un contacto de cinco minutos, veinte minutos, una hora, veinticuatro horas, a temperatura ambiente de laboratorio. De estas suspensiones se sembraron —para cada ensayo— 0,5 cm^3 en caldo glucosado en tubos de 5 cm^3, con lo cual las concentraciones del antiséptico son diluidas al 1/10; y se tienen catorce días en incubación a 37° C.

c) Se efectuaron resiembras sobre tubo de agar común inclinado, observando a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de incubación a 37° C.

En esta última experiencia se pudo comprobar que en las diluciones que presentan actividad, se muestra en tiempos mínimos de contacto de cinco minutos, y que esta acción es bactericida y no bacteriostática.

El planteamiento y resultado de estos experimentos queda resumido en el cuadro 2.

Cuadro 2. Protocolo de experiencias y resultados acerca del poder antiséptico antibacteriano en linfa vacunal (*)

Ensayos directos sobre linfa vacunal	Escala de diluciones $\times 10^{-4}$	Ensayos sobre cepas bacterianas aisladas	
En esta gama de diluciones, se obtiene inhibición de crecimiento bacteriano para los 4 tiempos de contacto ensayado, con C.D.B.A. y C.T.A. a la dilución líquida de 1/1.000. Las substancias T.M.A., B.T.A. y T.E.A. se mostraron inactivas a todas las diluciones ensayadas.	0,05 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 2 4 6 8 10 20 40 50 60 70 80 90 100	T.M.A. produce inhibición total de las bacterias a dosis más altas de 1/6.000; bacteriostasias, de diez a doce días, al 1/8.000; de seis a ocho días, al 1/15.000, y de dos a tres días, al 1/40.000. Diluciones mayores, son ineficaces. C.D.B.A. es activa a la dosis de 1/60.000, C. T. A. a la de 1/30.000; diluciones que oscilan entre 1/200.000 y 1/600.000 dan origen a bacteriostasias que oscilan de seis a dos días.	Las substancias B.T.A. y T.E.A. no producen inhibición del crecimiento bacteriano en las condiciones experimentadas, para ninguna de las dosis de la zona que se indica.

(*) Las cepas empleadas son cuatro de *Micrococcus pyogenes* y una de *Enterococcus*.

Determinación de toxicidad

Una de nuestras primeras preocupaciones al poner en marcha el presente trabajo fue la determinación de los índices de toxicidad de las diferentes substancias en estudio.

No hemos hallado referencia alguna a la inoculación por vía intracerebral de ninguna substancia del tipo que nos ocupa, ni tampoco encontramos datos sobre la toxicidad por vía intradérmica de ninguna de las cinco substancias objeto del presente trabajo. Solamente en un trabajo de Schneider (27) se menciona la toxicidad por vía intradérmica del derivado Zephiran (cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio), que produce necrosis a diluciones de 10^{-4}.

Los volúmenes inoculados en nuestras pruebas de toxicidad fueron siempre iguales a los que utilizamos más tarde para las pruebas de actividad viricida: 0,2 cm^3, intradérmica, en conejo y 0,03 cm^3, intracerebral, en ratón.

Los resultados se consideraron haciendo las mismas observaciones que si se tratase de inoculación con material patógeno. Así, se estudió la aparición de eritema, nódulo o necrosis, haciendo la lectura a los cinco días de la inoculación intradérmica, en conejo, o la muerte durante un período de quince días a partir de la inoculación intracerebral en ratón.

Bromuro de tetra-metil-amonio

Vía intradérmica. Se preparó una serie de diluciones de este compuesto en solución salina estéril (1/100, 1/200,, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700 y 1/800) y se inoculó de cada dilución 0,2 cm^3 intradérmicamente en el dorso de un conejo, realizando la lectura de los resultados a los cinco días.

Esta substancia resulta atóxica en la inoculación, a las diluciones indicadas más arriba, considerando la ausencia de lesiones locales, y lo es también si se suman las inoculaciones, que arrojan un total de 0,54 cm^3 de solución 1/100 del compuesto, sin que el animal presente sintomatología general alguna.

Vía intracerebral. Se preparó una serie de diluciones (1/100, 1/200, 1/400 y 1/500) y se hizo inoculación de cada una de ellas a grupos de ratones. Todos los ratones inoculados con estas diluciones resultaron muertos en el acto de la operación. Por ello, se preparó una segunda serie (1/800, 1/1.000, 1/1.600 y 1/2.000). Con arreglo a los resultados que se reflejan en el cuadro 3, consideramos la dilución 1/1.000 como atóxica.

Cuadro 3. T. M. A. Inoculación intracerebral en ratón

Dilución	Días a partir de la inoculación		Porcentaje total de muertes
	1	2	
	Porcentaje de muertes		
1/100	100		100
1/200	100		100
1/400	100		100
1/500	100		100
1/800		60	60
1/1.000			0
1/1.600			0
1/2.000			0

Cloruro de bencil-trimetil-amonio

Vía intradérmica. Se preparó una serie de diluciones para este compuesto en solución salina estéril 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700 y 1/800.

Al terminar de inocular la serie completa (8 inyecciones) el conejo presenta abundante tialismo y muere entre grandes convulsiones; repetimos esto varias veces, comenzando unas por la dilución más alta y otras por la más baja, observando que al llevar puestas más de 4 inyecciones el animal presentaba la misma sintomatología. Por ello decidimos efectuar solamente 4 inoculaciones, las 2 más concentradas y las 2 más diluidas; dejando para doce horas más tarde la inoculación de las diluciones centrales. Así, logramos la supervivencia del animal inoculado con la serie completa, lo que nos resultaría una ventaja al no tener que utilizar dos conejos cuando hiciéramos pruebas de actividad de la substancia frente al virus, evitando de este modo las diferencias que se introducirían por desigual receptividad de ambos animales.

