

VOLUMEN 14. 1961

ENERO - MARZO. NUMERO 1

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 para MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUIN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA
Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.

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



CONSEJO DE REDACCION

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

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

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

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

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

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

	Página
The biological activity of p-dinitrobenzene, by <i>J. Rodríguez-Villanueva</i>	I
Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. I. Alteraciones del comportamiento fisiológico de la <i>Escherichia coli</i> , por <i>Eulalia Cabezas de Herrera</i>	7
Técnicas microbiológicas para estudiar el comportamiento de asociaciones antibióticas, por <i>A. Portolés</i>	17
Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. II. Alteraciones del comportamiento fisiológico del <i>Bacillus cereus</i> , por <i>Eulalia Cabezas de Herrera</i>	53
Investigación del modo de acción de las sustancias antimicrobianas, por <i>J. Rodríguez-Villanueva</i> e <i>Isabel García-Acha</i> ...	59

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF p-DINITROBENZENE

BY

J. RODRIGUEZ - VILLANUEVA

Some organic nitro compounds are known to prevent growth of microorganisms (1-3) the toxic effect being due, at least in part, to uncoupling of oxidative phosphorylation and consequent interference with energy utilisation.

MATERIAL AND METHODS

Organism

The organism used throughout the experiments described in this paper is a newly isolated strain of *Nocardia* (4) and has been named *Nocardia* V for the purposes of these investigations.

Growth media

The media used for growing the organism utilised 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; NaHPO_4 , 0.5 per cent; K_2HPO_4 , 2 per cent; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 per cent and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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.

b) Synthetic media

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

Ammonium sulphate medium. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 per cent.

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

Growth conditions

10 ml volume were placed in a 25 ml Erlenmeyer flask and inoculated with 0.1 ml of an 18 hr tube culture of the organism grown on ammonium sulphate medium. The cultures were incubated at 30°C, shaking for 20 days.

Determination of the growth curve

The growth of the organism was determined by measuring the optical density of the culture at given times in a Beckman Model DU spectrophotometer at 700 m 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 milliliter.

Inocula

The inocula were grown in sterile 25 ml flask containing 5-10 ml of the same medium to be used.

RESULTS

The growth of *Nocardia* V. is inhibited by p-dinitrobenzene. This observation was made in the course of the systematic investigation on the ability of various nitrocompounds to support growth. p-Dinitrobenzene was added at concentrations ranging between 1×10^{-6} and 2×10^{-4} M to the growth media.

When using BLP medium no inhibition was observed in the presence of the nitro compound up to 2×10^{-4} M concentration. However, the lag phase of growth was prolonged for periods of time varying between 2 and 5 days at the higher concentration. Quite different results were obtained when the growth medium used was ammonium sulphate; here p-dinitrobenzene is found to be an effective growth inhibitor (Table 1).

Table 1. Effect of *p*-dinitrobenzene on the growth of *Nocardia* sp.

Amount of <i>p</i> -dinitrobenzene added (conc. M.)	Ammonium sulphate medium		BPL medium	
	Lag period (hr)	Growth	Lag period (hr)	Growth
None	—	+++	—	+++
1×10^{-6}	—	+++	—	+++
6×10^{-6}	56	+++	—	+++
1×10^{-5}	108	++	18	+++
5×10^{-5}	204	+	48	+++
1×10^{-4}	—	—	102	+++
2×10^{-4}	—	—	138	++

When the contents of the flasks, in which growth had not occurred after 20 days' incubation, were transferred into sterile 15 ml centrifuge tubes, centrifuged for 20 min at $1200 \times g$, and the sediment resuspended in new fresh medium without added nitro compound, full growth took place after further 48 hr incubation. This finding suggests that *p*-dinitrobenzene acts by preventing growth rather than by killing the organisms.

Attempts have been made to reverse the inhibition of growth by the nitro compound by supplementing the ammonium sulphate medium with various mixtures of substances known to be effective in other organisms. So far the only effective addition has been *L*-glutamic acid (0.2 per cent), or a mixture of 18 amino acids at a concentration of 200 γ /ml. Mixtures of vitamins (pyridoxin HCl 1 mg, nicotine acid 2 mg, biotin 5 γ , thiamine 1 mg, calcium pantothenate 1 mg, *p*-aminobenzoic acid 1 mg and riboflavin 1 mg, all concentrations per liter), thiols and trace metals mixtures, either alone or in combination, are unable to reverse the inhibition.

These observations suggest that *p*-dinitrobenzene may act simply as an antagonist of a single essential metabolite. It is also possible that reversal may be due to indirect factors influencing the growth of the organism in some other manner. However a more detailed study of this effect will clarify their actions and such investigations are being carried out.

SUMMARY

This communication describes the inhibition of *Nocardia V.* by p-dinitrobenzene. This nitro compound was added at various concentrations to the growth media. When using a complex medium no inhibition was observed in the presence of the highest concentration of the nitro compound, in marked contrast with the results obtained when was used a synthetic medium. Here the p-dinitrobenzene is found to be an effective growth inhibitor, acting by preventing rather than by killing the *Nocardia* cells.

Attempts have been made to reverse the inhibition of growth by the nitro compound. So far the only effective addition has been *l*-glutamic acid or a mixture of 18 amino acids.

Insufficient material on the comparative aspects of the p-dinitrobenzene affect with other nitro compounds inhibition is yet available to justify any broad generalisations. Some new investigations are now in progress.

RESUMEN

Se describe la inhibición de *Nocardia V.* por p-dinitrobenceno. El nitroderivado se añade al medio de cultivo en varias concentraciones. Cuando se utiliza un medio complejo no se produce inhibición alguna en presencia del nitroderivado, obteniéndose resultados muy diferentes cuando el medio de cultivo utilizado es de carácter sintético. El p-dinitrobenceno parece ser un inhibidor efectivo actuando de forma que previene el crecimiento en vez de matar el organismo.

Se han realizado numerosos intentos con el fin de revertir la inhibición del crecimiento por el nitroderivado. Hasta el momento, la única sustancia que parece ser efectiva es la forma levógira del ácido glutámico o una mezcla de 18 aminoácidos.

Los resultados obtenidos de los estudios realizados se consideran aún insuficientes para justificar una generalización del modo de actuar del p-dinitrobenceno. Actualmente se están llevando a cabo nuevas investigaciones.

REFERENCES

1. HIGGINS, E. S. 1958. Proc. Soc. Exp. Biol. & Méd., 99, 527.
2. BUSH, M. T., MORRIS, M., and APOSHIAN, H. V. 1958. J. Pharm. & Exp. Therap., 123, 7728.
3. COCITO, C. 1958. Proc. Soc. Exp. Biol. & Méd., 98, 418.
4. VILLANUEVA, J. R. 1960. Microbiol. Españ., 13, 169.

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

ESTUDIO DE LOS EFECTOS QUE PRODUCE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LAS BACTERIAS

I. Alteraciones del comportamiento fisiológico de la *Escherichia coli*

POR
EULALIA CABEZAS DE HERRERA (*)

INTRODUCCION

El efecto de la luz ultravioleta sobre los microorganismos ha sido objeto de numerosos estudios.

Una de las primeras observaciones de laboratorio de los efectos que produce la radiación sobre las bacterias, fue publicada por Downes y Blunt en 1877 (3). Desde entonces la literatura ha acumulado volúmenes y volúmenes como resultado del alto interés de los efectos de la radiación sobre las bacterias *per se* y también por la relativa facilidad de estudios cuantitativos de los efectos biológicos que la radiación puede causar en las mismas.

Cuando las bacterias son expuestas a la radiación en el alcance del ultravioleta o de gran energía, el efecto que más llama la atención es la muerte aparente de un porcentaje de células; la porción de células muertas está en función de la energía absorbida.

El criterio usual de supervivencia es la capacidad de las bacterias para formar colonias visibles en los medios de cultivo ordinarios. Esta medida arbitrariamente adoptada para medir el efecto bactericida de la radiación, aunque es conveniente para estudios cuantitativos, es insuficiente.

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

ciente para una variedad de condiciones experimentales. Hollaender (4) demostró que una exposición prolongada en solución salina, después de irradiada con ultravioleta, reduce la fracción de organismos que forman colonias. Roberts y Aldous (7), antes y después de irradiar, hacen estudios en varias condiciones experimentales, las cuales afectan a la supervivencia de la estirpe estudiada.

Kelner (5) observó que la exposición de las bacterias a la luz visible, después de irradiadas, aumentaba la supervivencia (fotorreactivación). Anderson (1-2) y Stein y Meutzner (11), han mostrado que el aumento de temperatura de incubación aumenta la supervivencia de la *Escherichia coli*, estirpe B. Stapleton (9) ha encontrado marcadas diferencias en la radiosensibilidad de la *E. coli* en los diferentes estadios de su ciclo de crecimiento.

Todo esto demuestra la multiplicidad de factores que influyen en los resultados cuantitativos obtenidos en los estudios, de los efectos bactericidas de la radiación. Consecuentemente, para obtener resultados reproducibles es necesario que estas variables sean adecuadamente reguladas.

MATERIAL Y METODOS

Para el estudio que nos proponemos hacer de las estirpes patrón en su aspecto morfológico y estructural bioquímico, así como para establecer las diferencias de sensibilidad de las células bacterianas a la acción de la luz ultravioleta en los diferentes estadios de su ciclo de crecimiento, será necesario conocer el mecanismo de crecimiento de las mismas. Esto sólo es posible trabajando con células que se dividan sincrónicamente, ya que si no trabajaríamos con poblaciones compuestas de células de diferentes edades y los resultados dependerían de la proporción en que se encontrara la bacteria en sus diferentes estadios de crecimiento, en el momento de efectuar el ensayo.

Recientemente han atraído especial atención las técnicas de los cultivos sincrónicos. Los métodos usados para este propósito difieren según los organismos empleados.

Seguimos el método de Scott y Chu (8), por juzgar que es el más apropiado para nuestro tipo de trabajo.

Estirpe

Para nuestros estudios utilizamos *E. coli*, estirpe K₁₂, procedente del Instituto Pasteur, conservada sobre agar-caldo en cámara de 4°C. Trabajamos siempre con cultivos sincrónicos sobre caldo común.

Las características fisiológicas de esta estirpe las fijamos estudiando su comportamiento frente a 37 medios de cultivo diferentes. Los azúcares llevan como indicador púrpura de bromocresol.

Curvas de crecimiento

La literatura está repleta de información concerniente a la variabilidad en la sensibilidad de las células bacterianas a la inactivación por distintos agentes físicos y químicos, durante el ciclo de crecimiento. La

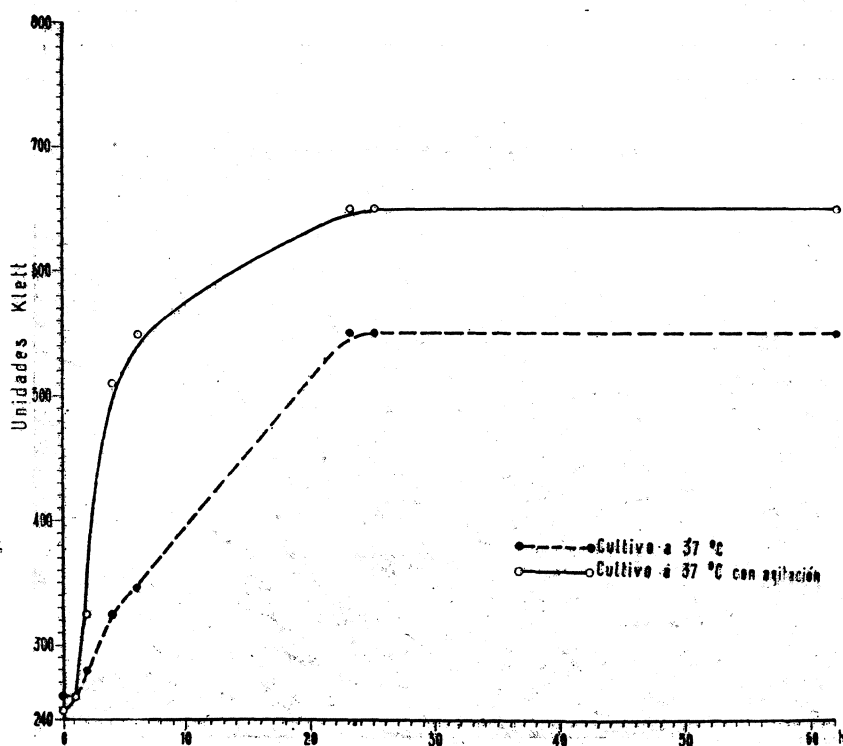


Figura 1

mayoría de los autores sostienen la tesis de que las bacterias jóvenes son más sensibles a estos agentes que las ya maduras. Winslow y Walker (12) resumieron la mayor parte de la información y propusieron una explicación basada en la juventud fisiológica de las células de los cultivos en crecimiento.

Es importante considerar las dificultades al intentar relacionar los resultados de distintos investigadores; los organismos con que trabajan y las condiciones de crecimiento son tan diversos como los investigadores mismos.

Los términos de células "jóvenes" y "viejas" no es probable que todos los utilicen para designar a células en idéntico estado fisiológico.

Es fundamental conocer el papel que juegan los estadios fisiológico y metabólico en la sensibilidad de las bacterias a la radiación. Este conocimiento podría ayudar a explicar los resultados tan dispares frecuentemente encontrados en tales investigaciones, así como también permitiría una comprensión del mecanismo de acción de la radiación sobre los microorganismos. Desde este punto de vista, fue Stapleton (10) quien

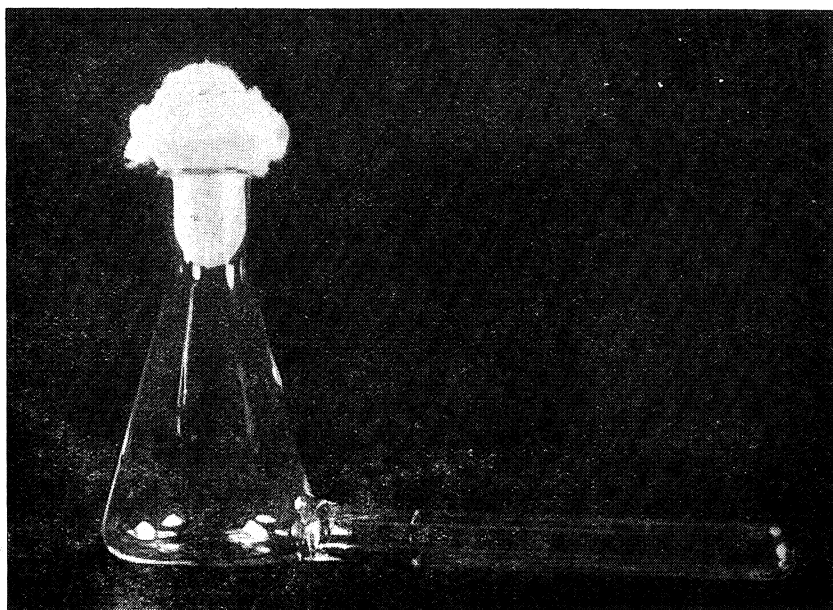


Figura 2

llevó a cabo una investigación para conocer las variaciones de sensibilidad de la *E. coli* a las radiaciones. Se ha encontrado que la fase de adaptación está caracterizada por un aumento de resistencia a la radiación y la fase logarítmica coincide con un lento pero regular descenso de la resistencia, resultando las células más sensibles.

Por este motivo obtenemos las curvas de crecimiento de la estirpe, con la doble finalidad de: a) conocer el momento del ciclo de crecimiento en que irradiamos la bacteria, y b) compararla con la que más tarde obtendremos con la estirpe después de irradiada (*figura 1*).

Para la obtención de las curvas de crecimiento disponemos de un fotolorímetro Klett-Summerson, modelo 800-3 y de los matraces de cultivo diseñados para este fin (*figura 2*).

Concentración celular

Tomamos muestras del cultivo en plena fase logarítmica de crecimiento (doce horas).

Estos cultivos son diluidos a 10^8 células/cm³ con caldo común fresco y entonces son irradiados.

La concentración celular de la suspensión la determinamos por el método de recuento en placa.

Irradiación

Disponemos de una cámara de luz ultravioleta con 4 lámparas de mercurio Sylvania de 15 W que emiten una longitud de onda de 2.537 Å; las paredes de la cámara están recubiertas con planchas de aluminio.

La cámara está dispuesta sobre un agitador de vaivén de 113 r/m y está instalada dentro de una cámara oscura.

En placas de Petri de 4,5 cm de diámetro ponemos 2 cm³ de la suspensión bacteriana.

Las placas se disponen en una bandeja, a 14,5 cm del foco de emisión.

Irradiamos durante diferentes períodos de tiempo, que oscilan de cinco a noventa minutos.

Como la suspensión bacteriana es lo suficientemente densa para que la intensidad ultravioleta varíe de la superficie al fondo, por la absorción de la luz ultravioleta por las células en suspensión, utilizamos el método

de Morowitz (6) para obtener la intensidad efectiva proporcionada a través de la muestra.