Inoculando según esta pauta podemos considerar que 0,2 cm^3 de solución al 1/100 resultan atóxicos localmente y generalmente considera-

dos, pero si se aumenta el volumen inoculado hasta llegar a 0,35 cm^3 se produce la sintomatología general referida y la muerte.

Vía intracerebral. Se preparó en solución salina estéril la serie de diluciones siguientes: 1/100, 1/200, 1/400 y 1/500, inoculándose 0,03 cm^3 de cada una a grupos de ratones, según el cuadro 4; como los resultados nos indicaban toxicidad a estas diluciones, preparamos una segunda serie: 1/800, 1/1.000, 1/1.600 y 1/2.000, resultando atóxica la del 1/1.000.

Los ratones que han sufrido la inoculación de las diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/500 y 1/800, en la mayoría de los casos presentan un cuadro estuporoso que conduce a la muerte, que acontece de dos a cuatro días después de la inoculación.

Cuadro 4. B. T. A. Inoculación intracerebral en ratón

Dilución	Días a partir de la inoculación						Porcentaje total de muertes
	1	2	3	4	5	6	
	Porcentaje de muertes						
1/100		40	20	40			100
1/200		40	40	20			100
1/400			40	60			100
1/500				80		20	100
1/800				40	20	20	80
1/1.000							0
1/1.600							0
1/2.000							0

Cloruro de cetil-dimetil-bencil-amonio

Vía intradérmica. Al igual que hicimos con las otras substancias, preparamos la serie de diluciones 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700 y 1/800 en solución salina estéril para inocular 0,2 cm^3 de cada una en el dorso de un conejo.

Los resultados se reflejan en las figuras 1 y 2.

Estas diluciones dieron lugar a irritaciones y lesiones dérmicas que

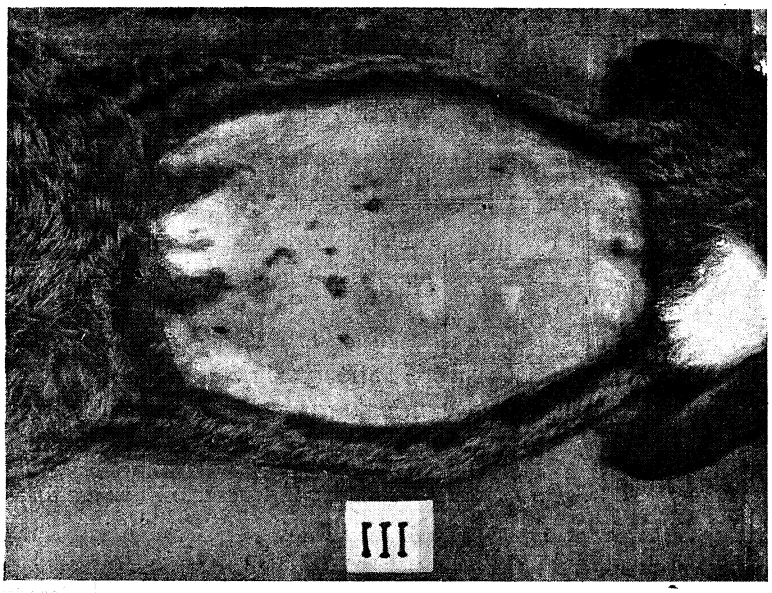


Figura 1. Dorso de conejo inoculado con diversas diluciones de C.D.B.A. para determinar su dosis tóxica

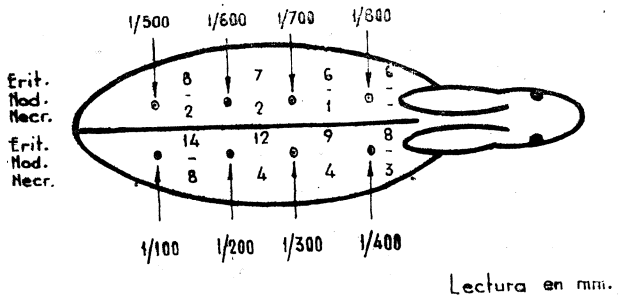


Figura 2. C.D.B.A.

aparecen como zonas necróticas blancas debidas a la isquemia brusca producida por el antiséptico y por cauterización de los tejidos. Por ello se inició una segunda serie de diluciones, 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/5.000, 1/6.000, 1/10.000 y 1/20.000, que se inoculó en las mismas condiciones que la serie anterior, sin que se pudiera observar la menor reacción local ni general.

Vía intracerebral. Preparamos diluciones en solución salina estéril al 1/100, 1/200, 1/400 y 1/500 para inocular 0,03 cm^3. Todos los ratones inoculados a estas diluciones murieron de dos a cuatro días después, presentando horas antes de su muerte una gran excitación, pelo erizado y más tarde un cuadro de parálisis flácida, siendo característica la presencia rápida de la putrefacción. Por esta causa preparamos una segunda serie de diluciones (1/800, 1/1.000, 1/1.600 y 1/2.000). Los resultados nos indicaron que la dilución 1/2.000 es atóxica (cuadro 5).