Durante la irradiación, las muestras son constantemente agitadas, lo que hace más homogénea la radiación.

Una vez irradiada la bacteria, se siembra en caldo común fresco; en los matraces diseñados para este fin, para obtener las curvas de crecimiento; y en los distintos medios de cultivo, para conocer su comportamiento fisiológico. Cultivamos a 37 °C.

Todas estas operaciones las realizamos en cámara oscura, y tanto los matraces como las gradillas que contienen los medios son preservados de la luz.

RESULTADOS

En el *cuadro 1* podemos ver el diferente comportamiento de las estirpes testigo e irradiada frente a los diferentes medios de cultivo y aun las diferencias de comportamiento, según el tiempo que ha sido irradiada la bacteria.

La *figura 1* nos muestra la curva de crecimiento de la estirpe testigo cultivada a 37 °C sobre caldo común en reposo y con agitación, y la *figura 3* las diferencias existentes en las curvas de crecimiento, según el tiempo que ha sido irradiada la bacteria.

DISCUSION

El mecanismo de inactivación ultravioleta más comunmente admitido es el de la teoría del "blanco", derivada de la curva de supervivencia. Sin embargo, esta teoría omite totalmente el efecto biológico general de la radiación sobre la célula y la considera como una partícula esencial, la cual puede sobrevivir o morir.

Actualmente se sabe que la célula bacteriana tiene una organización biológica compleja y después de la irradiación pueden ocurrir en ella múltiples cambios.

Nuestro punto de vista es que la acción fotoquímica de la radiación ultravioleta debería ser interpretada en términos de "grado de daño biológico", más que en términos de vida o muerte.

Cuadro I

Medios de cultivo	Estirpe					
	Tes- tigo	Irradiada, min				
		5	15	30	60	90
Acetato de plomo	+	+	+	+	+	+
Adonita	—	—	—	—	—	—
Agua de peptona	+	+	+	+	+	—
Albúmina de huevo	—	—	—	—	—	—
Almidón	—	+	—	—	—	—
Arabinosa	+	+	—	+	+	+
Caldo común	+	+	+	+	+	+
Caldo con ClNa	+	±	±	±	±	±
Caldo con NO ₃ K al 1 %	+	(*)	(*)	(*)	+	+
Caldo con urea al 1 %	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	—	—	—	—	—	—
Dextrina	+	+	+	+	—	+
Dulcita	—	+	±	+	—	—
Eritrita	—	—	—	—	—	—
Galactosa	+	+	+	+	—	—
Gelatina	—	—	—	—	—	—
Glicerina	—	+	+	+	—	—
Glicógeno	—	—	—	—	—	—
Glucosa	+	+	+	+	—	—
Inosita	—	—	—	—	—	—
Inulina	—	—	—	—	—	—
Koser	+	+	±	±	+	±
Lactosa	+	+	+	+	—	—
Leche tornasolada	+	+	+	+	+	+
Levulosa	+	+	+	+	+	±
Maltosa	+	+	+	+	+	—
Manita	+	+	+	+	—	—
Manosa	+	+	+	+	—	—
Melobiosa	+	+	+	+	—	—
Metil-glucósido	—	—	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—	—	—
Rhamnosa	+	+	+	+	—	—
Sacarosa	—	—	—	—	—	—
Sorbita	—	—	—	—	—	—
Trehalosa	+	+	+	+	—	—
Voges-Proskauer	—	—	—	—	—	—
Xilosa	+	+	—	+	+	+

(*) Crece, pero no reduce nitratos.

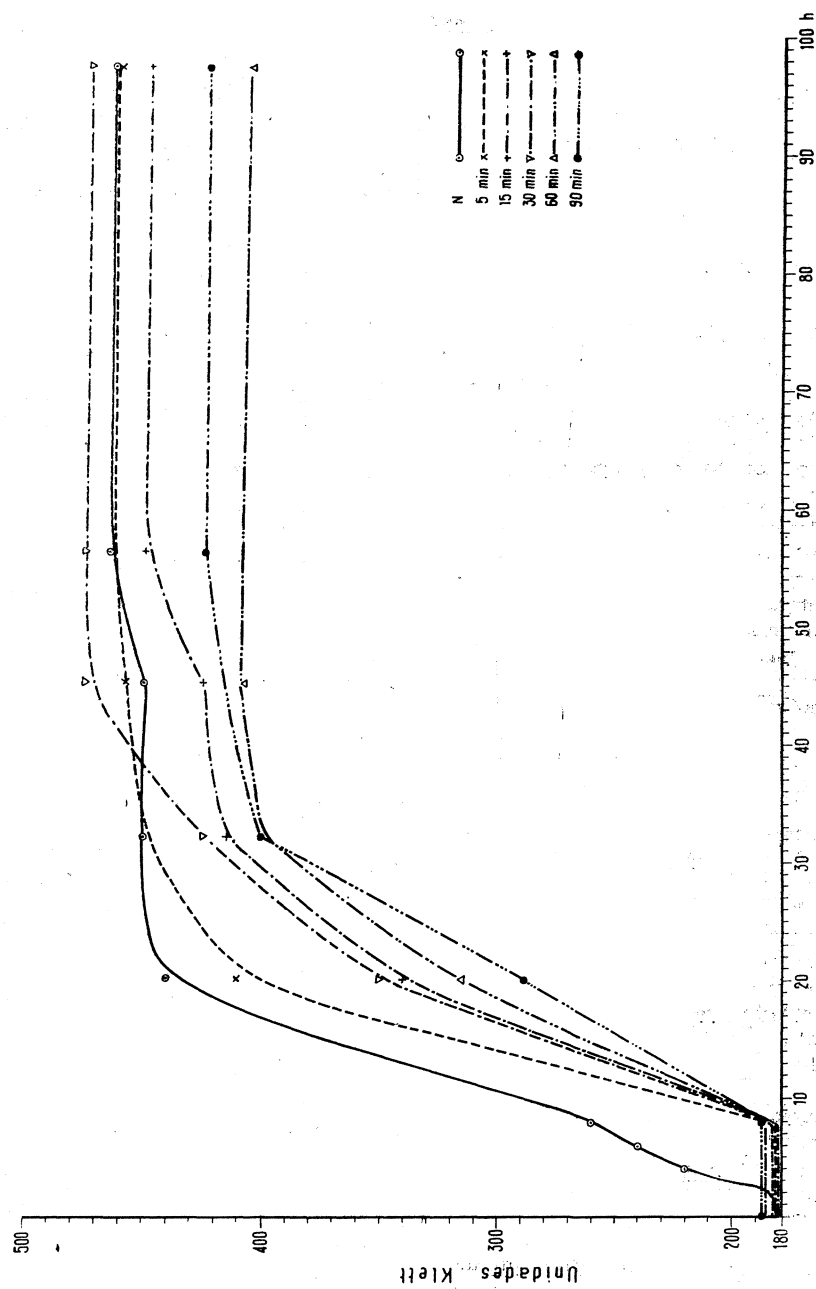


Figura 3
N = estirpe testigo

En los experimentos realizados a lo largo de nuestro trabajo hemos podido comprobar que las bacterias, después de irradiadas, sufren una serie de alteraciones, extensión de la fase estacionaria y diferente comportamiento frente a los 37 medios de cultivo con que fijamos las características de la estirpe testigo.

Esto refleja que la radiación ultravioleta produce un daño en varios lugares de la célula bacteriana, de los cuales unas veces se recupera y otras no; y que estos daños pueden ser medidos en alteraciones en su metabolismo, síntesis celular, fisiología, morfología, etc., sin que llegue a producirse la muerte de la bacteria.

RESUMEN

Hacemos un estudio de las curvas de crecimiento y del comportamiento fisiológico frente a 37 medios de cultivo, de cultivos sincrónicos de *Escherichia coli*, estirpe K₁₂ —testigo e irradiada— y fijamos las alteraciones fisiológicas producidas por la luz ultravioleta.

SUMMARY

Physiological characters of synchronic cultures of normal and U. V. irradiated *Escherichia coli* K₁₂ were studied. The different physiological abnormalities found in the U. V. irradiated *E. coli* cultures are stated.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, E. H. 1949. Reaction of ultraviolet-irradiated bacteria. *Am. J. Botany*, 36, 807.
2. ANDERSON, E. H. 1951. Heat reactivation of ultraviolet-inactivated bacteria. *J. Bacteriol.*, 61, 389-94.
3. DOWNES, A., y BLUNT, T. P. 1887. Researches on effect of light upon bacteria and other organisms. *Proc. Roy. Soc. London*, 26, 488-586.
4. HOLLAENDER, A. 1943. Effect of long ultraviolet and short visible radiation (3.500 to 4.900 Å) on *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 46, 531-41.

5. KELNER, A. 1949. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *E. coli* with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. *J. Bacteriol.*, 58, 511-22.
6. MOROWITZ, H. J. 1950. Absorption effects in volume irradiation of microorganisms. *Science*, 111, 229-30.
7. ROBERTS, R. B., y ALDOUS, E. 1949. Recovery from ultraviolet irradiation in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 57, 363-75.
8. SCOTT, Mc. N., y CHU, E. 1958. Synchronized division of growing cultures of *E. coli*. *Exp. Cell Research*, 14, 166-74.
9. STAPLETON, G. E. 1952. Variations in the radiosensitivity of *E. coli* during the growth cycle. Tesis. Universidad de Tennessee.
10. STAPLETON, G. E. 1955. Variations in the sensitivity of *E. coli* to ionizing radiations during the growth cycle. *J. Bacteriol.*, 70, 357-62.
11. STEIN, W., y MEUTZNER, I. 1950. Reaktivierung von UV-inaktivierten *Bacterium coli* durch Wärme. *Naturwissenschaften*, 37, 167-68.
12. WINSLOW, C. E. A., y WALKER, H. H. 1939. The earlier phases of the bacterial culture cycle. *Bacteriol. Rev.*, 3, 147-86.

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

TECNICAS MICROBIOLOGICAS PARA ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO DE ASOCIACIONES ANTIBIOTICAS (*)

POR
A. PORTOLES

INTRODUCCION

La detenida revisión de antecedentes bibliográficos con referencia a las acciones combinadas de antibióticos sitúa el problema entre dos opiniones totalmente opuestas en relación con la aplicación o no, simultáneamente, de dos antibióticos: mientras que para algunos estas combinaciones antimicrobianas retrasan o impiden la aparición de resistencias, produciendo efectos de marcada sinergia, para otros existe gran número de antagonismos o contraindicaciones. Esta disparidad de conclusiones es debida, en muchas ocasiones, tanto a la falta de homologabilidad en métodos y objetivos que permitan una adecuada comparación en los datos, como a la continuada variabilidad bacteriana que impide el establecimiento de reglas de aplicación fijas. Ello nos condujo al estudio de técnicas microbiológicas apropiadas para investigar el comportamiento de estas asociaciones binarias de antibióticos, de forma que sus resultados permitieran establecer un criterio comparativo que valore y sitúe exactamente los distintos puntos del problema.

El efecto más simple que se busca al utilizar antibióticos, es la inhibición del crecimiento bacteriano, y es precisamente a esta respuesta biológica a la que se acude, generalmente, para juzgar de la interacción de estas sustancias antibióticas.

(*) Esta publicación forma parte de un trabajo pensionado por la Fundación "Juan March".

Los métodos de uso general mediante los que se espera conocer esta acción inhibidora, son de tres tipos: dilución seriada en caldo, diluciones sobre placa y técnicas de difusión en medio sólido. Nuestra experiencia en el uso de las mismas y los antecedentes bibliográficos, nos señalan que cualquiera de ellas presenta inconvenientes que pueden ser mitigados en la medida de lo posible cuando se seleccionan convenientemente, de acuerdo con el objetivo a cumplir y trabajando en las condiciones más correctas y precisas para conocer un efecto final determinado.

Es cierto que estos inconvenientes se verán aumentados cuando se trate de mezclas de antibióticos, y esto es la causa de que sean recusables y opuestos los resultados de muchos autores; nosotros consideramos del máximo interés estudiar y seleccionar las técnicas más idóneas para estos propósitos. Sea cual fuere la técnica empleada, siempre encontraremos una serie de factores, inherentes al método, que son decisivos en la interpretación de los resultados, como: composición y pH del medio, tamaño del inóculo y fase del desarrollo de los gérmenes, humedad y espesor de la capa en el medio sólido, etc. Pero teniendo en cuenta que, según Jackson y Finland (23), no siempre son justificables las comparaciones entre los diferentes métodos, puesto que cada laboratorio selecciona el que se adapta mejor a sus necesidades, y por otra parte, que los valores obtenidos dependerán tanto como de las variables ya mencionadas de la elección del punto final de inhibición total o parcial; nosotros emplearemos métodos de difusión para detección rápida de sinergismos, métodos de dilución en tubo y en placa para el estudio de aparición de resistencias, y métodos de dilución turbidimétricos y de tubo a placa para estudiar las condiciones de aparición de los sinergismos y antibiogramas.

TECNICAS SOBRE MEDIO SOLIDO

Detección de la actividad bacteriostática

Si bien los métodos por difusión son más utilizados por su rapidez y simplicidad, máxime desde que distintos laboratorios facilitan discos de papel impregnado o pastillas cargadas con distintas dosis de antibiótico, tienen el inconveniente de llevar consigo problemas de tipo físico que complican los resultados bacteriológicos. No obstante, cuando las técnicas

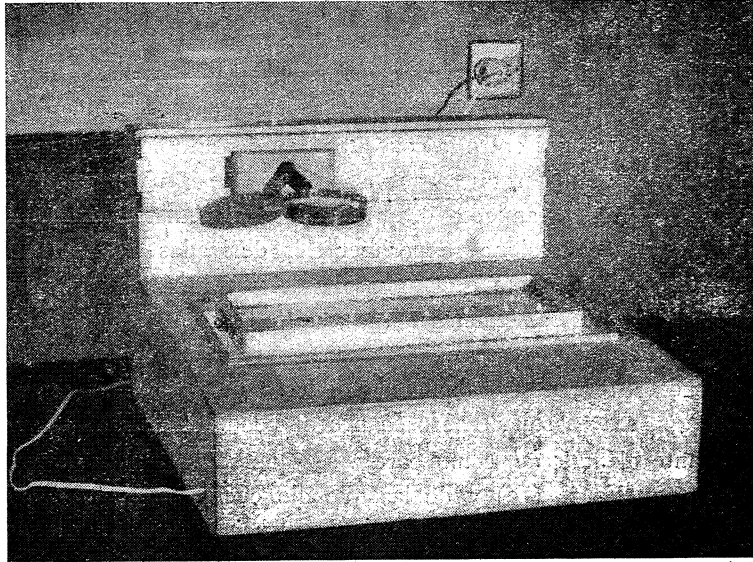
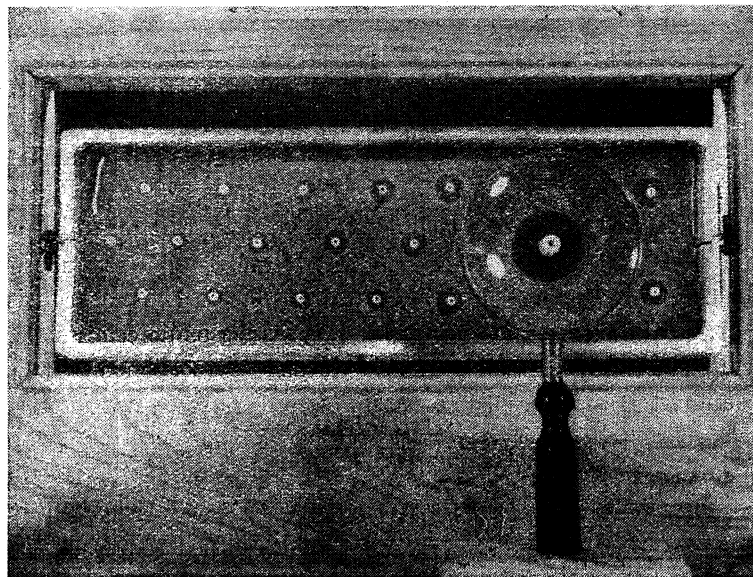
por difusión se aplican correctamente; es decir, eliminando al máximo las distintas variables que pueden originar resultados erróneos, se pueden obtener datos de gran interés para orientar la Antibioterapia.

Los distintos problemas que plantean estos métodos por difusión, se someten a las relaciones entre la concentración del antibiótico y el diámetro del halo de inhibición, que a su vez depende de la naturaleza del antibiótico y del comportamiento de la estirpe bacteriana, por un lado, y por otro, de las condiciones experimentales derivadas de la dosis del antibiótico (46), de la composición y pH del medio (6), de la fase de crecimiento del germen de ensayo (40), de la concentración de inóculo (7, 27), del espesor de la capa de siembra, del grado de humedad y, según hemos estudiado experimentalmente, del modo de hacer la siembra del inóculo, según sea en superficie o en profundidad.

En cuanto al *material*, como parece ser que según unas experiencias efectuadas por Fabre (13) y de las que dio cuenta a la Academia de Farmacia Francesa, no hay exacta correspondencia entre el título en sustancia antibiótica de los discos y su actividad, puesto que este autor ha comprobado que de los 92 lotes de discos examinados, tan sólo 22 respondían a los datos del laboratorio que los fabricó, hemos decidido poner en práctica el método del pocillo (*cup standard*), con pequeñas piezas de material refractario procedentes de la "M. Taylor Tunnicliff Co.", de Londres, que, por capilaridad, se cargan con $\pm 0,02$ cm³ de solución antibiótica, según hemos determinado por pesada y repetidas medidas del halo de inhibición para una misma concentración antibiótica. Por la sustancia mineral de que están constituidos, permiten una acabada limpieza y perfecta esterilización al usarlos repetidas veces.

Y el resto del material —independientemente de pipetas, tubos, matraces, etc., de uso común en el laboratorio— que es obligado consignar, son las *placas* utilizadas por nosotros en otros trabajos de esta índole (36-37, 42-43). Por último, la importancia de una correcta medición de los halos de inhibición nos impulsó a encargar un *dispositivo con iluminación indirecta* sobre fondo negro (*figura 1*) (ideado por nosotros) y al que se adapta una lupa sobre corredera que permite examinar perfectamente las distintas partes de la placa con el aumento que puede verse en la *figura 2*.

Son dos los *medios de cultivo* que utilizamos en este tipo de experimentos: una capa básica, que por desear fuera muy transparente, hemos

*Figura 1**Figura 2*

usado solución salina con 2,25 por ciento de agar, habiendo comprobado es un buen soporte, liso, consistente y algo impermeable, por la diferente velocidad de difusión de los antibióticos con relación a la capa superior; y el medio de siembra que fue extracto de carne (1 g), bactotripton (2 g), agar (1,5 g) y agua (100 cm³). En ocasiones se hizo preciso añadir 7,5 cm³ de suero para facilitar el crecimiento, hecho ya patentizado en la afirmación de Belcove y Santow (4) de que "se añadirá sangre a los medios para antibiogramas de productos patológicos". Es conocida la influencia que para la actividad de los antibióticos tiene su grado de disociación en relación con el pH del medio, y si bien algunos de estos inhibidores son más efectivos a pH ácidos, nosotros utilizamos en nuestros experimentos la reacción 7,2-7,3, por ser ésta la del plasma sanguíneo y por tanto la del *habitat* bacteriano cuando actúan como agentes infecciosos, si bien en ocasiones puede haber variaciones orgánicas de pH a nivel de focos inflamatorios o de mucosas en estado patológico; por otra parte, Garrod y Waterworth (15) que estudiaron el efecto de varios pH en el comportamiento de algunos antibióticos, parecen concluir que, en general, es preferible utilizar el medio ligeramente alcalino.

Por otra parte, también cuidamos particularmente de conseguir un buen estado de sequedad de la superficie de la placa manteniéndolos en estufa a 37 °C durante tres horas antes de colocar los pocillos, para evitar que el líquido de la superficie diluya el antibiótico o produzca errores en la difusión. En este tiempo de secado se logra, además, que los gérmenes salgan de la nueva fase de latencia al sembrarlos.

Los *gérmenes* en estos ensayos, han sido cepas de la colección Nacional de Cultivos tipo, del Consejo de Investigaciones Médicas, de Londres —*Staphylococcus aureus* Heatley (Oxford 657) y *Escherichia coli* Escherich 86—. Ambas, son las más idóneas por su comportamiento uniforme y sensible para este estudio previo de las técnicas.

Utilizamos un *inóculo* relativamente grande: los argumentos de Spicer y Blitz (45) se resumen en favor del inóculo máximo para que las pruebas de sensibilidad sean rigurosas en cuanto a la detección de los organismos más resistentes, a la vez que a la mayor proporción del grupo. Hemos empleado la concentración de 10⁸-10⁹ gérmenes/cm³, esperando entrar con ella dentro de la "razón de mutación" e incrementar la probabilidad de que puedan existir formas resistentes. También haremos constar que los gérmenes ensayados estaban en la fase logarítmica de su cre-

cimiento, a fin de obtener poblaciones bacterianas más resistentes y homogéneas y tan idénticas como sea posible; con ello se eliminarán variaciones de difusión en la fase de latencia, ya que si los gérmenes se encontrasen en estado de reposo, los agentes bacteriostáticos que actúan sobre la multiplicación bacteriana perderían su objetivo. El inóculo utilizado puede definirse de modo esquemático por:

Siembra por trazo sobre tubo inclinado de agar común. Cultivo a 37 °C.	{	A las 18 h, siembra de un asa de 5 mm en 10 cm ³ de caldo común. Cultivo a 37 °C.	{	A las 16-18 h, centrifugación del cultivo; se lava con solución salina estéril, dos veces; se centrifuga y se añade solución salina hasta alcanzar por comparación opacimétrica la concentración de 5×10^9 .
--	---	--	---	---

De esta suspensión de gérmenes se siembra al 2 por ciento sobre la capa superior fundida y enfriada a 45 °C.

Los *agentes antibióticos* de que dispusimos fueron: *penicilina G potásica* cristalizada, *dihidroestreptomicina* (sulfato), *tetraciclina* (clorhidrato), *cloranfenicol* (succinato), *clorotetraciclina* (clorhidrato), *oxitetraciclina* (clorhidrato), *eritromicina* (etilcarbonato), *novobiocina sódica*, *kanamicina* (sulfato) y *ristocetina liofilizada*. Con ellos, se prepararon diluciones madres en solución salina estéril, tamponándolas a los pH recomendados por Grove y Randall (18) para cada antibiótico, excepto para los más modernos, en los que acudíamos a la información particular del laboratorio preparador. Se conservaron en frigorífico a temperaturas de -20 °C.

Los *resultados obtenidos* —valiéndonos del material y medios citados precedentemente— al ensayar las características de difusión sobre medio sólido de los trece antibióticos que aquí se estudian, frente a cepas de estafilococos y colibacilos sembrados en sábana y por interposición en la capa de siembra, se indican en las gráficas correspondientes (*).

En ellas, más que una exactitud o rigor matemático, hay que buscar un sentido de las respuestas biológicas del germen frente al antibiótico; así, variaciones menores de 1 mm no tendrían significado práctico, pero sin embargo, la expresión gráfica de los valores —tomando en ordenadas el diámetro en milímetros de los halos de inhibición y en abscisas los logaritmos de las concentraciones antibióticas/pocillo, que han actuado— son harto elocuentes para darnos idea de sus características de difusión.

(*) Los valores utilizados en las gráficas son media aritmética de 9 determinaciones efectuadas para cada concentración-problema.

Así, en la *penicilina* (figura 3), frente al estafilococo, puede verse cómo se entrecruzan las líneas de inhibición, según el ensayo se haga por siembra en sábana (E_s) o en profundidad (E_p), existiendo poca diferencia entre sus resultados; asimismo haremos notar que a dosis de 1-4 U. I./ pocillo, las líneas E_s y E_p son paralelas, en tanto que de 4-8 U. I./ pocillo hay escasísimas variaciones, sobre todo para las dosis de 6 y 8 U. I.

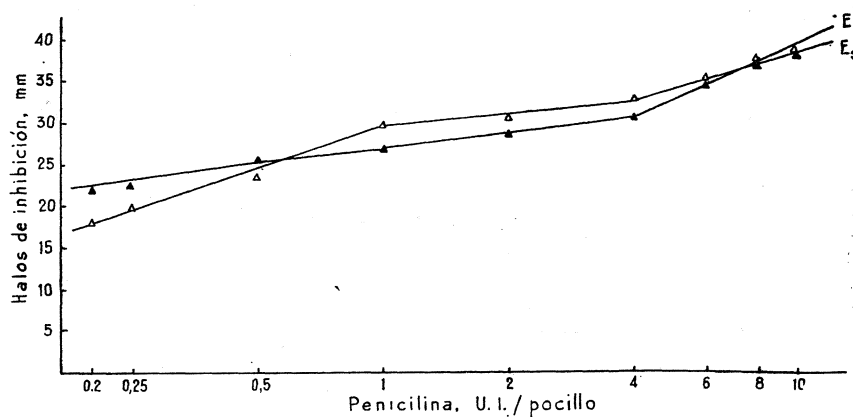


Figura 3

Sin embargo, para la *dihidroestreptomicina* (figura 4) los valores que se obtienen por siembra en sábana, para ambos gérmenes (E_s y C_s) son marcadamente superiores a sus equivalentes en profundidad (E_p y C_p), debido quizá a que superficialmente no se suman a la interacción de la bacteria frente al antibiótico, las interferencias del medio, especialmente cuando contiene suero; hecho que resulta más patente para el colibacilo

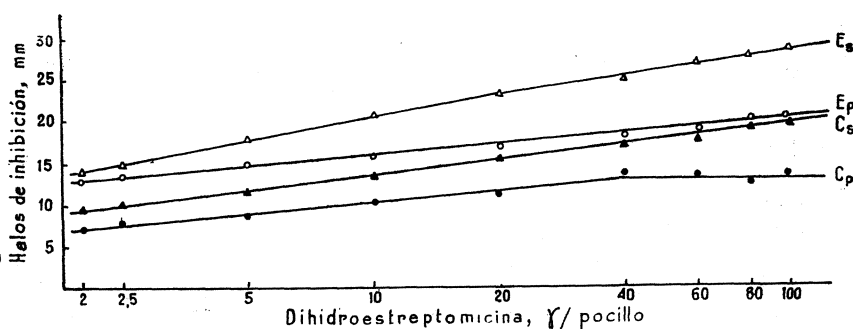


Figura 4

sembrado en profundidad, cuando las dosis estreptomycinicas son superiores a 40 γ . En la figura se ve que, frente a las dos especies bacterianas, las líneas (E_s , E_p y C_s , C_p , respectivamente) obtenidas para ambos ensayos son sensiblemente paralelas en toda la escala, especialmente entre 2,5-40 γ /pocillo.

También con *cloranfenicol* (figura 5), se obtienen valores más altos cuando se difunde el inóculo en superficie (E_s y C_s). Frente al estafi-

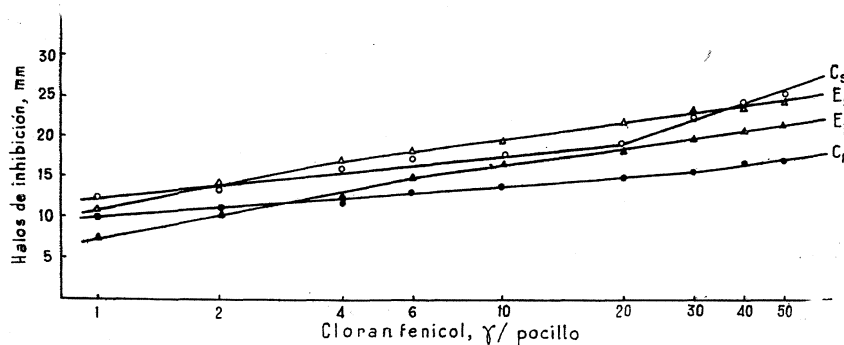


Figura 5

lococo, se puede observar el comportamiento paralelo para ambos ensayos (E y E_p) a dosis comprendidas entre 10-30 γ /pocillo, y lo mismo puede decirse para el colibacilo, aunque no de modo tan acusado, para la escala comprendida entre 4-20 γ /pocillo.

Cuando se experimenta con *tetraciclina* (figura 6), se puede ver un discreto paralelismo en los niveles de 2-40 γ /pocillo; este paralelismo

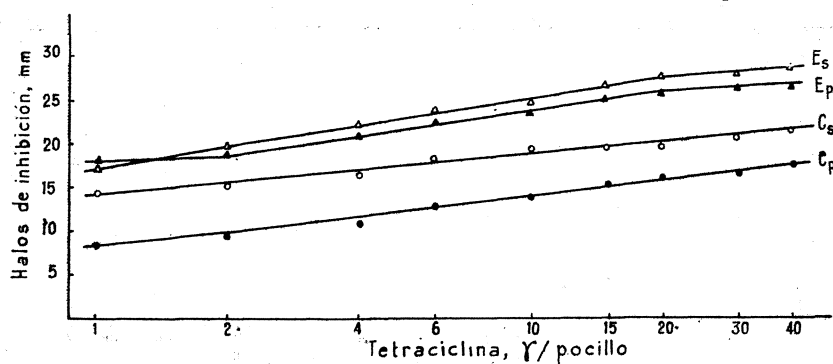


Figura 6

muestra un punto de inflexión en las 20 γ , para el estafilococo, donde los valores encontrados en ambos ensayos están muy próximos, cosa que no sucede con el colibacilo.

La clorotetraciclina (figura 7) frente al estafilococo, muestra paralelismo E_s y E_p entre 1-4 y 20-40 γ /pocillo, mientras que en la zona intermedia hay divergencia de resultados para ambos ensayos. Este pa-

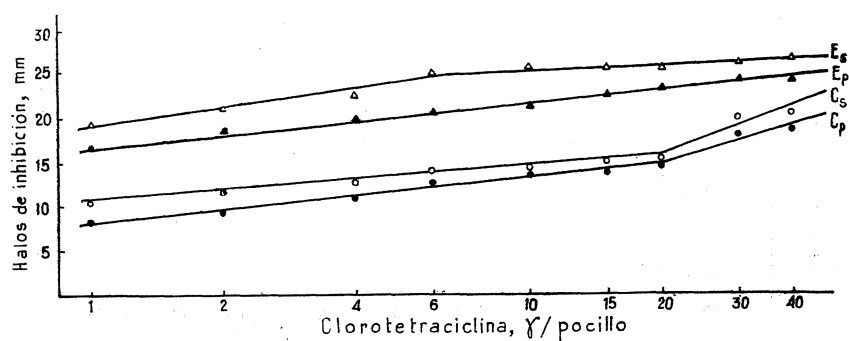


Figura 7

ralelismo está más acusado y para todos los valores de la escala en los ensayos con colibacilo. También son mayores los valores en superficie (E_s y C_s), aunque en el caso del colibacilo sean casi coincidentes para la zona de 1-20 γ /pocillo.

Asimismo, en el caso de la oxitetraciclina (figura 8), se observan zonas de paralelismo entre los valores de las dos modalidades de ensayo; frente al estafilococo, se observa discreto paralelismo de 2-40 γ /pocillo.

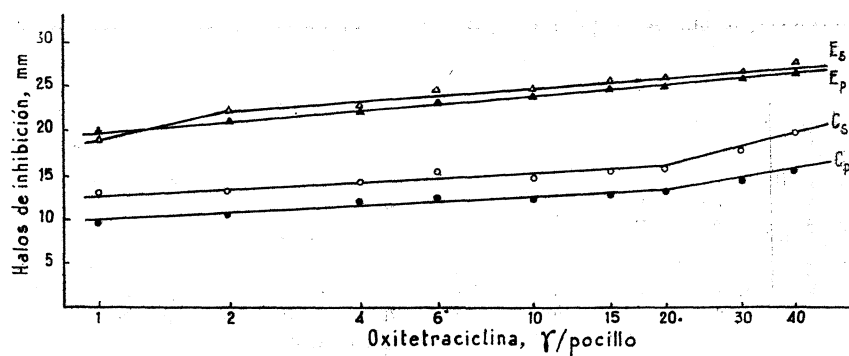


Figura 8

con valores muy próximos de E_s y E_p ; en tanto que en el colibacilo este paralelismo es muy marcado y alcanza desde 1-20 γ /pocillo, donde ya aparece un punto de inflexión. Los valores obtenidos por siembra en superficie son siempre mayores que los de siembra en profundidad.

Al llegar a la *eritromicina* (figura 9) parecen invertirse los valores; así E_s es inferior a E_p por debajo de las 10 γ , a partir de cuya con-

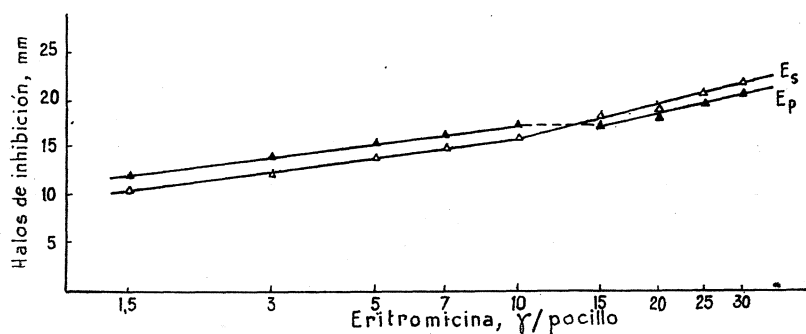


Figura 9

centración hay una zona de inflexión de 10-15 γ /pocillo donde se cruzan las líneas y se obtienen valores coincidentes para ambos ensayos; existe paralelismo en la zona 1,5-10 y de 15-30 γ /pocillo. No se observaron halos de inhibición, ni muestras que indicaran difusión frente al colibacilo.