Cuadro 5. C. D. B. A. Inoculación intracerebral en ratón

Dilución	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
	1	2	3	4	5	
	Porcentaje de muertes					
1/100		60	20	20		100
1/200		40	40	20		100
1/400		40		20	40	100
1/500			80	20		100
1/800			60	20	20	100
1/1.000				60	40	100
1/1.600				40	20	60
1/.2000						0

Cloruro de cetil-trimetil-amonio

Vía intradérmica. Se preparó la serie de diluciones: 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700 y 1/800 en solución salina estéril, inoculándose cada término de la serie en el dorso de un conejo. Los resultados se pueden ver reflejados en la figura 3.

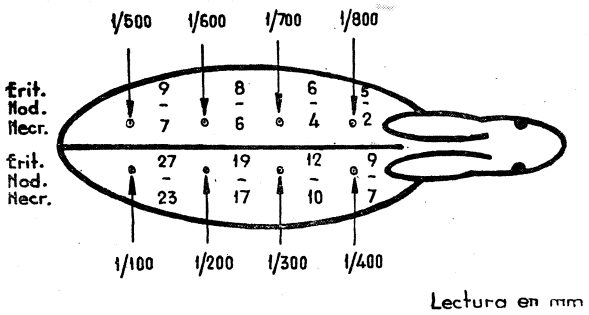


Figura 3 C.T.A.

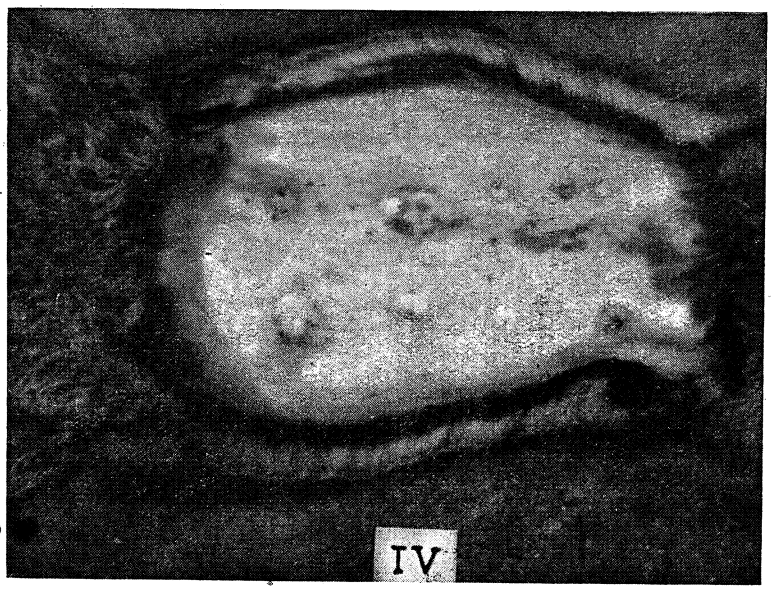


Figura 4. Dorso de conejo inoculado con diversas diluciones de C.T.A para determinar su dosis tóxica

Hacia el segundo día aparecieron escaras blancas en el lugar de las inoculaciones, que se desprendían de diez a doce días más tarde (figura 4).

A causa de los resultados obtenidos con las diluciones anteriores, se comenzó una segunda serie, 1/1.000, 1/2.000, 1/3.000, 1/5.000, 1/7.000, 1/10.000 y 1/20.000, que se inoculó a las mismas dosis, resultando que a partir de la dilución 1/1.000 esta substancia es atóxica localmente a dosis de 0,2 cm.^{3} en inyección intradérmica, y lo es también bajo el punto de vista de sintomatología general si sumamos todas las inoculaciones, que hacen un total de 0,54 cm.^{3} de dilución a 1/1.000.

Vía intracerebral. Se preparó una serie de diluciones en solución salina estéril, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/500, inoculándose intracerebralmente a ratón.

Por su toxicidad hicimos una segunda serie de diluciones 1/800, 1/1.00, 1/1.600 y 1/2.000 que se inocularon en las mismas condiciones. Los resultados se relacionan en el cuadro 6 y puede deducirse que la dilución 1/800 aún resulta tóxica, siendo la 1/1.000 la más concentrada que no produce sintomatología ni muerte.

La dilución 1/100 produce la muerte rápidamente, con grandes convulsiones, mientras que tasas más diluidas provocan la aparición de la muerte más tardíamente, con erizamiento de pelo y variada sintomatología general, tan sólo unas diez horas antes de la muerte.

Cuadro 6. C. T. A. Inoculación intracerebral en ratón

Dilución	Días a partir de la inoculación					Porcentaje total de muertes
	1	2	3	4	5	
	Porcentaje de muertes					
1/100	100					100
1/200	100					100
1/400	60	40				100
1/500		40	20	20	20	100
1/800				20	20	40
1/1.000						0
1/1.600						0
1/.2000						0

Bromuro de tetra-etil-amonio

Vía intradérmica. Como hemos venido haciendo con todos los compuestos anteriores, se preparó una serie de diluciones 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700 y 1/800, de las cuales se hizo inoculación intradérmica en el dorso de un conejo, observándose que esta serie de diluciones no ha dado lugar a la presentación de sintomatología local ni general.

Vía intracerebral. Se prepararon las diluciones 1/100, 1/200, 1/400 y 1/500, que se inocularon en grupos de ratones. Los resultados se reflejan en el cuadro 7; como puede verse en él, las dilucionse 1/100 y 1/200 resultan altamente tóxicas, produciendo la muerte en el momento de la inoculación; la dilución 1/400 da lugar a la muerte, pero no en el total de los animales inoculados, lo que indica, seguramente, el límite de la toxicidad, mientras que la dilución 1/500 es atóxica.

Cuadro 7. T. E. A. Inoculación intracerebral en ratón

Dilución	Primer día a partir de la inoculación — Porcentaje de muertes	Porcentaje total de muertes
1/100	100	100
1/200	100	100
1/400	40	40
1/500	0	0

El resumen de estos resultados se expresa a continuación, pudiéndose observar que la toxicidad en peso de substancia oscila de 15 a 60 µg. para el ratón por vía intracerebral, mientras que alcanza desde 200 a 2.000 µg, por vía intradérmica, en el conejo.

Las diluciones que se dan en el cuadro 8 son las que más tarde hemos utilizado en el curso de nuestros experimentos de contacto.

Grado de toxicidad de las substancias detergentes de amonio cuaternario empleadas

Substancias	Cantidad inoculada	Vía de inoculación	Animal de ensayo	Diluciones límite, no tóxicas	Dosis tóxicas en µg
T. M. A.	0,2 cm³	Intradérmica	Conejo	1/100	2.000
	0,03 cm³	Intracerebral	Ratón	1/1.000	30
B. T. A.	0,2 cm³	Intradérmica	Conejo	1/100	2.000
	0,03 cm³	Intracerebral	Ratón	1/1.000	30
C.D.B.A.	0,2 cm³	Intradérmica	Conejo	1/1.000	200
	0,03 cm³	Intracerebral	Ratón	1/2.000	15
C. T. A.	0,2 cm³	Intradérmica	Conejo	1/1.000	200
	0,03 cm³	Intracerebral	Ratón	1/1.000	30
T. E. A.	0,2 cm³	Intradérmica	Conejo	1/100	2.000
	0,03 cm³	Intracerebral	Ratón	1/500	60

Virus empleados

Utilizamos precisamente el virus vacunal por ser uno de los más estables y resistentes a las más desfavorables condiciones; resistencia que se hace más manifiesta cuando va incluido en la linfa de ternera, que ha sido el material empleado.

En cuanto a los virus encefalíticos, se eligieron por poseer características físicas y biológicas muy diferentes a las del virus vacunal, disponiendo así de virus dermotropos y neurotropos y de muy diferente tamaño.

Características de las cepas víricas

Virus vacunal. Se han utilizado pulpas vacunales activas de ternera, de contenido bacteriano normal.

Virus encefalíticos. Se partió de los siguientes virus: equino Este, aislado en la epidemia de Nueva Jersey, en el año 1933, de un caso fatal humano, y equino Oeste, aislado por el Dr. B. Howitt de un ce-

rebro de caballo, en California. Estas dos estirpes proceden de la Universidad de California, Laboratorios de la Fundación Hooper, y nos fueron facilitados por el Dr. E. Gallardo.

Preparación de los virus

Virus vacunal

Se pesaron 5 g. de pulpa activa de ternera y de contenido bacteriano normal, sobre vidrio de reloj estéril. A continuación se trituró este material en mortero de porcelana estéril, con un poco de arena de silice calcinada, lavada y esterilizada; cuando se tuvo la evidencia de haber logrado una trituración perfecta se añadieron lentamente 45 cm.^{3} de caldo común para lograr una dilución final de 1/10. Se continuó mezclando durante un rato para lograr una homogeneización perfecta y se recogió todo el líquido con pipeta, para centrifugar a 5.000 revoluciones durante quince minutos, para separar las partículas groseras y arena en suspensión; terminada esta centrifugación, se recogió el sobrenadante y se almacenó en frigorífico a -20° C. hasta su posterior liofilización.

Virus encefalítico equino Oeste

Se tomó una ampolla de este virus liofilizado al 1/10 y se restituyó su volumen con 1 cm^3 de agua destilada; a partir de esta dilución se hicieron, en solución salina estéril, diluciones decimales hasta 10^{-3}, sin llegar más lejos, pues sabíamos de antemano (García Gancedo, 8) que el título infectivo de este virus es relativamente bajo.

Previa prueba de esterilidad (consideramos oportuno aclarar aquí que en todas las inoculaciones intracerebrales que se hicieron con los virus encefalíticos se realizó una previa contrastación de esterilidad bacteriana de los inóculos, para evitar el error que podría introducirse al aparecer muertes debidas a factores infecciosos ajenos a los virus), se inocularon intracerebralmente 0,03 cm^3 de la dilución 10^{-3} a cada ratón de un grupo de 10. A partir del momento de la inoculación es imprescindible una observación constante de los animales para sacrificarlos en un estado avanzado del cuadro sintomático, lo que se conoce por una

parálisis general precedida de una parálisis del tercio posterior; ambas casi siempre de tipo espástico, son anunciadas por un estado de embotamiento general y erizamiento del pelo.

En nuestros experimentos con este virus hemos observado que el estado de parálisis general aparece de cuatro a cinco días después de la inoculación.

Es imprescindible recoger el cerebro del ratón en vida o muy pocos momentos después de su muerte, pues decrece rápidamente el grado de virulencia, con peligro, además, de una contaminación bacteriana *post-mortem.*

La extracción del cerebro ha de hacerse con un cuidado extremo para evitar contaminaciones, resultando muy dificultosa esta operación, dada la pequeñez del cerebro y en general de todo el campo operatorio La técnica que nosotros hemos utilizado es la que describimos seguidamente.