Cuando se hizo actuar a la *polimixina B* (figura 10) frente al estafilococo, se obtuvieron valores tan bajos y confusos para concentraciones inferiores a las 40 γ /pocillo, que no lo señalamos gráficamente. En el

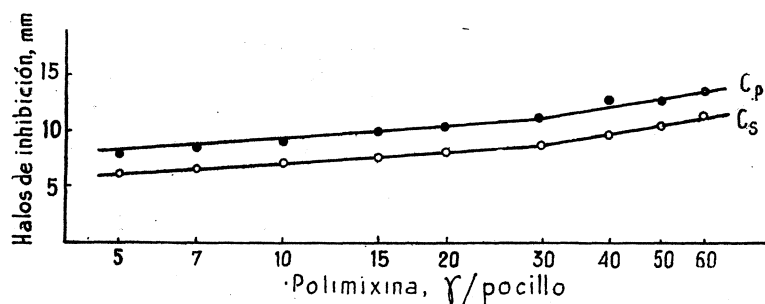


Figura 10

colibacilo, hay paralelismo C_s - C_p para toda la escala, con un punto de inflexión en las 30 γ /pocillo.

En el caso de la *neomicina* (figura 11) para los dos gérmenes y en ambos ensayos, hubo un paralelismo en toda la escala; también en esta sustancia los valores E_s y C_s son superiores a los E_p y C_p , sobre todo en el colibacilo, ya que para el estafilococo son muy próximos, especialmente en las concentraciones más bajas.

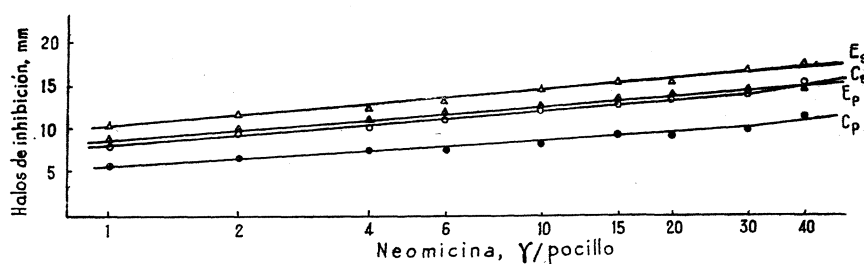


Figura 11

La *novobiocina* (figura 12) es de las que menos se difundieron al actuar sobre un inocuo sembrado en sábana, cuando se trató del estafilococo; y pese a que los valores obtenidos frente al colibacilo no eran utilizables por la escasa dimensión de los halos, pudo comprobarse la existencia entre ellos, lo mismo que en los del estafilococo, de paralelismo entre las líneas de ambos ensayos para la zona de 10-40 γ /pocillo.

También con *oleandomicina* (figura 13) frente al estafilococo, se obtienen valores de E_p mayores que de E_s e igualmente no son utilizables los del colibacilo por su escasa dimensión. Con este antibiótico no es

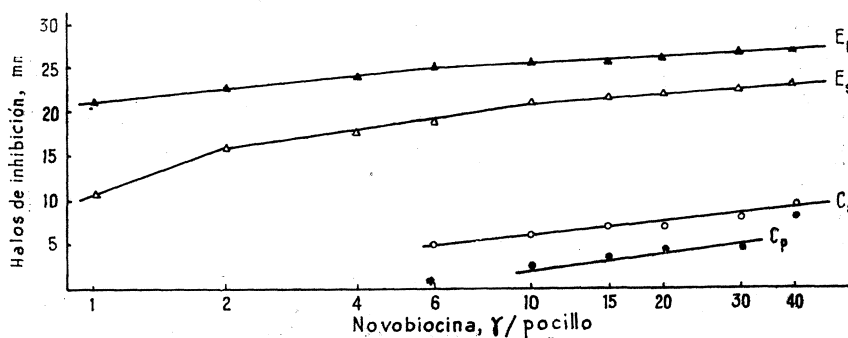


Figura 12

aconsejable practicar las curvas de titulación por siembras del inóculo en sábana, debido a lo desigual de su comportamiento, como se apreció marcadamente frente al estafilococo.

Con la *kanamicina* (figura 14) se caracterizó el ensayo por la poca inclinación de las curvas, obteniéndose valores más altos en superficie que en profundidad, fenómeno que resultó más acusado frente al coli-

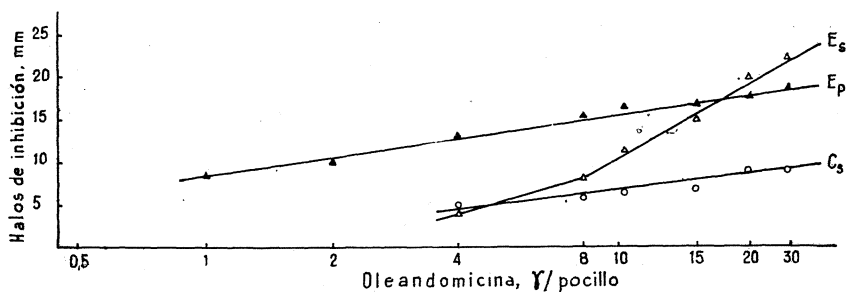


Figura 13

bacilo. Por otra parte, fue posible ver que para el estafilococo había perfecto paralelismo desde 2,5-40 γ /pocillo, con una ligerísima inflexión por la concentración de 20 γ , y este paralelismo alcanzó desde 5-60 γ /pocillo frente al colibacilo.

Y por último, la *ristocetina* (figura 15), no utilizable en experimentos de difusión frente al colibacilo, presenta valores de E_p y E_s casi coincidentes y paralelos en la zona de 5-80 γ /pocillo.

Cuando se trate de asociaciones de antibióticos, es posible utilizar, según expondremos en otro lugar, esta misma técnica, cargando, por

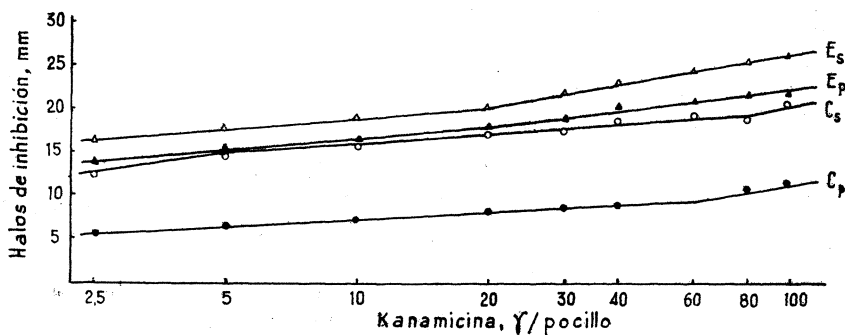


Figura 14

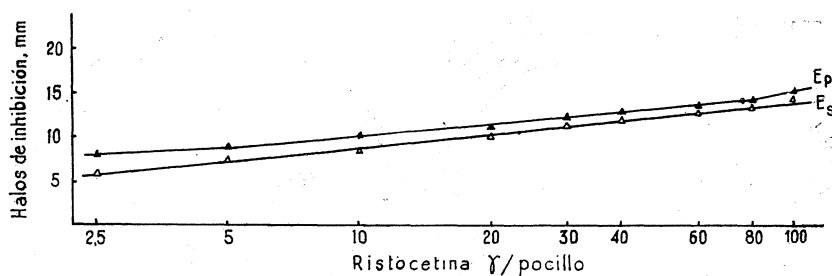


Figura 15

capilaridad, los pocillos con combinaciones de drogas previamente establecidas; ya que nosotros tuvimos ocasión de comprobar que no existían interacciones de tipo químico entre los distintos pares de drogas mantenidas en el frigorífico. Los resultados en este caso vendrán también dados en función del halo de inhibición.

Si se pretenden conseguir datos más particulares de la difusión y actividad de las asociaciones antibióticas, sin dejar de observar al mismo tiempo las características de difusión de las sustancias aisladas, se pueden emplear tiras de papel impregnado en antibiótico, disponiendo las próximas en forma de cuadrado, según técnica de Elek y cols. (10-11), valorando en función de las imágenes de inhibición que se forman en las bisectrices de los ángulos donde lógicamente han de coincidir ambas sustancias al difundirse.

Nosotros, por otra parte, basándonos en los trabajos de Elek y cols. (11-12) y Patte y cols. (33), y dado que en la experiencia anterior, si bien se puede detectar sinergia, antagonismo o indiferencia entre dos bacteriostáticos, no es posible sin embargo valorar bien la variabilidad de estos efectos según las variaciones entre las concentraciones relativas de estas sustancias, pretendiendo establecer una técnica para estudiar los fenómenos de difusión de las asociaciones antibióticas cuando ambas sustancias tienen un origen distinto, aunque vecino, de tal modo que las imágenes de inhibición que se produzcan puedan representarse según el *esquema A* (figura 16).

De este modo, se reducen las interacciones de tipo químico, si es que existieran, en el período de incubación entre ambas sustancias y la mutua influencia en lo que pudiéramos considerar parte física del fenómeno,

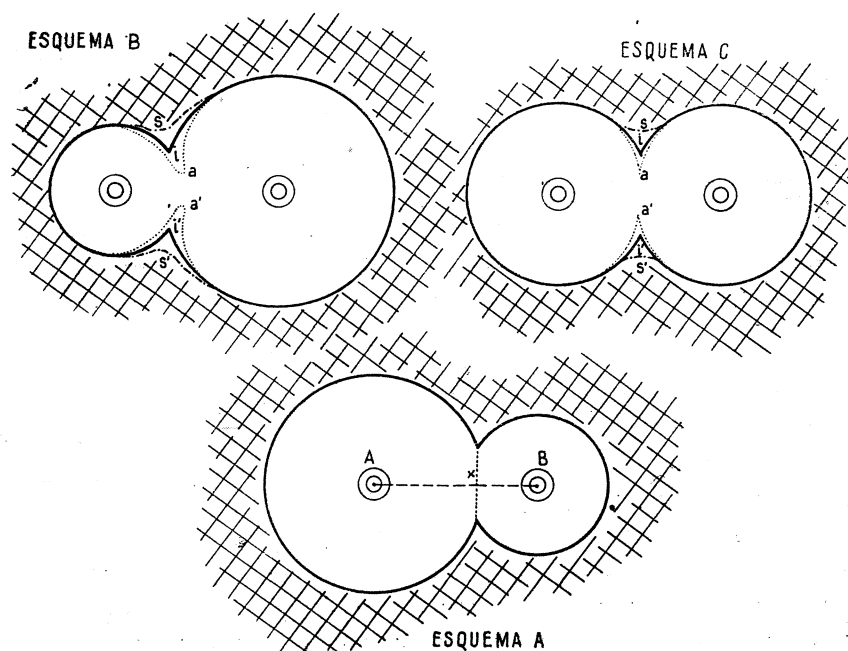


Figura 16

evitando que antibióticos polipeptídicos o macromoleculares de lenta difusibilidad retarden la de otros más rápidos; o que los más rápidos, pero menos activos, actúen de vehículo de otros de características opuestas, sobre todo cuando hay desproporción entre las concentraciones relativas de ambos.

Entonces, la hipótesis de nuestro método se basó en medir el comportamiento en función del segmento x , que será, para una distancia AB constante, de longitud proporcional a la potencia de la asociación, según puede verse en los *esquemas B-C* (figura 16).

Anteriormente, hemos sentido la premisa de que la distancia AB había de ser constante, pero hemos de advertir, además, que fue preciso determinarla para cada par de antibióticos colocados en pocillos vecinos, mediante la fórmula

$$d = R + r - ss'$$

en la que R y r son los radios de los halos de inhibición y ss' la distancia de superposición de ambas circunferencias teóricas, y que nosotros

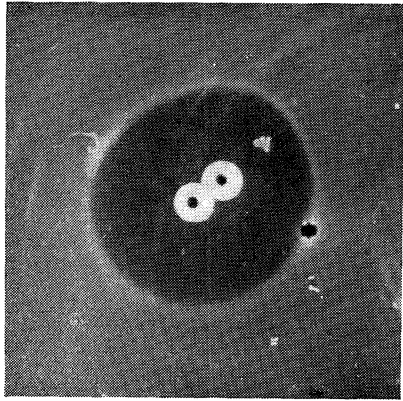


Figura 17

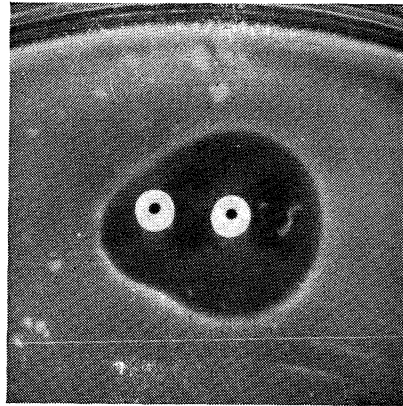


Figura 18

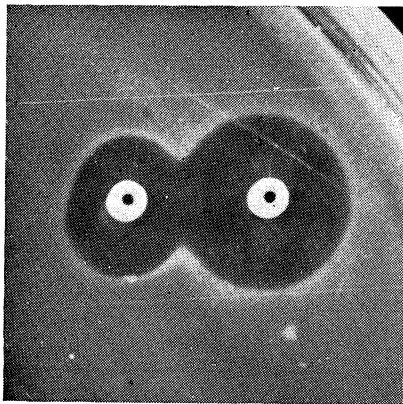


Figura 19

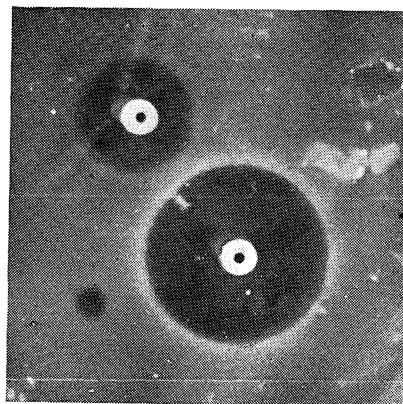
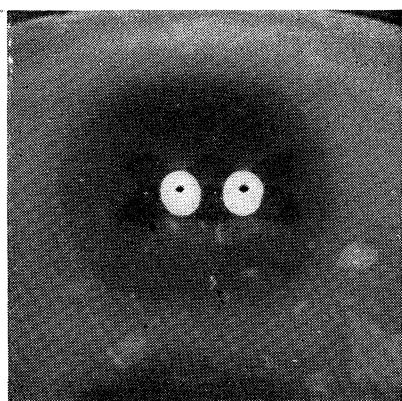
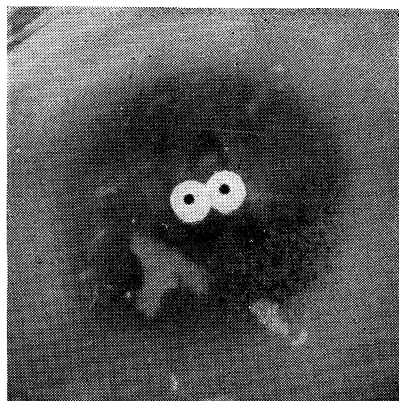
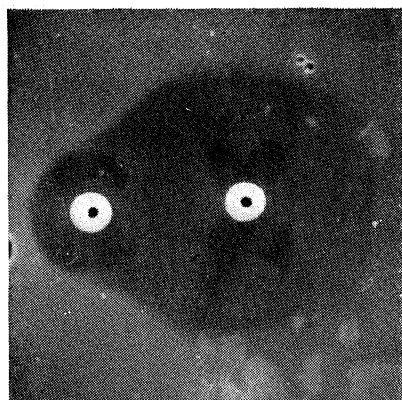
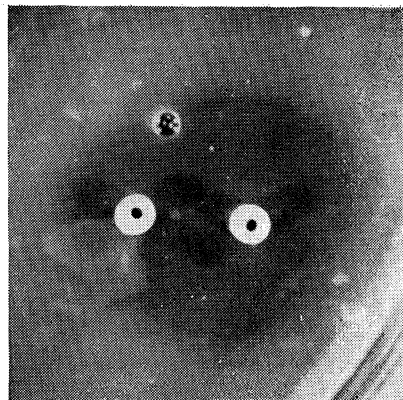


Figura 20

*Figura 21**Figura 22**Figura 23**Figura 24*

estimamos en 4 mm por juzgarla suficiente zona de contacto. Todo ello para evitar variaciones, de las que hablan elocuentemente las dos series de fotografías, en las que dentro de dos mismas asociaciones (cloranfenicol + estreptomicina frente a colibacilo (*figuras 17-20*) y penicilina + eritromicina frente a estafilacocos (*figuras 21-24*), se observan imágenes distintas de acuerdo con las distancias entre pocillos y los halos de inhibición correspondientes a los antibióticos aislados.

Por otra parte, si bien los distintos comportamientos de cada asociación se pudieron calificar por la imagen de inhibición obtenida, también se logró calcular matemáticamente de modo teórico el valor del segmento x , mediante la fórmula

$$x = \frac{l}{2d} \sqrt{[(R+d)^2 - r^2][r^2 - (R-d)^2]}$$

para cada asociación en el caso de que hubiera indiferencia.

Los resultados permitirán definir, en función de x , si en el comportamiento frente a la bacteria hubo antagonismo, sinergismo o indiferencia, según que el valor experimental de x sea menor, mayor o muy próximo al calculado teóricamente.