Una vez anestesiado el ratón con éter se le mata por un tijeretazo en la cavidad torácica. Se coloca el ratón en decúbito prono sobre una plancha de corcho recubierta con papel de filtro y se clava por medio de dos alfileres, uno en la punta del hocico y otro en la extremidad proximal de la cola.

Se baña con alcohol y se hace una disección de la piel a partir de las últimas vértebras lumbares, dando dos cortes sobre las extremidades anteriores del animal para lograr una mayor amplitud del campo, hasta la cabeza, que debe quedar completamente exenta de piel.

Se pincela con tintura de yodo de delante atrás, toda la zona desprovista de piel y se baña nuevamente con alcohol.

Se hace un corte sobre el borde posterior del occipital procurando no herir la masa encefálica, que se transparenta a través del hueso, y este corte sirve de base a un triángulo formado por otras dos incisiones que coinciden ante el frontal. Es imprescindible hacer los cortes por encima de los conductos auditivos para evitar una contaminación segura de la masa encefálica.

Una vez desplazado el fragmento óseo con ayuda de las tijeras, se extrae el cerebro por medio de una cucharilla de Wolkman y se traslada a un frasco de boca ancha y tapón esmerilado con perlas de vidrio, donde por agitación se tritura. Al obtener la trituración máxima se añade caldo común hasta lograr una dilución de 1/10 (en nuestras ope-

raciones hemos añadido siempre 4,5 cm^3 de caldo, pues el peso del cerebro de ratón de 18 a 22 g. es aproximadamente de 0,5 g., y así nos hemos evitado las manipulaciones de pesada con el consiguiente aumento del riesgo de contaminación). De este material triturado se hace una toma con pipeta Pasteur para siembra en caldo común y resiembra en tubo de agar, para comprobación de esterilidad bacteriana.

El frasco con el material triturado y diluido se almacena en frigorífico a -20° C. hasta conocer el resultado de las siembras, y en caso de estar contaminado se desecha.

Una vez comprobada la esterilidad bacteriana de cada uno de los triturados, se reúnen en un solo frasco del que se vigila asimismo la esterilidad del conjunto, y se almacenan nuevamente en frigorífico a -20° C. hasta su liofilización.

Virus encefalítico equino Este

Todo lo dicho en el apartado anterior es aplicable a la obtención del virus Este, pero en este caso las diluciones que se inoculan de la suspensión deben ser más altas, por lo meno hasta 10^{-4}, pues este virus es más activo, apareciendo los primeros síntomas a los dos o tres días y la parálisis general inmediatamente después.

Liofilización del material infectivo

Un dia antes de la liofilización se sacaron los frascos que contienen los triturados de material infectivo del frigorífico a -20° C. y se llevaron a 4° C., con lo cual se evita una descongelación brusca.

Una vez descongelado el material, se hizo un reparto en ampollas de liofilización, poniendo siempre 1 cm^3 en cada una y a la dilución 10^{-1}, que es la original procedente de los triturados.

Para lograr una desecación, prácticamente total, hemos prolongado la operación durante nueve horas, al cabo de las cuales se introdujo nitrógeno en el sistema liofilizador; las ampollas se cierran a la llama y almacenan en frigorífico a -20° C.

Hemos tenido la precaución de liofilizar en una sola vez material suficiente de cada virus para hacer todas las experiencias con un mis-

mo lote y evitar así diferencias debidas a variaciones de preparación, titulación, etc., que habrían de dar lugar a correcciones que hubiesen complicado la marcha del trabajo.

Titulación de los virus

Virus vacunal

A una ampolla del liofilizado se añadió 1 cm^3 de agua destilada estéril para restituir su volumen original (1 cm^3) y la dilución a que se liofilizó (10^{-1}); a partir de ésta se hizo una dilución seriada decimal (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} y 10^{-8}).

Con una jeringuilla de insulina y aguja de bisel corto hicimos la inoculación intradérmica de todos los términos de esta serie, 0,2 cm^3, por el método de Groth (9), en dorso de conejo afeitado con maquinilla eléctrica.

Los resultados quedan expresados en la figura 5 y en ella puede verse, medidas las lesiones a los cinco días, que el virus en estudio es suficientemente activo hasta la dilución 10^{-6}.

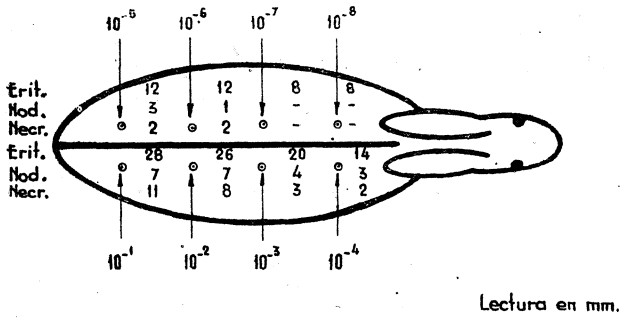


Figura 5. Titulación del virus vacunal.

Para nuestros posteriores experimentos de inactivación elegimos la dilución 10^{-1} la que, por producir las máximas lesiones, nos permitiría estudiar mejor la acción de las substancias utilizadas, en caso de ser activas contra el virus.

El utilizar la técnica de Groth para la inoculación intradérmica reúne, para los fines de nuestro trabajo, las siguientes ventajas: 1.ª, po-

derse medir con toda exactitud la cantidad de virus que deseamos inocular; 2.ª, darnos la seguridad de que el virus inoculado se pone en contacto con los elementos dérmicos más receptivos; 3.ª, ser pequeñísima la cantidad de virus que se pierde si la inoculación se ha practicado bien, y 4.ª, poder practicar en un sólo conejo un gran número de punturas. Esta última ventaja, a más de suponer una gran economía en animales, disminuye los errores inevitables de la distinta receptividad individual. De haber utilizado la técnica de escarificación cutánea de Calmette y Guerin (2) hubiésemos tenido muchas dificultades, dado el número de animales que habría sido preciso utilizar, ya que en cada conejo no se puede hacer más de una inoculación por flanco, frente a las cuatro por flanco que hicimos con la técnica de Groth.

La medida de las lesiones producidas por el virus vacunal se ha hecho siempre a los cinco días de la inoculación, tanto en la titulación como en las experiencias del trabajo, utilizando para esta medida un calibrador milimétrico.

Virus encefalítico equino Oeste

Una vez liofilizado el material patógeno, hemos realizado su titulación inoculando por vía cerebral en ratón.

Hemos efectuado a lo largo de todo este trabajo nuestras inoculaciones con una jeringa (modelo norteamericano) de 0,25 cm^3, dividida en centésimas por uno de los lados y en 3 centésimas por el opuesto, con aguja muy corta y finísima.

Para la preparación del inóculo ha sido suficiente añadir 1 cm^3 de agua destilada estéril para restituir el volumen y dilución a que fue liofilizada la ampolla; a partir de esta dilución emprendimos una serie decimal de diluciones hasta llegar a 10^{-6}.

Nos hemos inclinado a elegir la DL_{50} cuyos resultados dan siempre un valor estadístico significativo, y hemos adoptado el método de determinación de Reed y Muench (24) por medio de los totales acumulativos.

Hemos efectuado inoculaciones en grupos de 5 ratones partiendo de la dilución 10^{-1} hasta 10^{-6}, con los resultados que se reflejan en el cuadro 9.

Cuadro 9

Diluciones	Número de ratones	Muertos	Supervivientes	Totales acumulativos		Porcentaje de muertes
				Muertos	Supervivientes	
10^{-1}	5	5	0	16	0	100
10^{-2}	5	5	0	11	0	100
10^{-3}	5	4	1	6	1	80
10^{-4}	5	2	3	2	4	40
10^{-5}	5	0	5	0	9	0
10^{-6}	5	0	5	0	14	0

De este cuadro se desprende que la dilución DL_{50} está encuadrada entre 10^{-3}, con muerte del 80 por 100 de ratones, y la 10^{-4}, con muerte del 40 por 100; aplicando el método de los autores, hallamos que DL_{50} es $10^{-3,68}$, lo que nos expresa que a la dilución $1/4.882 \simeq 1/1.500$, 0,03 cm^3 del inóculo contienen una dosis DL_{50}.

Virus encefalítico equino Este

Hemos seguido la pauta utilizada en la titulación del virus Oeste, pero ampliando la serie de diluciones hasta 10^{-7}, dada la mayor actividad del virus.

Los resultados se recogen en el cuadro 10.

Cuadro 10

Diluciones	Número de ratones	Muertos	Supervivientes	Totales acumulativos		Porcentaje de muertes
				Muertos	Supervivientes	
10^{-1}	5	5	0	21	0	100
10^{-2}	5	5	0	16	0	100
10^{-3}	5	5	0	11	0	100
10^{-4}	5	4	1	6	1	80
10^{-5}	5	2	3	2	4	40
10^{-6}	5	0	5	0	9	0
10^{-7}	5	0	5	0	14	0

De aquí se deduce que DL_{50} es $10^{-4,68}$.

Esto nos indica que a la dilución 1/48.826 $\simeq$ 1/50.000, 0,03 cm^3 del inóculo contienen una dosis DL_{50}.

Inactivación espontánea de los virus en estudio

Por lo general, los virus no sobreviven en la naturaleza mucho tiempo después de que el huésped ha muerto o han sido separados de células susceptibles. Esta inactivación depende de factores que condicionan el virus mismo, lo que conduce a una mayor o menor resistencia de éste, pero está ligada también a factores externos, de los que se puede considerar como muy importante la temperatura.

Teniendo en cuenta este concepto, introdujimos en nuestros experimentos de inactivación el factor temperatura, actuando sobre el complejo virus-compuesto de amonio, para observar si esta variante térmica era capaz de activar las posibilidades viricidas de estos compuestos.

En nuestro trabajo fue una medida de elemental precaución, para obtener interpretaciones correctas, determinar el límite en que los factores tiempo y temperatura dan lugar a inactivación espontánea.

a) Virus vacunal. Este virus es uno de los más resistentes a la acción de la temperatura, pero más bien en exposición momentánea al calor y no continuada, como demuestra Sander (26) en sus estudios sobre el virus vacunal cultivado en testículo de conejo y sometido a desecación; este autor ha llegado a la conclusión de que la virulencia se mantiene íntegramente después de una permanencia de veinte minutos en estufa a 90° C., y parcialmente después del mismo tiempo a 100° C.; por otra parte, la misma vacuna, húmeda, pierde su actividad alrededor de los 55° C. en una hora.

Es curioso consignar aquí la afirmación de Kaiser (14) que asegura haber aislado una cepa de virus vacunal de un niño enfermo de eccema, la cual después de cinco minutos de ebullición se mostró capaz de producir un epitelioma vacunal típico, después de la inoculación en córnea de conejo. El virus pudo ponerse en evidencia por las coloraciones de Paschen y Giemsa.