Detección de la actividad bactericida

Hemos aceptado que los métodos de difusión, por su aplicación de rutina, son de una particular ayuda para la Clínica, pero sin dar un valor rigurosamente cuantitativo a los diámetros de inhibición con vistas a establecer una clasificación adecuada y de correspondencia exacta entre la Clínica y el Laboratorio, como se logra con las pruebas sobre medio líquido, porque aquí la observación de la actividad potencial antibacteriana está subordinada a la difusibilidad del antibiótico; ahora bien, si esta inhibición es producida por una acción bactericida mas que bacteriostática, entonces podemos tener la seguridad de la eficacia *in vivo* de esta asociación, señalada como activa *in vitro*.

Los halos o imágenes de inhibición obtenidos detectan una falta de desarrollo bacteriano, que puede producirse por un efecto bacteriostático o bactericida y que sería muy útil diferenciar; ya que, en el primer caso, en las zonas de inhibición existirán gérmenes supervivientes susceptibles de crecer, si fuese posible eliminar de su medio de cultivo el antibiótico, o lo que es más fácil, transportarlos a ellos a un medio exen-

to de estas sustancias. De este modo, es posible conocer si la asociación antibiótica mata al germen o solamente detiene su crecimiento por un período más o menos largo.

De este problema se han ocupado Elek y cols. (11-12), valiéndose del artificio de un tampón de tela especial que imprimían sobre la placa-ensayo de antibióticos y transportaban los gérmenes adheridos a otra exenta de antibióticos, que denominaban "réplica" de la primera; posteriormente, Chabbert (8-9), critica las técnicas de este tipo y propone la suya de cultivo de gérmenes sobre una película de celofán adaptada a la superficie de un medio de agar con antibióticos difundidos, y después trasplanta esta película a otro medio exento de antibióticos, donde después de un nuevo período de incubación es posible observar si hay nuevos crecimientos bacterianos que modifiquen las imágenes de inhibición en un principio obtenidas.

Sugestionados por los razonamientos y resultados obtenidos por este último investigador, hemos aplicado el mismo fundamento a nuestras técnicas, fabricándonos unos bastidores rectangulares de latón, sobre los que adaptamos el papel de celofán, pero el desarrollo de la técnica nos demostró que para placas del tamaño y forma que nosotros utilizamos no es muy aplicable el método por dificultades de tipo mecánico, para una buena adaptación del papel al medio, y por tanto los resultados obtenidos en esta experiencia son irregulares y no aprovechables para nuestros propósitos.

Posibilidades de acelerar la obtención de los resultados

Si dentro de las características de difusión antes fijadas, logramos aumentar la rapidez en la consecución de resultados, sin disminuir la sensibilidad o exactitud del método, habríamos conseguido un éxito al facilitar la más pronta intervención de la Antibioterapia combinada; por tanto, siguiendo técnicas similares a las de Pital y cols. (35), Lorian (288), y Bass y cols. (1-3), modificamos de modo parcial las condiciones experimentales fijadas precedentemente, con el propósito de hacer actuar en el medio de ensayo, algunas sustancias que sirvieran de "reveladoras" del crecimiento microbiano.

Antecedentes acerca de las condiciones de cultivo y sus relaciones con variaciones en el potencial de óxidorreducción, se encuentran en la demostración de Lepper y Martín sobre la influencia de ácidos grasos

no saturados y compuestos hemáticos para los efectos reductores de los cultivos, y en los trabajos de Hewitt (19-22), para comprobar la presencia del suero interfiere el descenso del Eh y que concentraciones de 1 por ciento de glucosa en el medio pueden modificar la gráfica de los potenciales de electrodo, provocando un descenso, seguido, a las cinco horas de cultivo, de un rápido incremento, al que sucede una ligera caída y después un ascenso gradual. Métodos rápidos son citados por Goyan y cols. (17) y Sippel y Godwin (41) entre otros, pero mientras que algunos no son aconsejables como métodos de rutina, otros son específicos tan sólo para determinados gérmenes.

Parece ser que las características de un indicador ideal de esta clase, han de ser: a) llegar a reducirse a una concentración de Eh apropiada; b) poseer un color distinguible que evite confusiones con el color natural del sistema que se estudia, y lo suficientemente intenso para poder emplearlo a muy bajas concentraciones; c) no sufrir cambios de color por modificaciones del pH, y d) carecer de participación directa en el sistema empleado, por ausencia de acciones catalíticas de oxidación biológica, de efectos tóxicos sobre las células bacterianas y de combinaciones con otros componentes del medio o antibióticos.

Pese a algunos ensayos de orientación con algunos indicadores (hematíes lacados, azul de toluidina y tionina) estas experiencias las hemos efectuado de un modo definitivo con diclorofenol-indofenol y resazurina, incorporados a los medios de cultivo.

La marcha del trabajo se puede resumir diciendo que son pruebas de óxidorreducción microbiana efectuadas sobre medio sólido en placas de 7 cm de diámetro, en los que se sembraba el germen y colocaban dos pocillos con asociaciones antibióticas eficaces, según técnica habitual, para ver cómo se formaban y destacaban los halos de inhibición. El medio de siembra empleado fue el mismo de siempre, pero con 0,75 por ciento de glucosa y a pH 7; y los colorantes se prepararon en diluciones fosfáticas de Sørensen, al 0,15 por ciento y pH 7,3 para el indofenol, y con 0,06 mg por ciento de indicador y pH 7 para la resazurina.

En estas condiciones se hicieron una serie de experimentos previos:

Sobre capas de siembra de ± 5 mm y otras veces de ± 2 mm	{ con estafilococo	{ en presencia de solución de diclorofenol-indofenol	{	al 2,5 % en el medio
				al 5 %
				al 7,5 %
				al 10 %
{ y con colibacilo	{ en presencia de solución de resazurina	{	{	

y cada uno de los 32 tipos de ensayo se incubó a diferentes temperaturas (32, 37 y 40 °C) con un total de 96 pruebas de orientación.

De los resultados obtenidos en este grupo de ensayos, se pudo deducir: a) que funcionó mejor la resazurina, produciendo halos de color vívido sobre superficie amarilla, que resaltaron más que los de dicloro-fenol-indofenol (azul pálido sobre superficie amarilla); b) que haciendo las lecturas cada hora, desde dos-veinte horas, se vio que no eran perfectamente homologables los resultados; c) que en capa fina se obtuvieron éstos más lentamente; d) que la temperatura influyó favorablemente en el proceso de reducción del indicador, anotándose mejores lecturas en los ensayos a 40° C.; e) que la concentración al 7,5 por ciento de indicador es la que fue mejor para los dos gérmenes, porque con las de 2,5 y 5 por ciento, buenas para el estafilococo, seguían un proceso anormal y brusco con el colibacilo, y cuando se usó el indicador al 10 por ciento no se observaron bien los virajes porque —sobre todo el estafilococo— no redujo totalmente al colorante y por tanto hubo colores no bien definidos. Para concluir, los resultados óptimos se obtuvieron en los ensayos a 37 y 40 °C con 7,5 por ciento de la solución colorante en el medio, especialmente para la resazurina.

A la vista de estas conclusiones previas se planteó otro ensayo en el que se dispusieron, sobre las placas rectangulares montadas con ambos medios según es habitual, 16 pocillos para cada una de las asociaciones: penicilina + eritromicina, dihidroestreptomicina + cloromicina, terramicina + polimixina, y tetraciclina + kanamicina. Combinaciones antibióticas éstas, que fueron de calificada actividad sinérgica y muy útiles para estudios de este tipo.

Los resultados obtenidos se resumen en el *cuadro 1*, comparándolos con los obtenidos paralelamente por el método habitual sin colorante.

Estudio de la aparición de resistencias

Puede realizarse mediante pruebas de dilución en placa. Estas técnicas tienen su fundamento en la preparación de una serie de cultivos en placa sobre medio sólido con dilución seriada del agente antibiótico (14, 22). La superficie de la placa puede dividirse a veces en sectores, para hacer pruebas comparativas con distintos inóculos, al mismo tiempo que se deja una zona sin sembrar como testigo del medio. Según nuestra opinión, el punto final de inhibición completa quedará definido con la más

Cuadro 1. Comparación de las determinaciones de sensibilidad por el método rápido (resazurina) y el habitual, usando cepa de *Staphilococcus aureus* (Oxford)

Penicilina + eritromicina				Dihidroestreptomicina + clo ranfenicol				Tetraciclina + kanamicina				Oxitetraciclina + polimaxina			
Concentración U. I. γ /po. (a)	M. ráp. (b)		M. hab. (c)	Concentración γ /po.	M. ráp.		M. hab.	Concentración γ /po.	M. ráp.		M. hab.	Concentración γ /po.	M. ráp.		M. hab.
	6 h	18 h			6 h	18 h			6 h	18 h			6 h	18 h	
4 + 12,50	40	38	35	40 + 15	32	24	21	15 + 40	27	20	19	15 + 25	27	25	24
4 + 7,50	35	33	35	40 + 5	30	19	18	15 + 20	27	21	20	15 + 15	28	24	26
4 + 2,50	35	28	36	40 + 2	30	18	17	15 + 5	28	21	20	15 + 7,50	29	23	25
4 + 0,75	28	27	35	40 + 0,50	30	20	21	15 + 1,25	25	20	19	15 + 2,50	26	23	25
2 + 12,50	41	38	37	20 + 15	25	23	17	5 + 40	25	23	22	5 + 25	26	25	22
2 + 7,50	37	33	35	20 + 5	25	18	16	5 + 20	25	21	20	5 + 15	26	20	21
2 + 2,50	29	29	35	20 + 2	26	17	15	5 + 5	±	20	18	5 + 7,50	±	23	21
2 + 0,75	—	25	34	20 + 0,50	—	20	24	5 + 1,25	—	18	17	5 + 2,50	—	22	23
0,50 + 12,50	25	21	29	5 + 15	24	17	20	2 + 40	22	16	19	2 + 25	25	18	21
0,50 + 7,50	19	23	30	5 + 5	24	15	13	2 + 20	20	17	18	2 + 15	25	19	21
0,50 + 2,50	20	18	31	5 + 2	—	13	10	2 + 5	14	12	14	2 + 7,50	20	19	21
0,50 + 0,75	—	19	30	5 + 0,50	—	19	23	2 + 1,25	18	13	15	2 + 2,50	25	18	21
0,12 + 12,50	29	25	28	1,25 + 15	28	23	29	0,50 + 40	±	19	20	0,50 + 25	±	21	18
0,12 + 7,50	—	24	26	1,25 + 5	—	18	13	0,50 + 20	—	18	19	0,50 + 15	±	16	19
0,12 + 2,50	±	24	27	1,25 + 2	—	19	14	0,50 + 5	—	16	17	0,50 + 7,50	—	14	18
0,12 + 0,75	—	16	28	1,25 + 0,50	—	13	15	0,50 + 1,25	—	11	16	0,50 + 2,50	—	12	17

(a) Pocillo.

(b) Método rápido.

(c) Método habitual.

pequeña concentración final de antibiótico sobre el que no se apreció crecimiento después de veinticuatro horas; y el punto final de inhibición parcial se considerará a la concentración final de antibiótico para la que existan finas colonias puntiformes a las cuarenta y ocho horas o solamente escasas colonias aisladas.

Según hemos comprobado por pruebas efectuadas en otras ocasiones y por los datos de algunos autores, escasas veces existió concordancia entre las titulaciones de antibióticos por dilución en medios sólido y líquido; lo más frecuente es que las concentraciones inhibidoras para las técnicas en líquido fueran inferiores —incluso llegando a la mitad— que en la primera de ellas; hecho lógico si se tiene en cuenta que sobre medio líquido los gérmenes han de padecer más intensamente la acción del antibiótico. Así, de acuerdo con Northrop (32) y Treffers (46), utilizamos en ocasiones las pruebas de dilución en placa tan sólo para investigar “razones de mutación” en la aparición de resistencias, ya que en estas pruebas no se trata de valorar la aparición de resistencias en un simple tubo, sino, estadísticamente, en un gran conjunto de gérmenes en idénticas condiciones. Por estos datos pudimos calcular la razón actual de mutación para una cepa bacteriana y antibiótico determinados (29). Propósitos similares guiaron a Gourevitch y cols. (16) al estudiar en penicilina, estreptomycin y kanamicina el fenómeno por ellos definido como de colonias residuales (*tailing*), utilizándolo como indicador de capacidad de formación de células resistentes: parece ser que este fenómeno no se logra con antibióticos bacteriostáticos, ya que es difícil encontrar una concentración a la que desaparezcan los cultivos confluentes para dar lugar a las colonias aisladas.

Nosotros empleamos la técnica del siguiente modo: a) preparación de una serie de 8 placas con medio habitual, sin suero, adicionado de concentraciones crecientes de antibiótico, de acuerdo con los protocolos de trabajo correspondientes; b) sucesiva resiembra en sábana de 0,1 por ciento del inóculo constituido por suspensiones bacterianas con 10^8 gérmenes/cm³; y c), por otra parte, se realizan siembras, también en sábana y a igualdad de volumen (0,1 cm³), de diluciones al 1,10 del inóculo en medio exento de antibiótico, con el fin de disponer de una escala de crecimientos con la que sea posible establecer comparación. Los resultados obtenidos en pruebas de este tipo dieron idea de lo aplicable de nuestro *modus operandi* a la investigación de antibióticorresistencias.

TECNICAS SOBRE MEDIO LIQUIDO

Determinación de concentraciones mínimas inhibidoras

Para su realización se acude a la técnica de dilución en tubo, clásicamente descrita por Grove y Randall (18) en su "Manual de Laboratorio"; es la más utilizada con propósitos de investigación, debido a que facilita los datos precisos traducibles en C. M. I. (*), permitiendo a su vez orientaciones más exactas en Terapéutica y Estadística microbiológica, aunque el procedimiento sea más largo y delicado y necesite mayor volumen de material. Muy importante también es que en una segunda fase del procedimiento, por resiembras en medio sólido, es posible establecer diferencias entre las actividades bacteriostática y bactericida.

Muchos investigadores utilizan técnicas de este tipo para el estudio de asociaciones antibióticas (25-26, 44) y aunque el fundamento es siempre el mismo puede haber variaciones en las características del inóculo, naturaleza y cantidad del medio, o lo que es más importante, en la lectura de resultados: así, Nichols (31) lo hace en dosis mínimas inhibidoras, Jawetz y cols. (25-26) lo hacen por recuento de bacterias viables en placa, pero variando en los períodos de sus cultivos según los casos; Bigger (5) emite sus juicios por observación visual de la turbidez o de las estrias de los subcultivos, dando una notación por cruces, mientras que Martín y cols. (30) lo hacen por comparación de la densidad del cultivo superviviente con el aspecto de cuatro diluciones distintas del inóculo.

Cuando estos métodos se aplican al estudio de las variaciones de la concentración antibiótica, según que los antibióticos estén aislados o asociados puede seguirse la pauta dada por Welch y cols. (47) de determinar la C. M. I. frente a las drogas aisladas y después de conocido este dato preparar soluciones antibióticas que contienen esta concentración multiplicada por 16, asociarlas a volúmenes iguales y determinar la nueva concentración inhibidora de ambas sustancias para seguidamente aplicar la fórmula $a/A + b/B$ que puede ser igual, mayor o menor que 1, según que haya indiferencia, sinergismo o antagonismo. Nosotros, para una

(*) Concentración mínima inhibidora.

exacta titulación de las variaciones de antibiótico-sensibilidad, en estos casos, aplicamos un método personal ya utilizado con muy buenos resultados en la determinación de niveles antibióticos en líquidos orgánicos (38) y que permite realizar la determinación en dieciséis-dieciocho horas.

Según esta técnica, preparamos tres series de ensayos sobre tubos de hemólisis estériles, con 0,5 cm³ del medio líquido de Schmidt y Moyer (39) con 0,85 por ciento de sales; en ellas se establecen, partiendo de volúmenes de 0,5 cm³, las tres escalas de dilución al duplo de dos antibióticos aislados y de su asociación a partes iguales, a partir de concentraciones que se suponen superiores a las de inhibición que se calculan; después se añade a cada tubo 0,5 cm³ de medio que contiene el germen de prueba (procedente de un cultivo de veinte horas en caldo) diluido a 10⁻⁵ y 1 por ciento de solución indicadora de resazurina. Al cabo de veinticuatro horas se determina por la variación de color las C. M. I. de cada serie, pudiendo fijar matemáticamente la actividad de la asociación.

Titulación de las concentraciones más eficaces de una asociación antibiótica

Una de las aplicaciones posibles al método sobre medio líquido, es la valoración cuantitativa de la eficacia de una asociación sinérgica, comparando los resultados obtenidos con cada uno de los componentes del par de antibióticos a estudiar y los correspondientes a las distintas asociaciones producidas por combinación de las escalas de dilución de los dos antimicrobianos, de tal suerte que cada concentración de un componente se encuentre asociada con cada una de las concentraciones del otro y viceversa, mediante una disposición en cuadrado (5, 8-9). Asimismo, de modo análogo —aunque con las oportunas variaciones de protocolo— nosotros hemos podido estudiar las variaciones en el modo de acción según el momento de intervención de ambas sustancias o condiciones del inóculo (concentración o fase de desarrollo de los gérmenes).

En todos estos métodos sobre medio líquido, cuando no se utilizan indicadores coloreados, la apreciación visual aplicable para uso en Clínica no es absolutamente recomendable para propósitos de investigación, por lo que en ocasiones son útiles otros procedimientos de medida: *nefelométrico*, para diagnóstico de la bacteriostasia y bacteriólisis con determinación de dosis o combinaciones que inhiben al 50 por ciento el desarrollo

bacteriano (34); *recuento de células viables en placa o determinación del porcentaje de supervivencia* por apreciación visual, comparando con diluciones seriadas del inóculo para determinación del poder bactericida. Las medidas electrofotométricas (24) son las de mayor exactitud, permitiendo estudiar las curvas de crecimiento del germen, en tanto que las de comparación visual del desarrollo, con los obtenidos a partir de las diluciones del inóculo, sólo sirven para dar una idea de la existencia de acción bactericida, dentro de ciertos límites y con un error del 10 por ciento; ya que comprobando en el recuento final de los gérmenes viables que pudieron encontrarse en un mismo experimento, existían diferencias del doble o triple, por lo que solamente fue útil considerar diferencias significativas del orden de logaritmo 1,0 (10 veces más) o más grandes.

Determinación simultánea del comportamiento de los gérmenes frente a los antibióticos aislados y sus asociaciones binarias

Con análogo fundamento y con el mismo planteamiento de asociación que en otro trabajo mediante técnica de difusión (42), aunque ampliado a las trece sustancias antibióticas de este estudio, establecimos un método para determinación del antibiograma de un germen sobre medio líquido frente a dos diluciones distintas de cada asociación binaria y de cada antibiótico aislado.

Del material para esta prueba podemos decir que hemos encargado especialmente tubos aforados a 5 cm³ con el fin de evitar errores por diferencias de dilución debidas al medio de cultivo. Los 98 tubos de cada prueba se dispusieron sobre gradillas de capacidad conveniente.

Las lecturas a las veinticuatro horas se hicieron mediante un nefelómetro E. E. L. (Evans Electroselenium Ltd.) de 220 V.

Los medios de cultivo fueron dos: a) el medio líquido de Schmidt y Moyer (39), anteriormente citado, utilizado para someter los gérmenes a la acción de los antibióticos, o sea, para el antibiograma propiamente dicho; y b) el medio sólido empleado como capa de siembra en las experiencias de difusión, al cual se añadió, en algunas ocasiones, 1 por ciento de solución de resazurina al 0,05 por ciento para mejor detectar el desarrollo de colonias puntiformes y que sirvió para comprobar la presencia o ausencia de acción bactericida a las veinticuatro y setenta y dos horas de contacto con el antibiótico.

Como inóculos se usaron cantidades de 0,1 cm³ de suspensiones con $\pm 6 \times 10^8$ gérmenes/cm³ procedentes de un cultivo de dieciochoveinte horas en caldo, excepto en casos especiales en que se utilizaron cultivos de más o menos tiempo correspondientes a las distintas fases de los crecimientos microbianos. Hemos de añadir que empleamos el inóculo "a pequeño volumen" en relación con el medio de ensayo, y no a volúmenes iguales según aconsejan algunos autores, con el fin de evitar posibles influencias de sustancias originadas catabólicamente, o metabolitos antagónicos existentes en el líquido de cultivo que se había de inocular.

Los agentes antibióticos fueron los mismos y en idéntica disposición combinada que para nuestras pruebas de difusión sobre medio sólido, aunque en este caso fueron distintas las concentraciones que intervinieron y que según algunos autores deben ser aproximadamente 10 veces menores que las utilizadas en medio sólido. Para la selección de estas dosis —de un modo provisional— tuvimos en cuenta varios factores: a) que habían de actuar sobre stirpes microbianas de elevada resistencia; b) que no nos interesaba determinar el grado de sensibilidad, sino la eficacia en relación con las concentraciones hemáticas posibles al alcanzar por los distintos agentes terapéuticos, ya que en caso de ser muy marcada o múltiple se acudiría a un criterio de mínima toxicidad para la elección del tratamiento; c) las dosis más frecuentes a las que son sensibles la mayoría de las cepas; d) las concentraciones hemáticas que es posible alcanzar con los distintos agentes antibióticos; e) las clasificaciones que para las pruebas de inhibición por el método de diluciones en caldo, dan algunos autores, basándose en datos de concentración mínima inhibidora; y f) las dosis seleccionadas para los pocillos, previos ensayos de difusión. Todo ello queda resumido en el *cuadro 2*.

Es obvio advertir que posiblemente los datos anteriormente citados sean rebasados: los de las concentraciones hemáticas, por avances en el campo de la Farmacología, y los de sensibilidad, por variaciones producidas por la resistencia evolutiva. Variaciones ambas que en el futuro pueden dar origen a modificaciones del criterio para las escalas de clasificación de sensibilidad y para el establecimiento de dosis en este antibiograma, aunque sin modificar el *modus operandi*.

La marcha seguida para determinación de antibiogramas según nuestro método, consiste en disponer en condiciones estériles, de 3 series de 98 tubos de ensayo aforados con 5 cm³ de medio líquido y exceptuando los

Cuadro 2

Antibióticos	Dosis eficaces más frecuen- tes para cepas susceptibles γ/cm^3	Concs. hemá- ticas alcanza- das en trata- mientos habi- tuales γ/cm^3	Clasificación de las cepas por algunos autores, según su C. M. I. (a) γ/cm^3					Concs. em- pleadas en las pruebas de difusión $\gamma/\text{pocillo}$	Dosis a utili- zar que se proponen pa- ra medio lí- quido γ/cm^3
			M. s. (b)	S. (c)	Mo. s. (d)	L. S. (e)	R. (f)		
Penicilina	0,01- 3	0,12- 4	0,1	0,1- 0,5	0,5- 1	1- 10	10	4 - 2	4- 2- 1
Dihidroestreptomicina	0,25-25	5 -40	1	1 - 5	5 -10	20- 20	20	40 - 4	20-10- 5
Cloranfenicol	1 - 5	0,50-14	1	5 -15	15 -25	25- 50	50	15 - 5	16- 8- 4
Tetraciclina	0,30- 4	0,25- 5	1	1 - 5	5 -10	10- 20	20	15 - 5	12- 6- 3
Clorotetraciclina	0,01- 3	0,25-18	1	1 - 5	5 -10	10- 20	20	15 - 5	12- 6- 3
Oxitetraciclina	0,08- 3	0,40- 6	1	1 - 5	5 -10	10- 20	20	15 - 5	12- 6- 3
Eritromicina	0,04- 2	0,50-50	1	1 - 2		2- 5	5	10 - 5	6- 3- 1,5
Polimixina B	0,50- 5	2 - 5	1	1 - 2,5	2,5- 5	5- 10	10	2 -10	10- 5-25
Neomicina	0,30- 8	1 -20	1	1 - 5	5 -10	10- 20	20	15 - 5	6- 3- 1,5
Novobiocina	0,50-10	2,80-60	5	5 -15	15 -25	25- 50	50	15 - 5	6- 3- 1,5
Oleandomicina	0,30- 4,5	0,25- 5	0,1	0,1- 0,5	0,5- 1	1- 10	10	7,5- 2,5	4- 2- 1
Kanamicina	0,25- 6	1,30-50	2	2 -10	10 -50	50-100	100	40 - 8	24-12- 6
Ristocetina	0,40- 8	3,70-60	2	2 -10	10 -50	50-100	100	30 - 6	20-10- 5

(a) Concentración mínima inhibidora.

(b) Muy sensible.

(c) Sensible.

(d) Moderadamente sensible

(e) Ligeramente sensible.

(f) Resistente.

dos por serie, que se emplearán como testigos, añadir a cada tubo 1 cm³ de medio líquido que lleva diluido el antibiótico o combinación de ellos en la concentración que corresponda, y después se siembra en cada uno de los 98 + 1, por serie, 0,1 cm³ del inóculo recientemente preparado. Luego de veinte-veintidós horas de cultivo a 37 °C se hacen las lecturas nefelométricas del desarrollo existente en cada tubo y de 10 diluciones seriadas del testigo sin antibiótico, que se preparan en ese momento.

De este modo, tendremos una idea bastante exacta del grado de bacteriostasia del agente antibiótico y en una segunda fase, por siembra de cada uno de los tubos donde el crecimiento sea casi nulo (incluyendo las diluciones del testigo) un asa de 2 mm. en medio sólido al cabo de veinticuatro, cuarenta y ocho o setenta y dos horas con los antibióticos —o bien por más tiempo, si se desea ampliar el período de observación de bacteriostasia— con lo que tendremos una valoración activa de la actividad bactericida.

Ensayado este método personal con gran número de cepas bacterianas procedentes de productos patológicos, se obtuvieron resultados que se expondrán oportunamente de manera gráfica para obtener en visión rápida un concepto claro de su comportamiento frente a los antibióticos y asociaciones que se estudian. Por otra parte, hemos tenido la oportunidad de comprobar la utilidad y aplicación de la técnica a propósitos clínicos y de investigación, sobre todo para trabajos estadísticos de variaciones de sensibilidad.

Titulación del desarrollo de resistencias a los antibióticos

Con fundamento análogo al de las diluciones seriadas en tubo para la determinación de la C. M. I., pero con valoraciones sucesivas a intervalos variables y utilizando como inóculo suspensiones de los gérmenes bien desarrollados en la dosis límites del ensayo precedente, según Gourevitch y cols. (16) se puede estudiar el desarrollo de las antibiótico-resistencias.

Nosotros, en algunas ocasiones, hemos realizado las resiembras siguiendo dos ensayos paralelos a distintos intervalos de contacto (cada veinticuatro y cada setenta y dos horas) para ver las diferencias en la progresión de la resistencia; es posible afirmar acerca de la correcta apli-

cabilidad de la técnica a estos propósitos sobre el medio líquido usual y resembrando cantidades de 0,1 cm³ del cultivo precedente con resistencia ya calculada. De este modo nos fue posible conocer el desarrollo de la antibióticorresistencia en algunas ocasiones.

CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS RESULTADOS

Debido a la índole del trabajo —iniciado con esta publicación—, en el que nos propusimos no sólo examinar la acción y posibilidades de las asociaciones de antibióticos, sino también conocer métodos para su estudio, podemos decir que hemos pasado revista a todas o a la mayoría de las técnicas aplicables a un laboratorio de investigación antibioterápica, aportando incluso modificaciones o métodos personales que permitieran una obtención de resultados más perfecta, sencilla o rápida, según los casos. De sus características y examen crítico damos a continuación, más que algunas consideraciones particulares de cada método, un cuadro general comparativo de las distintas técnicas que aquí hemos examinado, resumiendo los datos de modo tabulado para mayor facilidad (*cuadro 3*).

En cuanto a la difusión de los antibióticos sobre medio sólido, hemos tenido ocasión de comprobar que utilizando el procedimiento de dos capas es posible obtener resultados más homologables, siempre y cuando no se trabaje con capas superiores a 2 mm de espesor.

Por otra parte, este método permite mejor el empleo de indicadores de óxidoreducción para la consecución de mayor rapidez en los resultados, ya que aunque no deba ser utilizado en el estudio de comportamientos de las asociaciones antibióticas tiene sin embargo —eligiendo convenientemente condiciones normalizadas— una buena aplicación en las determinaciones cuantitativas rápidas de antibióticos con comparación con los halos producidos con concentraciones patrón previamente establecidas.

La investigación de actividad bactericida sobre medio sólido por transporte de la superficie de cultivo sobre celofán, pese a ser una ingeniosa técnica de excelentes resultados, tiene escasa practicabilidad “mecánica” para nuestras placas de latón, por la dificultad de una correcta adaptación de la película de celofán a una superficie tan grande de medio. Dificultades que, por otra parte, hubiéramos intentado vencer si no hubiéramos dispuesto de otros métodos, pero después de emplear las

Cuadro 3. Estudio general comparativo de las técnicas examinadas para conocer el comportamiento bacteriano frente a combinaciones de antibióticos

Datos característicos	Métodos de trabajo			
	Difusión sobre medio sólido	Dilución en placas	Dilución en tubos	Cultivo continuo
<i>Material</i>	Placas rectangulares metálicas de 10 X 30 cm; pocillos; dispositivo para aumentar la precisión de las medidas.	Placas de Petri de 10 cm de diámetro.	Pipetas, tubos de hemólisis, tubos ópticamente neutros aforados para 5 cm ³ y nefelómetro.	Se necesita instalación adecuada con quimostato, matraz nodriza, recipiente esterilizante, etc.
<i>Medios de cultivo</i>	Medios sólidos: uno muy transparente para base y otro muy nutritivo y transparente para capa de siembra.	El mismo medio sólido que se utiliza para capa de siembra en el ensayo anterior.	Medio líquido, nutritivo, limpio y escasamente coloreado.	Dos medios líquidos, uno que sirve de soporte y otro denominado medio limitante.
<i>Gérmenes</i>	No es indispensable aislarlos del producto patológico.	Indispensable el aislamiento cuando se trata de investigación; si es con fines clínicos se puede sembrar directamente el producto patológico.	Es útil hacer aislamiento, aunque se pueden utilizar inóculos mixtos. Cuando se estudian curvas de crecimiento es indispensable aislar el germen.	Imprescindible el aislamiento o conocer las características del cultivo mixto que se ensaya.
<i>Inóculo</i>	Al 2 por ciento de suspensión salina con 6×10^9 gérmenes/cm ³ .	0,1 cm ³ de suspensión, con 10^8 gérmenes/cm ³ .	0,1 cm ³ de suspensión con 6×10^8 gérmenes/cm ³ .	Estudiarle según las condiciones de cada experiencia.

<i>Duración de la prueba</i>	24 h.	24 a 48 h., según el objetivo que se persiga.	48 a 72 h o más, según el período de observación deseado.	Variable.
<i>Expresión de resultados</i>	No da tasa de sensibilidad, sino solamente calificación de sensible, sensibilidad limitada o resistencia.	Sensibilidad en γ/cm^3 o en porcentaje de crecimiento.	C. M. I. en γ/cm^3 y posibilidad de precisar las actividades bacteriostáticas y bacteriadas en número de colonias viables.	Mediante curvas de crecimiento o por recuento de colonias viables.
<i>Precisión</i>	Es el menos preciso. Es necesario estudiar las características de difusión y establecer curvas patrón.	Preciso pero con valores algo superiores al método de dilución en tubo.	Método preciso, permitiendo medidas exactas de C. M. I. Es muy preciso cuando se emplea nefelómetro.	Método preciso para estudiar las condiciones de desarrollo de un germen en circunstancias determinadas.
<i>Valor práctico</i>	Principalmente orientación terapéutica.	Orientación terapéutica y estudios de antibióticorresistencia.	Orientación terapéutica y procedimiento de investigación.	Estudio dinámico de sensibilidad o resistencia a los antibióticos.
<i>Modificaciones posibles</i>	Estudio de la actividad bactericida mediante cultivos sobre celofán y posterior transporte. También aceleración de resultados mediante indicadores redox.	Medición de la densidad del crecimiento por comparación con diluciones seriadas del inóculo.	Lectura nefelométrica de resultados en la primera fase para valorar bacteriostacias del 50 por ciento. Medición de la densidad bactericida en la segunda fase como anteriormente.	Todas las encaminadas asegurarnos la ausencia de contaminaciones accidentales.
<i>Ventajas</i>	Método muy rápido cuando se siembra directamente el producto patológico. No necesita rigurosa asepsia en la manipulación. Puede ser útil para investigar sinergismos de acción bactericida y también cuando se aceleran sus resultados cualitativos.	Permite apreciar cuantitativamente el valor de un antibiótico como inhibidor del crecimiento bacteriano.	Método sencillo y rápido (48 h.) que aprecia cuantitativamente el valor de un antibiótico como bacteriostático y bactericida.	Método de preferencia, que permite estudiar la dinámica de las interacciones germen-antibiótico y aportar datos al mecanismo de acción.

Cuadro 3

Datos característicos	Métodos de trabajo			
	Difusión sobre medio sólido	Dilución en placas	Dilución en tubos	Cultivo continuo
<i>Inconvenientes</i>	Necesidad de fondo plano. Dificultad de fijar el grado de desecación. Poca precisión cuantitativa. No recomendable para asociaciones antibióticas. Según las modificaciones es procedimiento que requiere precauciones en la difusión previa de antibióticos y en el reparto del inóculo, así como también errores por interacción con indicadores coloreados.	Necesidad de manipular asépticamente y de asegurarse que el inóculo se ha repartido uniformemente por toda la superficie.	Necesidad de preparación cuidadosa del inóculo y de manipulación rigurosamente estéril. Repetir lecturas a intervalos regulares durante todo el experimento cuando se estudian curvas de crecimiento.	Método muy complicado y con gran lujo de instalación. Dificultades para lograr su funcionamiento en completa esterilidad, sin contaminaciones accidentales.
<i>Cometidos que se asignaron a las diferentes técnicas</i>	Determinación rápida de antibiogramas como prueba previa para detectar sinergismos, actividades bactericidas y aparición de mutantes resistentes, al mismo tiempo que se comparan sus resultados con los obtenidos sobre medio líquido para el mismo fin.	Determinación de la razón de mutación en resistencias y estudio del efecto de colonias residuales.	Valoración exacta del antibiograma y comparación con los resultados para medio sólido. Estudio simultáneo de todas las asociaciones valorando sus actividades bacteriostática y bactericida.	Intento de establecer una técnica para regular, de modo dinámico, la acción de las combinaciones de antibióticos.

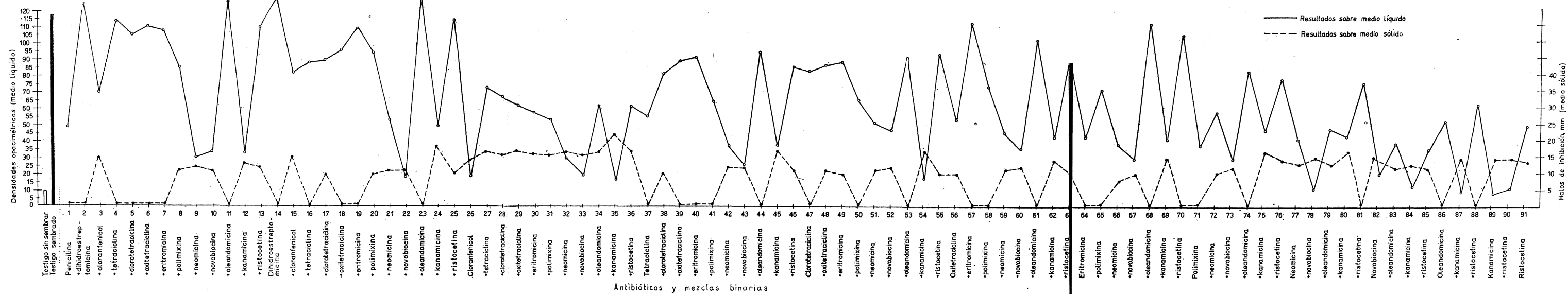


Figura 25. Estudio comparativo de los antibiogramas sobre medios sólido y líquido para cepas del género Streptococcus

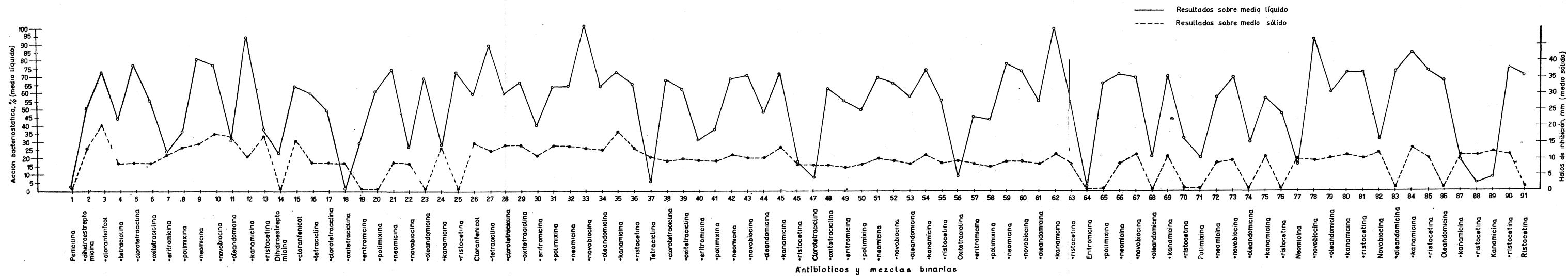


Figura 26. Estudio comparativo de los antibiogramas sobre medios sólido y líquido para cepas del género Proteus

técnicas sobre medio líquido preferimos emplear estas últimas por sus excelentes resultados fácilmente reproducibles.

Al comparar con este estudio de asociaciones binarias de antibióticos los resultados obtenidos sobre medios sólido y líquido, pensamos en la ventaja de los segundos, como se patentizó sobre todo para la determinación de antibiogramas, según puede verse en las *figuras 25-26*.

Si la comparación se establece entre grado de opacidad y halo de inhibición, las representaciones serán encontradas, mientras que si se comparan porcentajes de bacteriostasia y diámetros de inhibición las curvas serán paralelas para efectos semejantes.

Al examinar ambas figuras, es posible encontrar algunas irregularidades de comportamiento —según el medio de cultivo— para determinadas asociaciones antibióticas, que aunque distintas para cada especie o cepa, son capaces de repetirse en su irregularidad, como sucede en muchas de las que intervienen: polimixina B, oleandomicina o eritromicina. Estas irregularidades transmisibles al diagnóstico interpretativo, aparecen aproximadamente en un 15 por ciento de las asociaciones, según era previsible por los resultados encontrados en el estudio previo de las características de difusión de las asociaciones de antibióticos sobre medio sólido.

Por estas irregularidades detectadas y porque estaba en nuestro propósito hacer una investigación más completa de las actividades antibióticas, precisando la existencia de acciones bactericidas, bacteriostáticas o bacteriolíticas, empleamos la técnica sobre medio líquido, completándola con resiembras a medio sólido exento de antibiótico después de diferentes períodos de tiempo. Por otra parte, en aplicaciones clínicas del método hemos tenido ocasión de ver cómo indicaciones que parecían clarísimas sobre medio sólido carecían de efecto *in vivo*, en contraposición con los teatrales resultados otras veces obtenidos; ello dependía de la concordancia o no entre la difusión física en el medio y actividad biológica frente al microorganismo, de la droga, inconvenientes que son observados en las técnicas sobre medio líquido.

Esto no obstante, las técnicas sobre medio sólido eran muy útiles, sobre todo para la detección y aislamiento de mutantes antibióticorresistentes y para investigar la razón de mutación y el fenómeno de colonias residuales, ya que en los estudios del desarrollo de la antibióticorresistencia se obtienen valores bastante más altos que los determi-

nados sobre medio líquido, lo cual se logra si se tiene en cuenta que sobre las bacterias actúan de modo efectivo concentraciones más bajas que las correspondientes al título efectivo del medio.

RESUMEN

Se hizo un estudio de las distintas técnicas aplicables a la investigación de terapias antibióticas combinadas, incluyendo alguna técnica de uso personal.

Fue posible comprobar las ventajas de los resultados obtenidos sobre medio líquido para el estudio del comportamiento de los gérmenes frente a las asociaciones antibióticas.

La pauta a seguir, recomendada en cepas aisladas de productos patológicos en casos de manifiesta antibióticorresistencia, es antibiograma simultáneo *sobre medio líquido* frente a las drogas aisladas y combinadas; y una vez conocida la o las asociaciones más eficaces por su acción bactericida, averiguar qué combinación de concentraciones es la más eficaz o valorar cuantitativamente la acción sinérgica y el desarrollo de una posible antibióticorresistencia; y *sobre medio sólido*, estudiar la razón de mutación o investigar si existe un manifiesto efecto de colonias residuales.

SUMMARY

A study of the different technics used on the combined antibiotic therapy is made. There are included some of the author's technics.

The author once more was able to prove the advantages to work with liquid media for the study of the behaviour of the germs against antibiotic associations.

When intensive antibiotic-resistance is present in strains isolated from pathological samples, the following procedure is recommended:

a) Simultaneous antibiogramme over liquid medium against isolated and combined drugs.

b) After knowing what associations are more efficient in each case it is convenient to find out what pair of concentrations are better, or estimate quantitatively the synergical actions and the possible development of antibiotic-resistance and, in the end, to study the mutation rate or if a "tailing" phenomenon is present.

BIBLIOGRAFIA

1. BASS, ENGLE Y (Jr.), MITCHELL y BLOCKER (Jr.). 1957. Antibiotics & Chemotherapy, 7, 14.
2. BASS, ENGLE Y (Jr.), MITCHELL y BLOCKER (Jr.). 1957. Antibiotics & Chemotherapy, 7, 160.
3. BASS, ENGLE Y (Jr.), MITCHELL y BLOCKER (Jr.). 1957. Antibiotics & Chemotherapy, 7, 166.
4. BELCOVE y SANTOW. 1956. Antibiotics & Chemotherapy, 6, 585.
5. BIGGER, J. W. 1950. Lancet, 259, 46.
6. COHEN, J. O., y PRATT, J. 1959. Antibiotics & Chemotherapy, 6, 475.
7. COOPER, K. E.; LINTON, A. H., y SEHGAL, S. N. 1958. J. Gen. Microbiol., 18, 670.
8. CHABBERT, Y. 1953. Ann. Inst. Pasteur, 84, 545.
9. CHABBERT, Y. 1953. Ann. Inst. Pasteur, 93, 289.
10. ELEK, S. D. 1953. Brit. Med. J., 2, 1928.
11. ELEK, S. D., y HILSON, G. R. F. 1954. J. Clin. Pathol., 7, 37.
12. ELEK, S. D.; HILSON, G. R. F., y JEWEL, P. 1953. Brit. Med. J., 11, 1928.
13. FABRE, A. 1958. Ann. Pharm. Franç., 16, 537.
14. FRANK, P. F.; WILCOX, C., y FINLAND, M. 1950. J. Lab. Clin. Med., 35, 188.
15. GARROD, L. P., y WATERWORTH, P. M. 1956. Brit. Med. J., 2, 61.
16. GOUREVITCH, A.; ROSSOMANO, V. Z.; PUGLISI, T. A.; TYNDA, J. M., y LEIN, J. 1958. Ann. N. Y. Acad. Sci., 76, 31.
17. GOYAN, DUFRENOY, STRAIT y PRATT. 1957. J. Am. Pharm. Assoc., Sci Ed., 36, 65.
18. GROVE, D. C., y RANDALL, W. A. 1955. Assay methods of Antibiotics. Medical Encyclopedia, Inc. N. Y.
19. HEWITT. 1930. Biochem. J., 24, 512.
20. HEWITT. 1930. Biochem. J., 24, 1551.
21. HEWITT. 1930. Biochem. J., 24, 669.
22. HEWITT. 1930. Oxidation-reduction potentials in Bacteriology and Biochemistry. 6.^a ed. Edinburgh.
23. JACKSON, G. G., y FINLAND, M. 1951. Arch. Internal. Med., 88, 446.
24. JACKSON, G. G., y FINLAND, M. 1951. J. Lab. Clin. Med., 38, 289.
25. JAWETZ, E.; GUNNISON, J. B., y COLEMAN, V. R. 1950. Science, 111, 254.
26. JAWETZ, E.; GUNNISON, J. B.; BRUFF, J. B., y COLEMAN, V. R. 1952. J. Bacteriol., 64, 29.
27. LINTON, A. H. 1958. J. Bacteriol., 76, 94.
28. LORIAN, V. 1957. Presse Med., 65, 1251.
29. LURIA, S. E., y DELBRUCK, M. 1943. Genetics, 28, 491.
30. MARTIN, R.; CHABBERT, Y., y SUREAU, B. 1953. Presse Med., 61, 168.
31. NICHOLS, A. C. 1948. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 477.

32. NORTHROP, J. H. 1957. *J. Gen. Physiol.*, 41, 131.
33. PATTE, J. C.; HIRSCH, H., y CHABBERT, Y. 1958. *Ann. Inst. Pasteur*, 94, 621.
34. PERET, R. 1955. *Presse Med.*, 63, 1081.
35. PITAL, DISQUE y LEISE 1956. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6, 351.
36. PORTOLÉS, A. 1958. *Microbiol. Españ.*, 11, 411.
37. PORTOLÉS, A. 1958. *Microbiol. Españ.*, 11, 99.
38. PORTOLÉS, A. 1960. *Laboratorio*, 29, 21.
39. SCHMIDT, W. H., y MOYER, A. J. 1944. *J. Bacteriol.*, 47, 199.
40. SEIGNEURIN, R., y ACHARD, M-L. 1955. *Ann. Inst. Pasteur*, 88, 660.
41. SIPPET y GODWIN. 1956. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 128, 541.
42. SOCÍAS, A., y PORTOLÉS, A. 1956. *Microbiol. Españ.*, 9, 353.
43. SOCÍAS, A., y PORTOLÉS, A. 1957. *Microbiol. Españ.*, 10, 5.
44. SPICER, S. 1950. *J. Lab. Clin. Med.*, 36, 183.
45. SPICER, S., y BLITZ, D. 1948. *J. Lab. Clin. Med.*, 33, 417.
46. TREFFERS, H. F. 1956. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6, 692.
47. WELCH, H. 1956. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6, 321.
48. WELCH, H.; WRIGHJ, W. W.; REDDY, R. J., y WINTERMERE, D. 1958. *Antibiotics Ann.*, 1957/58, 738.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS QUE PRODUCE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LAS BACTERIAS

II. Alteraciones del comportamiento fisiológico del *Bacillus cereus*

POR

EULALIA CABEZAS DE HERRERA (*)

INTRODUCCION

Aunque son muy numerosos los estudios que se han hecho sobre el efecto que la luz ultravioleta produce sobre los microorganismos, son pocos los que se refieren a la fisiología de las estirpes irradiadas.

El efecto bactericida de la radiación ha sido reconocido más como una inhibición específica de la división celular que como una inhibición del metabolismo y, sin embargo, se producen trastornos en él.

En el presente trabajo estudiamos las alteraciones que se producen en el comportamiento fisiológico del *Bacillus cereus* después de irradiado.

MATERIAL Y METODOS

Como en el trabajo anterior, operamos siempre con cultivos sincrónicos obtenidos según el método de Scott y Chu (3).

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

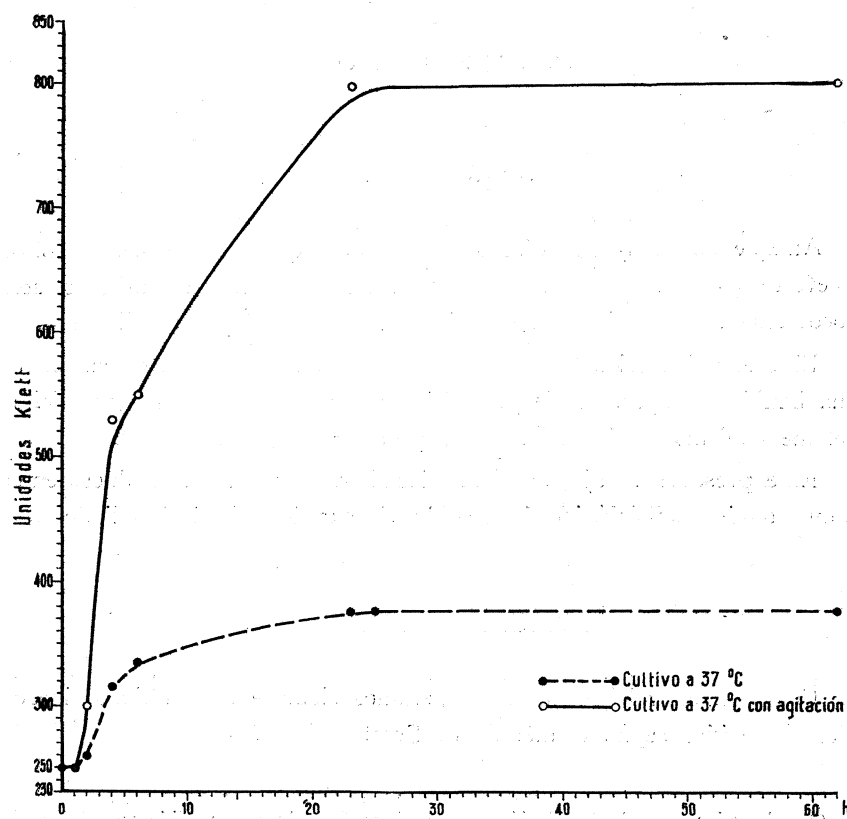
Estirpe

La estirpe con que trabajamos es la NRS de la colección Ruth E., Gordon conservada en agar-caldo a 4 °C.

Sus características fisiológicas están expresadas en el *cuadro 1*, en el que se refleja su comportamiento frente a 37 medios de cultivo. El indicador de los azúcares es el púrpura de bromocresol.

La *figura 1* nos muestra las curvas de crecimiento de la estirpe cultivada en caldo común a 37 °C en reposo y con agitación.

Las curvas las obtenemos con el fotocolorímetro de Klett-Summers, modelo 800-3 y con los matraces diseñados para este fin (1).

*Figura 1*

Cuadro 1

Medios de cultivo	Estirpe					
	Tes- tigo	Irradiada, min				
		5	15	30	60	90
Acetato de plomo	+	+	+	+	+	+
Adonita	—	—	—	—	—	—
Agua de peptona	—	—	—	—	—	—
Albúmina de huevo	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	—	—	—	—	—	—
Caldo común	+	+	+	+	+	+
Caldo con ClNa	—	—	+	—	—	+
Caldo con NO ₃ K al 1 %	(*)	(*)	(*)	+	±	(*)
Caldo con urea al 1 %	+	+	+	+	+	—
Celobiosa	—	±	+	+	+	+
Dextrina	+	+	+	+	+	+
Dulcita	—	—	—	—	—	—
Eritrita	—	—	—	—	—	—
Galactosa	—	—	—	—	+	±
Gelatina	+	+	+	+	+	+
Glicerina	+	+	±	—	—	—
Glicógeno	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Inosita	—	—	—	—	—	—
Inulina	—	—	—	—	—	—
Koser	+	+	+	—	+	—
Lactosa	—	—	—	—	—	—
Leche tórnasolada	+	+	+	+	+	+
Levulosa	+	—	+	—	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Manita	—	—	—	—	—	—
Manosa	—	—	—	—	±	—
Melobiosa	—	—	—	—	±	—
Metil-glucósido	—	—	—	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—	—	—
Rhamnosa	—	—	—	—	—	—
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Sorbita	—	—	—	—	+	—
Trehalosa	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	±	±	±	±	±	±
Xilosa	—	—	±	±	+	±

(*) Crece, pero no reduce nitratos.

Preparación de las muestras

De un cultivo en plena fase logarítmica de crecimiento (diecisiete horas) tomamos una determinada cantidad y diluimos con caldo común fresco hasta una concentración de 10^8 células/cm³.

La concentración celular la determinamos por el método de recuento en placa.

Irradiación

De la suspensión bacteriana de 10^8 células/cm³, ponemos 2 cm³ en cada placa de Petri de 4,5 cm. de diámetro. Estas placas las colocamos en una bandeja a 14,5 cm del foco de emisión.

Irradiamos durante diferentes períodos de tiempo que oscilan desde cinco a noventa minutos con 4 lámparas de mercurio Sylvania de 15 W cada una, que emiten una longitud de onda de 2.357 Å.

Durante la irradiación las muestras son constantemente agitadas por medio de un agitador de vaivén de 113 r/m, sobre el que está instalada la cámara de luz ultravioleta. Las paredes de la cámara están recubiertas con planchas de aluminio.

La intensidad efectiva de la luz ultravioleta a través de la muestra la calculamos por el método de Morowitz (2).

Una vez irradiada la bacteria, la sembramos sobre caldo común fresco para obtener las curvas de crecimiento y en diferentes medios de cultivo para conocer sus modificaciones fisiológicas. Cultivamos a 37 °C.

Todas las operaciones las realizamos en cámara oscura.

RESULTADOS

La *figura 2* nos muestra las diferencias obtenidas en las curvas de crecimiento de la estirpe irradiada en relación con la testigo.

El *cuadro 1* refleja las diferencias en el comportamiento entre la estirpe testigo y la irradiada frente a los distintos medios de cultivo ensayados, y aún las diferencias de comportamiento según el tiempo que ha sido irradiada la bacteria.

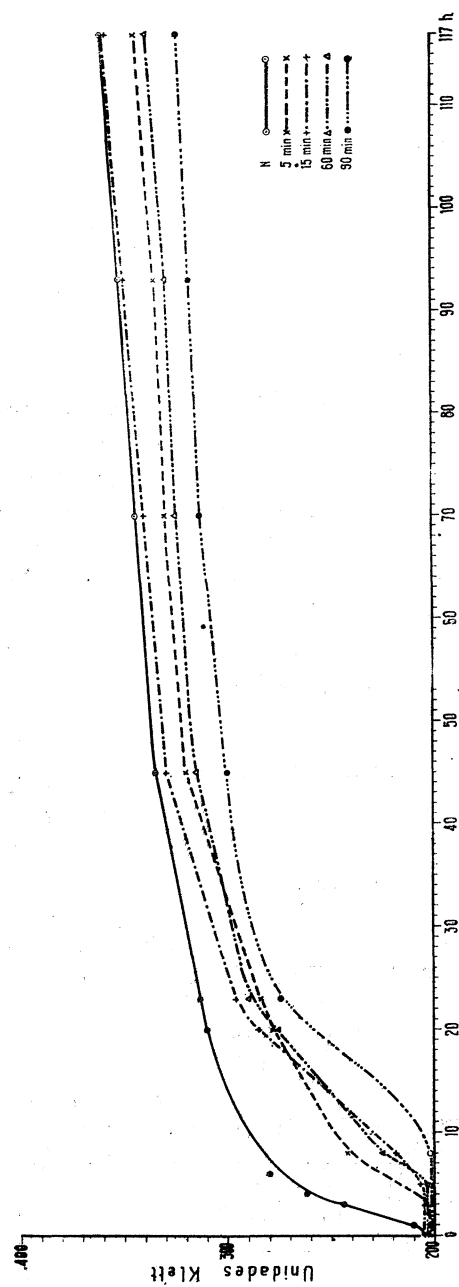


Figura 2
N = estirpe testigo

DISCUSION

Toda célula bacteriana al resembrarse en un medio fresco, antes de emprender su desarrollo normal, modifica las alteradas funciones enzimáticas y la actividad de síntesis, esto es, pasa a través de una fase de adaptación. Esta fase se interpreta como el período de tiempo preciso para que la célula reorganice o restablezca las reacciones metabólicas que han sido modificadas o alteradas. No es extraño que las células irradiadas tengan una fase de adaptación mayor que la de la estirpe testigo, ya que además, las reacciones metabólicas normales tienen que reparar las alteraciones producidas por la luz ultravioleta.

Comparando el comportamiento fisiológico de la estirpe testigo e irradiada, podemos observar que el *B. cereus*, igual que la *Escherichia coli* (1), cuando es irradiado cambia su comportamiento fisiológico frente a los distintos medios de cultivo ensayados, y este comportamiento varía según el tiempo que la bacteria haya estado expuesta a la radiación.

Esto hace que nos afiancemos en la idea de que la luz ultravioleta produce un "daño biológico" que trastorna el funcionamiento normal de la célula, sin llegar a matarla.

RESUMEN

En el presente trabajo hacemos un estudio de las alteraciones que por la acción de la luz ultravioleta sufre el *Bacillus cereus*, en su comportamiento fisiológico frente a distintos medios de cultivo y en su curva de crecimiento.

SUMMARY

The influence of U. V. irradiation on the physiological activities of *Bacillus cereus* in different culture media and on growth curve is studied.

BIBLIOGRAFIA

1. CABEZAS DE HERRERA, E. 1961. Estudio de los efectos que produce la luz ultravioleta sobre las bacterias. I. Microbiol. Españ., 14, 7-15.
2. MOROWITZ, H. J. 1950. Absorption effects in volume irradiation of microorganisms. Science, 111, 229-30.
3. SCOTT, Mc., N., y CHU, E. 1958. Synchronized division of growing cultures of *E. coli*. Exp. Cell Research, 14, 166-74.

INVESTIGACION DEL MODO DE ACCION DE LAS SUBSTANCIAS ANTIMICROBIANAS

POR
J. RODRIGUEZ-VILLANUEVA e ISABEL GARCIA-ACHA

Los microorganismos han atraído la atención de los bioquímicos, debido a su elevada actividad metabólica, así como por mostrar un campo extraordinariamente amplio de actividades químicas. Numerosos estudios de bioquímica comparada indican que muchos sistemas metabólicos fundamentales son esencialmente idénticos en las bacterias y en los seres de organización más elevada, si bien en las bacterias estos sistemas están acoplados en una célula más pequeña que la que forma los organismos superiores. Debido a la aparente simplicidad de estructura y organización, los microorganismos y en especial, las bacterias parecen ser un material ideal para la investigación de la integración y organización de los fenómenos bioquímicos que dan lugar a la vida. Se deduce que existen diferencias entre las células animales y las bacterias por el mero hecho de existir antibióticos que son tóxicos para estas últimas, pero no para las anteriores. Se puede preguntar: ¿reside la acción selectiva de estas drogas en su facultad de combinarse con estructuras específicas de los microorganismos, o en su capacidad para inhibir determinados procesos metabólicos? Estas son cuestiones que como consecuencia de numerosos trabajos de investigación de los últimos años han comenzado ya a obtener su apropiada respuesta.

En la práctica, se pueden utilizar diversos métodos para tratar de descubrir la naturaleza de la lesión estructural o bioquímica producida por un agente antimicrobiano. En la mayoría de los casos se estudia el material y la técnica seguida en la investigación junto con el tipo de resultado obtenido en determinado experimento. En todos los estudios de este tipo debe recordarse que un agente antimicrobiano puede ma-

nifestar diferentes efectos a diferentes concentraciones, y el fin de la investigación es descubrir un efecto producido por el agente a una concentración del mismo orden que aquella que inhibe el crecimiento del organismo usado. Efectos producidos a concentraciones mucho más elevadas pueden ser de interés metabólico, pero probablemente no están relacionadas con la causa primaria de inhibición del crecimiento.

A continuación se indica la serie de ensayos que se pueden seguir a lo largo de una investigación sistemática del modo de acción de una nueva droga.

1. Ensayos de crecimiento y valoración

El primer ensayo debe de comprender una determinación de la concentración menor de la droga que bajo las condiciones del ensayo, es capaz de inhibir por completo el crecimiento; es decir, se determina el coeficiente de inhibición de la droga en cuestión. Conviene también saber algo del espectro de inhibición del compuesto, si la concentración limitante varía con la cantidad de inóculo y si la droga es absorbida por las células sensitivas. Esto último sugiere un método de valoración de la droga.

2. Metabolismo y energía

Un agente antimicrobiano puede inhibir alguno de los pasos de la movilización de la energía o del "acoplamiento" de tal producción de energía con la utilización de la misma, mediante procesos metabólicos. Esta posibilidad debe ser ensayada al principio de la investigación ya que si se inhibe el metabolismo productor de energía por la concentración limitante del crecimiento, todos los mecanismos sintéticos serán también interferidos y no hay necesidad de buscar ya ningún otro modo de acción de la droga. No es probable que un agente de esta clase pueda ser de uso selectivo o quimioterápico. Substancias de este tipo son la antimicina, patulina y gramicidina.

3. Alteración de las propiedades de la superficie de la célula

Cualquier alteración de la naturaleza físicoquímica de la superficie de la célula repercutirá en un cambio de la carga de esta superficie. El estudio de la carga de la superficie de la célula bacteriana se demuestra por electroforesis (13) junto con los efectos de las sustancias, tales

como la tirocidina y bromuro de cetiltrimetilamonio. Si la acción de la droga conduce a una alteración de la permeabilidad de las membranas de la célula, se puede producir una pérdida de ciertos constituyentes solubles de la célula, tales como aminoácidos, fosfatos, nucleótidos (16, 19, 22).

4. Síntesis de la pared celular

La célula bacteriana está protegida del choque osmótico por la presencia de la pared celular. La inhibición de la síntesis de esta pared celular puede llevar al desarrollo de "protoplastos" sensitivos osmóticamente. Un ejemplo es el del *Bacillus megaterium* cuando se expone a la acción de la penicilina durante el crecimiento del cultivo. La sustancia que forma la pared celular es un polímero complejo y la inhibición de la polimerización puede conducir a la formación de precursores de tal material, fáciles de identificar. Son los llamados "compuestos de Park" (17-18).

5. Síntesis de proteína

Alrededor de la mitad del peso seco de la célula bacteriana está formado por proteínas que incluyen muchas enzimas esenciales para el metabolismo. Se puede estudiar la síntesis de proteína incubando las células en un medio que contenga aminoácidos y una fuente de energía, y luego determinando el aumento de nitrógeno proteico o bien siguiendo la síntesis de enzimas específicas. El cloranfenicol se ha usado mucho en experiencias de inhibición de síntesis de enzimas; el único proceso inhibido a concentraciones que limitan el crecimiento, es el de síntesis de proteína (3). La penicilina no tiene acción inhibidora sobre la síntesis de proteína a menos que esté presente en una concentración del orden de varias veces superior al requerido para inhibir el crecimiento o la síntesis de la pared celular (4). Sin embargo, la formación de enzimas inducidas, tal como la β -galactosidasa, se inhibe por bajas concentraciones de penicilina o bacitracina (2).

6. Incorporación de aminoácidos

Al incubar las bacterias con un aminoácido radiactivo y una fuente de energía, el aminoácido se incorpora a las proteínas de la célula (6) o a la pared celular (10, 12). El primer proceso comprende el mecanismo

que sintetiza las proteínas y por tanto ofrece una técnica extremadamente sensible para ensayar los agentes que afectan a tal mecanismo (5-6).

7. Síntesis de ácidos nucleicos

En los últimos años se han realizado extraordinarios avances en el conocimiento del mecanismo de síntesis de los ácidos nucleicos, como consecuencia de la parcial purificación de algunos sistemas enzimáticos que catalizan la síntesis de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico *in vitro* (8-9, 11).

Hasta hace poco, numerosas investigaciones trataban de demostrar que los ácidos nucleicos estaban ligados a la síntesis de proteína. Hoy se sabe que la síntesis de este material y la regulación de la formación de enzimas dependen del metabolismo de los ácidos nucleicos. El cloranfenicol y otros antibióticos pueden afectar a estos procesos sintéticos (7).

8. Agentes mutagénicos

Un agente antimicrobiano puede originar la producción de mutantes. De hecho se sabe que una gran variedad de drogas pueden dar lugar a mutaciones en microorganismos (15, 20-21). La obtención de mutantes bioquímicos es uno de los métodos hoy más utilizados para estudiar determinados procesos metabólicos.

9. División celular sincronizada

Un agente antimicrobiano puede ser en ciertos momentos de la vida de un microorganismo más efectivo que en otros, y tales cambios de sensibilidad pueden ser estudiados en cultivos de bacterias si se logra someter los organismos a una división celular sincronizada. La temperatura permite lograr esto (1).

10. Fraccionamiento y localización

Una droga puede ser fijada específicamente por un componente estructural de la célula y el esclarecimiento de tal fijación puede servir de gran ayuda para poner en claro su modo de acción. Procedimientos de fraccionamiento de la célula bacteriana han sido detallados por algunos autores (14).

RESUMEN

Se describen una serie de ensayos que se pueden seguir a lo largo de la investigación del modo de acción de una nueva substancia antimicrobiana. Estos métodos se pueden usar cuando se trata de descubrir la naturaleza de la lesión estructural o bioquímica, producida por un agente antimicrobiano. Se debe recordar que estos agentes pueden manifestar diferentes efectos a diferentes concentraciones y el fin que persigue la investigación es encontrar un efecto ocasionado por el agente a una concentración equivalente a la que inhibe el desarrollo del organismo que se estudia.

SUMMARY

A serie of assays that can be followed during an investigation of the modes of action of a new drug are described. These methods can be used in an attempt to discover the nature of the structural or biochemical lesion produced by an antimicrobial agent. In all investigations of this nature it must be remembered that an antimicrobial agent may display different effects at different concentrations and the aim of the research is to discover an effect produced by the agent at a concentration of the same order as that which inhibits the growth of the organism used.

BIBLIOGRAFIA

1. CAMPBELL, A. 1957. *Bacteriol. Rev.*, 21, 263.
2. CREASER, E. M. 1955. *J. Gen. Microbiol.*, 12, 288.
3. GALE, E. F. 1958. *Ciba Symposium, Amino acids and peptides with antimetabolite activity*, 19. Churchill, London.
4. GALE, E. F. 1959. *Synthesis and organisation in the bacterial cell. Ciba lectures in Microbial Biochemistry*. Jhon Wiley and Sons, Inc. N. Y.
5. GALE, E. F., y FOLKES, J. 1953. *Biochem. J.*, 53, 483.
6. GALE, E. F., y FOLKES, J. 1955. *Biochem. J.*, 59, 661.
7. GALE, E. F., y FOLKES, J. 1958. *Biochem. J.*, 69, 620.
8. GRUNBERG-MANAGO, M., y OCHOA, S. 1955. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3165.
9. GRUNBERG-MANAGO, M.; ORTIZ, P. J., y OCHOA, S. 1955. *Science*, 122, 907.
10. HANCOCK, R., y PARK, J. T. 1958. *Nature*, 181, 1050.

11. KORNBERG, A. 1957. The chemical basis of heredity, Mc Collum-Pratt y Symposium, 579.
12. MANDELSTAM, J., y ROGERS, H. J. 1958. Nature, 181, 956.
13. MC QUILLEN, K. 1950. Biochim. et Biophys. Acta., 5, 463.
14. MC QUILLEN, K., y ROBERTS, R. B. 1954. J. Biol. Chem., 207, 81.
15. MILLER, H., y McELROY, W. D. 1948. Science, 107, 193.
16. NEWTON, B. A. 1956. Bacteriol. Rev., 20, 14.
17. PARK, J. T. 1952. J. Biol. Chem., 194, 877.
18. PARK, J. T., y STROMINGER, L. 1957. Science, 125, 99.
19. SALTON, M. R. S. 1951. J. Gen. Microbiol., 5, 391.
20. STEVENS, C. M., y MYLROIE, A. 1953. Am. J. Botany, 40, 424.
21. SZYBASKY, W., y BRYSON, V. 1952. J. Bacteriol., 64, 489.
22. VILLANUEVA, J. R. 1959. Nature, 184, 1565.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702.-1958

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15 - Madrid