Como nuestros trabajos iban orientados a poner en prueba la resistencia del virus a temperaturas de 20° C. y 37° C. durante períodos comprendidos entre veinte minutos y cuarenta y ocho horas, o sea, una

acción continuada, nos fueron más útiles los experimentos de Gallardo (7), quien para comprobar la actividad de la linfa glicerinada del pase noveno de membrana vitelina, halló que después de veinticuatro y cuarenta y ocho horas en estufa a 37° C. hay una atenuación evidente del virus y una casi inactivación a las setenta y dos horas. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos con una linfa dérmica de ternera de gran actividad.

Teniendo presentes estos datos, nuestros experimentos de contacto los realizamos a la temperatura de 20° C., para la cual ofrece el virus una gran estabilidad.

b) Virus encefalítico. En cuanto a los virus encefalíticos, la falta de datos precisos respecto a su resistencia a las temperaturas nos obligó a realizar las pruebas experimentales para conocer dicha resistencia.

En estas pruebas utilizamos la inoculación de 0,03 cm^3 de la suspensión de virus 1/50 y 1/500 para los virus Oeste y Este, respectivamente, equivalente a 100 DL_{50}, previamente sometida a las temperaturas y tiempos conforme al cuadro 11.

Cuadro 11. Virus Este y Oeste

Temperaturas	Tiempos			
4° C.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.
20° C.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.
37° C.	20 min.	1 h.	24 h.	48 h.

Virus encefalítico Oeste. Se preparó una dilución 1/50 del virus a partir de ampolla de liofilizado, restituyendo su volumen con agua destilada estéril. Se hicieron 3 fracciones que se conservaron por separado a la temperaturas y tiempos que figuran en el cudaro precedente y de cada una se inocularon intracerebralmente a grupos de ratones. Con arreglo a este proceder pudimos observar que el virus conserva su actividad patógena a la temperatura de 4° C., por lo menos durante cuarenta y ocho horas; a 20° C. es activo durante el mismo tiempo, y a 37° C. es activo hasta una hora, presentando atenuación a las veinticuatro horas e inactivación casi total a las cuarenta y ocho horas (cuadro 12).

Cuadro 12. Virus Oeste. Inoculación intracerebral de 100 DL_{50} en ratón

Temperaturas	Tiempos	Días a partir de la inoculación — Porcentaje de muertes								Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	7	8	
4° C.	20 min.				20	60	20			100
4° C.	1 h.			10	80		10			100
4° C.	24 h.				20	80				100
4° C.	48 h.				40		60			100
20° C.	20 min.				40	40	20			100
20° C.	1 h.				10	80	10			100
20° C.	24 h.				20	80				100
20° C.	48 h.				40		60			100
37° C.	20 min.				10	10	60	20		100
37° C.	1 h.				20	20	60			100
37° C.	24 h.				40	10	10			60
37° C.	48 h.				10				10	20

De acuerdo con estos resultados, las pruebas posteriores de contacto virus-antiséptico se realizaron a los tiempos y temperaturas antes indicados, en los que el virus se mantuvo letal para la totalidad de los ratones inoculados.

Virus encefalítico Este. Se restituyó el volumen de liofilizado con 1 cm^3 de agua destilada estéril y por diluciones sucesivas en solución salina estéril se llegó a la 1/500.

El fraccionamiento del resultante y su conservación a las distintas temperaturas así como la inoculación a los distintos tiempos, siguió la misma pauta que para el virus encefalítico Oeste.

Los datos obtenidos quedan reflejados en el cuadro 13 y del estudio de ellos, se puede considerar que el virus encefalítico Este conserva su actividad patógena a la temperatura de 4° C., por lo menos durante cuarenta y ocho horas; a 20° C. es activo durante el mismo tiempo; a 37° C. es activo, por lo menos hasta una hora, siendo inactivado por completo a las veinticuatro horas.

Teniendo en cuenta estos resultados, los experimentos de contacto de este virus y los compuestos estudiados se efectuaron a los tiempos y temperaturas en que el virus se presenta con plena actividad.

Cuadro 13. Virus Este. Inoculación intracerebral de 100 DL_{50} en ratón

Temperaturas	Tiempos	Días a partir de la inoculación						Porcentaje total de muertes
		1	2	3	4	5	6	
		Porcentaje de muertes						
4° C.	20 min.				60	20	20	100
4° C.	1 h.				20	80		100
4° C.	24 h.				20	60	20	100
4° C.	48 h.				40	40	20	100
20° C.	20 min.				40	20	20	100
20° C.	1 h.				80		20	100
20° C.	24 h.					80	20	100
20° C.	48 h.				40	40	20	100
37° C.	20 min.				20	60	20	100
37° C.	1 h.				10	80	10	100
37° C.	24 h.							0
37° C.	48 h.							0

Animales de experimentación

Se han utilizado los animales más receptivos y que presentan más claramente las alteraciones patológicas determinadas por cada virus de los estudiados.

Conejos. Se han elegido conejos de una talla media y buscando siempre que tuviesen blanca la piel del lomo y con el menor número posible de manchas que pudiesen falsear los resultados en la lectura de lesiones. Para nuestros experimentos hemos empleado, aproximadamente, 80 conejos.

Ratones. Hemos hecho uso de los procedentes del vivero instalado en el Centro de Investigaciones Biológicas, Sección de Animales de

Experimentación. Esta procedencia nos dio la garantía de operar siempre con animales bien alimentados y exentos de enfermedades. Se han utilizado muy cerca de los 1.200 ratones albinos, de peso comprendido entre los 18 a 22 g.

En estos animales se extremó la precaución y no se pusieron nunca más de 5 ratones por bocal. Se deben vigilar constantemente para apartar los animales enfermos en último grado sin que lleguen a morir, en el caso de las recogidas de cerebro para la obtención del material infectivo; sin embargo, en el caso de titulaciones e inoculaciones experimentales esta precaución no fue necesaria.

Investigación del poder viricida

El aspecto fundamental de nuestro trabajo de experimentación ha consistido en establecer contactos en períodos variables, entre el virus y el detergente cuaternario de amonio, para después comprobar la actividad por inoculación sobre animales receptivos.

Ha sido efectuada la experiencia sobre las cinco substancias anteriormente citadas, frente a virus vacunal y encefalíticos equinos Oeste y Este.

Al estudiar la acción de estos compuestos sobre los virus encefalíticos, hemos incluido en aquellas variables la temperatura de contacto de la mezcla, pues consideramos de gran importancia este factor, teniendo en cuenta que las variaciones de la temperatura son capaces de inactivar los virus indicados, tal como hemos demostrado en este trabajo.

(Concluirá)

CONFERENCIA EN LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE NUEVA YORK

La importancia adquirida durante los últimos años por los organismos del grupo de la pleuroneumonía (o.g.p.n.) y formas *L* de las bacterias, en relación con la patología humana y animal; la difícil clasificación de dichos organismos, y la semejanza de éstos, en muchos aspectos, con las formas citadas, movieron a la Academia de Ciencias de Nueva York a celebrar una Conferencia sobre "Biología de los organismos del grupo de la pleuroneumonía", que tuvo lugar durante los días 14 a 16 de enero del pasado año y a la que fueron invitados los especialistas más destacados en el campo científico internacional. Entre ellos, un español, nuestro compañero el Dr. Rubio-Huertos, Investigador científico del C. S. I. C.

La Conferencia comprendió siete secciones: I, Morfología y Clasificación; II, Aislamiento y Propagación; III, Clasificación de los organismos del grupo de la pleuroneumonía; IV, Fisiología; V, Serología y Quimioterapia; VI, Patología humana; VII, Patología animal. A primeros del año actual, los "Anales" de dicha Academia han recogido en un volumen (*) los trabajos presentados y las discusiones correspondientes.

Dentro del excelente nivel de los trabajos, podemos destacar algunos especialmente. En cuanto a la Morfología, los de los Dres. Liebermeister y Dienes; por lo que se refiere a Clasificación, el de los Dres. McKay y Truscott acerca de la reversión de los o.g.p.n. a bacterias, que muestra la estrecha relación entre ellos y las formas *L*.

Tiene gran interés el trabajo presentado en la Sección de Patología humana por el Dr. Rubio-Huertos, que firma con él la Dra. González, que demuestra que las formas *L*, consideradas no patógenas,

(*) Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 79, 305-758. 1960.

pueden producir toxinas en grado igual o superior a la bacteria originaria; esto fue confirmado en la discusión posterior por el Dr. Freundt, quien indicó haber obtenido resultados análogos en su laboratorio de Copenhague. Otros trabajos de la misma sección exponen la importancia de los o.g.p.n. en diversas enfermedades, principalmente en las del aparato genito-urinario. En Patología animal, el mayor interés se centra en las enfermedades producidas por los citados organismos en el aparato genito-urinario y en el respiratorio.

Núcleo fundamental de la Conferencia lo constituyó la discusión de mesa redonda acerca de "La clasificación de los organismos del grupo de la pleuroneumonía y sus posibles relaciones con las formas *L* de las bacterias", celebrada bajo la presidencia del Dr. Dienes (Estados Unidos), y en la que intervinieron la Dra. Klieneberger - Nobel (Inglaterra) y los Dres. Brisou (Francia), Edward (Inglaterra), Freundt (Dinamarca) y Rubio-Huertos (España). Según nuestros informes, se estimó que los conocimientos actuales no permiten afirmar la identidad o diferencia de las formas *L* y los o.g.p.n., bien que un grupo de especialistas, en el que se encuentra el Dr. Rubio-Huertos, cree que los o.g.p.n. son formas *L* estables, de las que no se conoce la bacteria originaria.

En resumen, una Conferencia muy interesante, no sólo para los dedicados al tema objeto de la reunión, sino, en general, para todos los microbiólogos.

L. Sánchez

ACTAS DE LA SOCIEDAD

Acta de la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 11 *de diciembre de* 1959.

Se abre la sesión a las diecinueve horas y cincuenta y cinco minutos, en el Salón de Actos del Instituto "Ramón y Cajal", del C. S. I. C., Velázquez, 138. Preside don Gerardo Clavero del Campo, y actúa como secretario, el de la Sociedad, don Lorenzo Vilas.

Se aprueba el Acta de la sesión anterior. El Sr. Pérez Silva presenta una comunicación sobre "Condiciones de producción de la debariocidina", a la que hacen comentarios el Secretario y los Sres. Rodríguez-Villanueva y Candela. El Sr. De Vicente da lectura a otra comunicación acerca de los "Factores que influyen en la filtración de los virus y otros principios activos". Hacen comentarios los Sres. Rubio, Rodríguez-Villanueva y Pérez Silva.

Se admite como socio de número a don Fernando Quevedo Ganoza, Químico-farmacéutico, peruano, presentado por don Gregorio Fraile y don Miguel Rubio.

Se levanta la sesión a las veintiuna horas y cinco minutos.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid