

Microbiología Española

*publicada por
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles*



Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN 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
Modificaciones de las células de amnios humano infectadas con el virus «coxsackie» B 5, por <i>A. P. García-Gancedo</i>	79
Aislamiento de un pseudomanádido fluorescente, de camarones, por <i>D. A. Conroy</i>	89
Un caso de «manchas rojas» en peces de acuario, por <i>D. A. Conroy</i>	95
Caracteres diferenciales entre razas sensibles y resistentes a la bencil-penicilina, del <i>Stapylococcus aureus</i> , por <i>E. Porto</i> y <i>B. Regueiro</i>	101
Fotorreactivación bacteriana (<i>Aerobacter aerogenes</i>), por <i>L. C. Verna</i> y <i>Teresa S. Daurat</i>	125
Acción lítica de un <i>Streptomyces</i> sobre levaduras: obtención de protoplastos, por <i>Concepción García-Mendoza</i> y <i>J. R. Villanueva</i>	139
Conferencia del Dr. Rubio	149
Colección de Microorganismos	149
Curso de Bioquímica microbiana	149

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

MODIFICACIONES DE LAS CELULAS DE AMNIOS HUMANO INFECTADAS CON EL VIRUS "COXSACKIE" B 5

POR
A. P. GARCIA - GANCEDO (*)

INTRODUCCION

La infección de las células por un virus indudablemente provoca alteraciones, que son de tipo morfológico y bioquímico.

El estudio de dichas modificaciones se ha visto facilitado por la utilización de los cultivos celulares. Por diversos autores se han realizado estudios con diversos virus, sobre diferentes tipos de células. Tomando como base la técnica de los cultivos celulares se han empleado variados métodos para determinar los cambios experimentados por la célula durante el período de infección.

Teniendo en cuenta que es importante conocer las modificaciones, tanto morfológicas como bioquímicas, producidas por la infección, observándolas en la propia célula y alterando ésta lo menos posible, hemos adoptado procedimientos citológicos y citoquímicos para su estudio, aunque los datos obtenidos no puedan traducirse con la exactitud numérica que dan los procedimientos de análisis bioquímico.

La interacción virus-célula está íntimamente ligada a todas las modificaciones observadas en las células infectadas y, por consiguiente, el conocimiento y análisis de estas modificaciones contribuyen de algún modo al mejor conocimiento del problema de la infección vírica.

(*) Este trabajo forma parte del realizado mediante una beca de la Fundación «Juan March», a la que expresamos nuestro agradecimiento.

MATERIAL Y METODOS

Virus. Una cepa de virus «Coxsackie» B 5, cultivada en células de riñón de mono (*Macacus rhesus*) y conservada a -30 °C. Procedente de la colección del Instituto Superior de Sanidad, de Roma.

Células. Se ha empleado la cepa I. S. S. de amnios humano, establecida por Collotti (2).

Medios de cultivo. El medio de crecimiento está constituido por un 85 por ciento de solución de Eagle con penicilina y estreptomycinina y un 15 por ciento de suero de ternera inactivado a 56 °C durante treinta minutos. El medio de mantenimiento sin suero, está compuesto por el 95 por ciento de medio 199 con penicilina y estreptomycinina y el 5 por ciento de albúmina bovina.

Preparación de los cultivos celulares. A partir de los frascos con capa continua de células, mediante tripsinización, se obtiene una suspensión de dichas células en medio de crecimiento, sembrándose en tubos de Leighton con cubreobjetos. Cuando las células forman una capa continua, se sustituye el medio de crecimiento por el medio de mantenimiento que lleva la suspensión del virus.

Métodos de coloración

Se han empleado las tinciones de hemátxilina-eosina, verde Janus, Gomori y naranja de acridina.

Coloración verde Janus. Una solución acuosa al 1 por mil, de verde Janus se añade a los tubos de cultivo que contienen el cubreobjetos, en la proporción 1:10 con respecto al medio de cultivo. Se extrae el líquido quince minutos después, colocando el cubreobjetos sobre un portaobjetos, observándose inmediatamente al microscopio. Se tiñen la mitocondrias de azul intenso, los núcleos, de azul muy claro, y el citoplasma permanece casi incoloro.

La intensidad de la coloración está relacionada con la proporción de oxidasas.

Coloración de Gomori para las fosfatasas alcalinas. El cultivo celular se lava con solución salina estéril y después con agua destilada. Se fija con acetona durante una hora a 4 °C. Se lava con agua destilada. Se añade una solución constituida por 10 cm³ de β -glicerofosfato sódico al 2 por ciento, 10 cm³ de dietilbarbiturato sódico al 2 por ciento, 15 cm³ de agua destilada, y 8 cm³ de cloruro cálcico al 2 por ciento (este úl-

timo conservado a 4 °C), manteniéndose en incubación a 37 °C durante noventa minutos a un pH 9,3-9,4. Se lava después con agua y se añade solución de cloruro de cobalto al 2 por ciento durante tres-cinco minutos (esta solución se mantiene para su conservación a 4 °C). Se lava con agua y se añade una solución compuesta por partes iguales de sulfuro amónico al 10 por ciento, y tioacetamida al 10 por ciento, manteniéndose uno-dos minutos. Se lava muy bien con agua corriente. Como colorante de contraste, se usa el carmín-alumbre durante quince minutos. Finalmente, se lava con agua destilada, dos veces con alcohol de 96° y dos veces con xilol y se monta. Se obtienen zonas en el citoplasma con precipitado negro de sulfuro de cobalto, que indican la reacción enzimática.

Coloración anaranjado de acridina. Se lava el cultivo con solución salina. Se fija con alcohol metílico durante diez minutos. Se colorea durante quince minutos con una solución de anaranjado de acridina al 1:2.000 en tampón fosfatado a pH 7,2 y filtrada por papel. Se lava dos veces con agua destilada y se hace la diferenciación con cloruro cálcico al 1 por ciento durante diez-doce minutos. Se lava con abundante agua destilada. Se monta con solución salina o glicerina. Se observa inmediatamente al microscopio con luz fluorescente. Esta coloración permite distinguir el ácido desoxirribonucleico del ácido ribonucleico. El colorante forma dos compuestos diversos con el ADN y el ARN, que emiten fluorescencia verde opaco y amarillo naranja, respectivamente (3).

Para la observación se ha empleado un dispositivo microscópico Zeiss. La fuente luminosa fue una lámpara de vapor de mercurio Osram tipo HBO 200. Los filtros de excitación eran dos Schott BG 12 de 3 mm de espesor. Los filtros de detención eran Schott CG 4 y CG 5 con banda de transmisión de alrededor de 5.000 Å.

Coloración hematoxilina-eosina. Es el método corrientemente empleado en histología y tan conocido que no creemos necesario hacer su descripción. Para la fijación se utiliza el fijador de Carnoy.

Marcha del experimento

Después de la inoculación, a las seis, veinticuatro, treinta y cuarenta y ocho horas y en el momento mismo de dicha inoculación, se han tomado grupos de tubos y de cada grupo se han realizado preparacio-

nes coloreadas con los diversos métodos de coloración. Siempre con el mismo número de cultivos infectados y sin infectar. Se han hecho siempre, al menos, cuatro preparaciones por coloración y experimento.

Por otra parte, simultáneamente a lo anterior, mediante titulación en cultivos de células de riñón de mono, se ha determinado la curva de liberación de virus al medio de cultivo, y la curva de resistencia del virus a la temperatura de 37 °C. Se han obtenido los datos para la primera curva, tomando medio de cultivo, a las horas ya indicadas anteriormente, de varios tubos de cultivo infectados con el virus, y mezclando el medio correspondiente a los tubos de la misma hora, conservándolo a -30 °C hasta el momento de la titulación. Los datos para la segunda curva se obtienen colocando a 37 °C un frasco con una parte de la misma suspensión de virus que ha servido para las inoculaciones y tomando muestras estérilmente a las horas citadas, haciéndose la titulación al mismo tiempo que la anterior.

La suspensión de virus utilizada para la inoculación ha sido también titulada. Todas las titulaciones se hacen siguiendo el método de Reed y Muench.

RESULTADOS

Los datos obtenidos de las diversas coloraciones proceden del examen detenido de varias preparaciones por cada experimento.

Coloración verde Janus

A las seis horas de la inoculación. Las *células sin infectar* presentan el núcleo sin teñir o poco teñido con un color más bien violado, mientras el citoplasma permanece prácticamente incoloro, destacándose en él unos gránulos diminutos (mitocondrias), teñidos de color verde azulado. Estos gránulos están distribuidos en el citoplasma, aunque se acumulan en mayor cantidad en las proximidades del núcleo, rodeando a éste. Se observan ligeras diferencias de tamaño y de intensidad de la coloración en dichos gránulos. Las *células infectadas* están más intensamente coloreadas; los gránulos presentan un color verde azulado más fuerte y se acumulan en un polo del núcleo, junto a la membrana nuclear, siendo su número superior al que presentan las células sin infectar.

A las veinticuatro horas de la inoculación. Las células sin infectar tienen un aspecto semejante al que presentaban anteriormente. Las células infectadas, en su mayor parte, sufren ya los efectos citopáticos de la infección y su citoplasma se encuentra parcialmente destruido. No obstante, puede apreciarse la mayor abundancia de gránulos rodeando al núcleo y situados principalmente en un polo de éste, y su tamaño mayor.

A las treinta horas de la inoculación. Las células normales no infectadas conservan su anterior aspecto. Las células infectadas están ya casi totalmente desprovistas de citoplasma, no apreciándose con claridad los gránulos, que se encuentran en poca cantidad y dispersos. En algunas células que conservan aún su citoplasma bastante completo, el número de gránulos es aún grande, pero están dispersos.

A las cuarenta y ocho horas de la inoculación. El cultivo infectado está totalmente destruido, por lo que no puede hacerse ninguna observación. Las células sin infectar se conservan normales.

Coloración de Gomori

A las seis horas de la inoculación. Las células sin infectar presentan una reacción bastante positiva, mientras que las células infectadas dan reacción débilmente positiva.

A las veinticuatro horas de la inoculación. Aumenta la positividad de las células sin infectar. Continúa sin aumentar la positividad débil de las células infectadas.

A las treinta horas de la inoculación. Se mantiene la positividad de las células sin infectar, al parecer con ligera disminución, aumentando la positividad anterior de las células infectadas.

A las cuarenta y ocho horas de la infección. Cultivos infectados totalmente destruidos.

Coloración anaranjado de acridina

A las seis horas de la inoculación. Las células sin infectar presentan un aspecto normal, con el núcleo bien delimitado, como asimismo el citoplasma. En el núcleo se encuentran de 2-5 nucleolos de color amarillo rosado, que destacan del núcleo, que tiene fluorescencia verde. El citoplasma es de aspecto denso y color rosa amarillento brillante. Las células infectadas presentan los bordes del núcleo menos definidos, con

espacios vacíos o no fluorescentes, citoplasma rosado menos brillante, nucleolos amarillos brillantes, algunos de ellos de tamaño mayor que lo normal (fenómeno ya observado por Amstrong (1) en otros casos): La sustancia nuclear se presenta menos homogénea.

A las veinticuatro horas de la inoculación. Las células sin infectar conservan el aspecto anterior, aunque el citoplasma muestra mayor predominio del color rosa anaranjado. Las células infectadas presentan los núcleos con bordes aún más irregulares que anteriormente; el citoplasma, con muchos puntos oscuros (vacuolas) y menos extensión de las zonas anaranjadas, aumentando aparentemente la extensión del material verde.

A las treinta horas de la inoculación. Las células sin infectar conservan el mismo aspecto anterior. Las células infectadas presentan ya efectos citopáticos muy marcados, están redondeadas, separadas unas de otras, con muy poco citoplasma y éste muy vacuolizado con un color mas bien oscuro; sus bordes son muy irregulares, la fluorescencia verde del núcleo está alterada, pero bastante extendida. Se observan también células gigantes plurinucleadas.

A las cuarenta y ocho horas de la inoculación. Las células infectadas están totalmente destruidas, las células sin infectar permanecen sin variación significativa.

Coloración hematoxilina-eosina

Aspecto morfológico semejante al observado con el anaranjado de acridina. Los espacios vacíos o no fluorescentes que se observan mediante aquella coloración, con ésta tampoco se tiñen. La sustancia nuclear es fuertemente basófila, aunque de forma más marcada en las células infectadas. A partir de las veinticuatro horas, el citoplasma se muestra roto, de aspecto granuloso, con numerosas vacuolas.

La liberación del virus al medio durante la infección del cultivo, tiene lugar como sigue: el título del inóculo es $10^{-4.5}$; a las seis horas de la inoculación, el título en el medio es de $10^{-2.6}$; a las veinticuatro horas, de $10^{-3.5}$; a las treinta horas, de $10^{-5.6}$, y a las cuarenta y ocho horas, de $10^{-7.2}$.

Por otra parte, la resistencia del virus a la temperatura de 37 °C se verifica de la siguiente forma: el título inicial es de $10^{-4.5}$; a las seis horas es de $10^{-2.6}$; a las veinticuatro horas, de $10^{-0.25}$; a las treinta horas, de $10^{-0.12}$, y a las cuarenta y ocho horas es totalmente negativo.

DISCUSION

Con la coloración verde Janus se observa como características de las *células infectadas*, una polarización de los corpúsculos (mitocondrias) en una zona junto al núcleo, un aumento de tamaño en general, de dichos corpúsculos, y también parece aumentar su número. Al parecer, las células infectadas, en general, se colorean más fuertemente, lo que indicaría un aumento de la oxidación celular. A las treinta horas de la infección, las células presentan ya efectos citopáticos avanzados, estando el citoplasma en destrucción, no apreciándose bien los gránulos. En las células que aún conservan su citoplasma, los gránulos están dispersos, no polarizados como anteriormente.

Con la coloración de Gomori, para las *células sin infectar* se obtiene una reacción bastante positiva a las seis horas de la infección; a las veinticuatro horas aumenta la positividad de dicha reacción, manteniéndose sin aumento a las treinta horas. Sin embargo, en las *células infectadas*, la reacción es casi negativa a las seis horas y a las veinticuatro horas, haciéndose bastante positiva a las treinta horas. Esto parece indicar una alteración notable en las alcalinofosfatasas de las células infectadas, encontrándose éstas en menor cantidad que en las células sin infectar.

Mediante la coloración con anaranjado de acridina se observa que las *células normales* conservan su aspecto normal, núcleo y citoplasma con sus bordes delimitados netamente, citoplasma denso con zonas anaranjadas, nucleolos de color amarillo brillante, generalmente en número de 3-5; con el tiempo de cultivo aumentan las zonas de color anaranjado, lo que indica aumento de ARN y síntesis proteica, ya que por estar las células en medio de mantenimiento es casi nula la multiplicación celular.

Con dicha coloración, las *células infectadas* presentan a las seis horas alteraciones morfológicas en el citoplasma y en el núcleo, los bordes de éste son poco definidos, presentando espacios vacíos o no fluorescentes (son vacíos porque con la coloración hematoxilina-eosina

se ven de la misma forma); debido, parece ser, a una retracción o lobulación del núcleo, la sustancia nuclear es menos homogénea; los nucleolos aumentan de tamaño, color amarillo brillante; el citoplasma, con bordes no bien delimitados, al menos en bastantes células, y por su color indica una baja cantidad de ARN. A las veinticuatro horas, los núcleos aún están más alterados; el citoplasma, muy vacuolizado, y por su color se observa que continúa la disminución de ARN y aumenta el ADN. A las treinta horas, los núcleos están aún más alterados, conservando sus nucleolos, pero con un tamaño mayor de lo normal; la fluorescencia verde de los núcleos, alterada y extendida, lo que indica un aumento y alteración en el ADN, debido a la multiplicación del virus, la cual también influye en el aumento de tamaño de los nucleolos; el citoplasma está bastante destruido y extraordinariamente vacuolizado. Se observan bastantes células gigantes plurinucleadas por alteración de la mitosis. A las cuarenta y ocho horas, los cultivos infectados están totalmente destruidos.

Considerando la curva de liberación de virus al medio (*figura 1*),

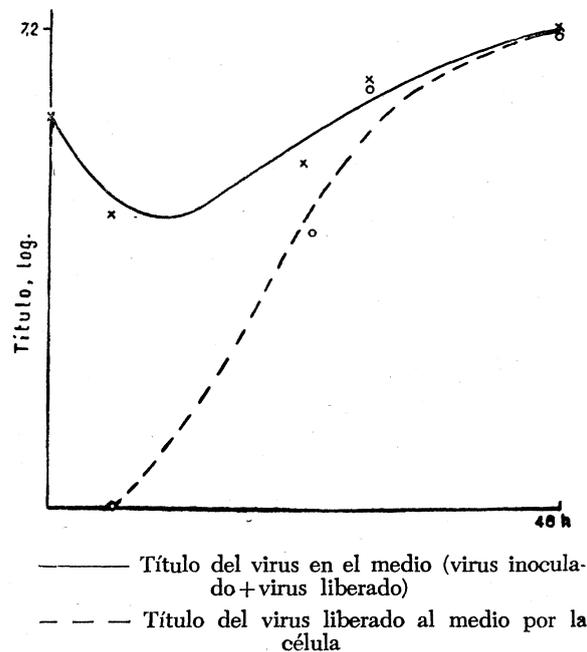


Figura 1

y teniendo en cuenta la curva de resistencia a la temperatura (figura 2) del virus, vemos que seis horas después de la infección se inactiva en parte el virus no adsorbido a las células, y al mismo tiempo no debe existir apenas liberación de virus al medio, ya que los títulos de virus

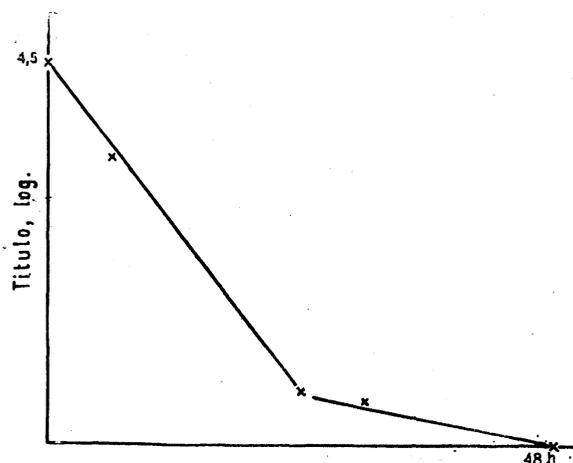


Figura 2

en el medio de las células infectadas y en el medio sometido a inactivación son iguales (período de eclipse). A las veinticuatro horas de la inoculación, el virus liberado por las células alcanza un buen título, que se duplica en las veinticuatro horas siguientes. Este rápido aumento en la cantidad de virus liberado por las células está estrechamente relacionado con la evolución de los efectos citopáticos y la destrucción del cultivo.

La curva de resistencia a la temperatura, o de inactivación del virus por el calor, nos indica la existencia de una inactivación rápida en las primeras horas, seguida de un período de inactivación más lenta, siendo total la inactivación a las cuarenta y ocho horas. El tipo de curva obtenido se ha establecido en diversos virus y parece ser una característica constante en muchos de estos.

RESUMEN

Mediante métodos citoquímicos e histológicos se determinan diversas modificaciones inducidas por el virus «Coxsackie» B5 en las células de amnios humano.

SUMMARY

Using cytochemical and histological methods it was observed the modifications induced in human amnion cells by the Coxsackie B5 virus.

BIBLIOGRAFIA

1. AMSTRONG, J. A., y HOPPER, P. K. 1959. *Exptl. Cell Research*, 16, 584.
2. COLLOTTI, C. 1960. *Rend. Ist. Super. Sanità*, 23, 1.234.
3. CORSI, O. B., y HARKEVITCH, N. 1960. *Sperimentale*, 110, 250.
4. STUART, D. C., y FOGH, J. 1961. *Virology*, 13, 177.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA, INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA

AISLAMIENTO DE UN PSEUDOMONADIDO FLUORESCENTE, DE CAMARONES

POR

D. A. CONROY

INTRODUCCION

Durante la residencia del autor en Inglaterra, le fue posible estudiar un caso de contaminación bacteriana de camarones noruegos (*Pandalus borealis*) envasados en recipientes de vidrio. La presente comunicación trata de detallar los resultados y conclusiones de dicho trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Fueron recibidos en el laboratorio unos envases de camarones de fabricación noruega. Todos estos envases habían sido mantenidos a -4°C . Al examinarlos, se notó la presencia de unas zonas de opacidad alrededor del abdomen del animal. Después de quemar ligeramente la tapa metálica de uno de estos recipientes, con alcohol, se abrió y fue puesto su contenido en una placa de Petri estéril. Se hicieron unas preparaciones microscópicas con las que fue posible comprobar la presencia de bacterias Gram-negativas y móviles.

Luego se cultivó un corte del abdomen de uno de los camarones afectados, sembrándolas en estrías en placas de agar nutritivo e incubándolas a 25°C durante cuarenta y ocho horas. Además, se practicó un examen minucioso de los camarones, comprobándose que no había decoloración, putrefacción u olor desagradable y que presentaban un aspecto normal.

Después de la incubación de los cultivos, se observó la presencia de

unas colonias pequeñas compuestas de bacterias móviles y Gram-negativas. Una de estas colonias se inoculó en agua peptonada, incubando este cultivo también a 25 °C. De éste fue inoculada una serie de hidratos de carbono, gelatina nutritiva, medio de Koser citraado, agar-urea de Christensen, caldo MRVP Oxoid y caldo con nitrato.

Para efectuar un estudio sobre las propiedades de tolerancia del organismo para los halógenos, se le sembró en estrías sobre placas de agar nutritivo conteniendo 2,5, 5, 7,5 y 10 por ciento, respectivamente, de cloruro sódico.

Un cultivo del organismo fue entregado al Dr. J. M. Shewan, Director del Centro de Investigaciones Torry, de Aberdeen (Escocia), con el propósito de realizar unos estudios más detallados.

RESULTADOS

El organismo tiene las siguientes características:

a) Bastoncitos Gram-negativos, midiendo 1,7-2,6 $\mu \times 0,4-0,5 \mu$. Móvil por dos flagelos polares. No esporulados y no resistentes al ácido o alcohol.

b) Se producen colonias circulares y ligeramente elevadas, con bordes enteros, en agar nutritivo.

c) Se licúa rápidamente la gelatina; no se produce indol; se produce amoníaco, de la peptona; rojo de metilo, positivo; Voges-Proskauer, negativo; se reducen los nitratos a nitritos; se produce ureasa; se utiliza citrato como única fuente de carbono, y se produce ácido, pero no gas, con la glucosa.

Había buen desarrollo en agar nutritivo, conteniendo hasta 7,5 por ciento de cloruro sódico.

Shewan (9) dice que el organismo es oxidasa positivo, es insensible a la penicilina y al reactivo vibriostático 0/129 (12) y ataca a los hidratos de carbono por vía oxidante.

Además, pudo aislar una cepa fluorescente y una cepa no fluorescente del mismo organismo (7). La temperatura óptima es de 20°-25 °C, pero se desarrolla bien entre -4° y +30°C.

Por las razones arriba mencionadas, se clasificó el organismo como un «pseudomonádido verde fluorescente», y se mantiene un cultivo tipo en la Colección Nacional de Bacterias Marinas (Gran Bretaña).

DISCUSION

La bacteriología de los crustáceos marinos ha recibido escasa atención de los investigadores, no obstante la gran importancia económica de esos animales como alimento. En consecuencia, hay pocos trabajos publicados hasta ahora (8). Uno de los trabajos que trata de la bacteriología de camarones es el de Shaikhmahmud y Magar (6). En un estudio de camarones Bombay (*Parapeneopsis stylifera*), estos autores demostraron que se pueden aislar fácilmente varias especies de *Pseudomonas* del carapacho, de la superficie externa y hasta del tejido muscular de los animales. Es de interés notar que todas las bacterias aisladas fueron capaces de desarrollo normal en medios preparados con agua dulce, agua del mar, y cloruro sódico al 3 por ciento. Muchas de ellas toleraron concentraciones de sal de hasta 16 por ciento.

En el presente caso, se sospechó inmediatamente que el organismo pudiese ser de origen marino, ya que se desarrolló en medios de cultivo conteniendo hasta 7,5 por ciento de cloruro sódico. El trabajo de Castell (2) sobre la diferencia de pseudomonádidos marinos y no marinos nos presta interesantes conclusiones. Castell encontró que los verdaderos pseudomonádidos marinos se desarrollaron en agua del mar, pero no en agua dulce, mientras que los pseudomonádidos de aguas dulces murieron en agua del mar. Esta reacción puede cambiarse por la adición al medio de concentraciones variables de peptona. También es de interés mencionar el trabajo de Hodgkiss y Shewan (4) sobre un organismo aislado de una condición ulcerosa de la platija (*Pleuranectes platessa*). Ellos identificaron su organismo como *Pseudomonas ichthyodermis*, el cual, según el «Bergey's Manual» (1) necesita agua del mar para su desarrollo. Sin embargo, Hodgkiss y Shewan pudieron cultivarlo sin dificultad alguna en medios de cultivo preparados con agua dulce.

ZoBell (14), en su trabajo sobre las bacterias marinas, considera que el pleomorfismo es una característica típica del grupo y que la movilidad es muy común entre ellas (esta última característica es considerada por él como una adaptación acuática). Las bacterias marinas en general, son más pequeñas que las de aguas dulces y predominan entre ellas las especies de *Pseudomonas*. Generalmente son activamente

proteolíticas, casi todas produciendo amoníaco, de la peptona, y la mayoría licuando la gelatina.

Mossel e Ingram (5) han demostrado que bacterias Gram-negativas de los géneros *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* están particularmente asociadas con la alteración de fauna marina (como langostinos y peces). Tarr (13) considera que en la sucesión de la flora bacteriana de la fauna marina, se encuentran primero, las flavobacterias y los micrococcos, seguidos rápidamente por pseudomonádidos proteolíticos. Además, opina que todas las bacterias marinas asociadas con alteraciones del pescado son sicrofílos facultativos, existiendo de $-7,5^{\circ}$ a $+30^{\circ}$ C.

Los trabajos recientes de investigadores británicos (10, 11) han demostrado que las bacterias de animales marinos se componen esencialmente de especies de los géneros *Achromobacter* y *Pseudomonas*.

Fischer (3) demostró que los pseudomonádidos fluorescentes se hallan en gran número en el moco externo del bacalao báltico. Por esta razón es posible suponer que en el caso aquí descrito, el organismo aislado fue un componente de las bacterias normales de los camarones. Como dijeron Shaikhmahmud y Magar (6), la asociación normal de bacterias proteolíticas y reductores de nitrato con los camarones en el mar, les hace muy susceptibles a la alteración rápida. Además, la conservación de estos animales se complica por el hecho de que muchas de sus bacterias asociadas se desarrollan en soluciones hipertónicas de cloruro sódico.

En consecuencia, se llegó a la conclusión de que la contaminación descrita en este trabajo fue provocada por un pseudomonádido procedente de los camarones mismos y que la pasterización subsecuente de los envases había sido inadecuada.

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere expresar su gratitud al Prof. Dr. Luis C. Verna, de esta Cátedra, por el interés prestado en la preparación de este trabajo.

También agradece al Dr. J. M. Shewan el haberle facilitado muchos informes sobre los pseudomonádidos de animales marinos y la realización de los estudios especiales del organismo descrito.

Gracias a la amabilidad del Dr. F. S. Russell, el autor pudo utilizar las instalaciones del Laboratorio de la «Marine Biological Association of the United Kingdom», de Plymouth.

RESUMEN

Se informa sobre el aislamiento de un pseudomonádido verde-fluorescente en un envase de camarones noruegos y se describen detalladamente los caracteres principales del organismo. Se llega a la conclusión de que la bacteria es de origen marino y asociada con los camarones mismos. Y que la pasterización de los envases había sido deficiente.

SUMMARY

The isolation of a green fluorescent pseudomonad from Norwegian prawns is reported, and the principal features of the organism described in detail. Reference to the work of other investigators led to the conclusion that the bacterium was of marine origin and was associated with the prawns themselves, but had not been destroyed owing to inefficient processing in the packing plant.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. CASTELL, C. H. 1948. Differentiation of marine and non-marine cultures of *Pseudomonas*. J. Fisheries Research Board Can., 7, 126.
3. FISCHER, E. 1955. Mikroflora jeltia dorsza baltyckiego. Prace Morsk. Inst. Ryback, Gdyni, 8, 387.
4. HODGKISS, W., y SHEWAN, J. M. 1950. *Pseudomonas* infection in a plaice. J. Pathol. Bacteriol., 62, 655.
5. MOSSEL, D. A. A., e INGRAM, M. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. J. Appl. Bacteriol., 18, 232.
6. SHAIKHIMAHMUD, F., y MAGAR, N. G. 1956. Bacteriological study of Bombay prawns (*Parapeneopsis stylifera* Edwards). J. Sci. Indian Research, 15C, 174.
7. SHEWAN, J. M. 1959. Comunicación personal.
8. SHEWAN, J. M. 1959. Comunicación personal.
9. SHEWAN, J. M. 1960. Comunicación personal.
10. SHEWAN, J. M.; HOBBS, G., y HODGKISS, W. 1960. Determinative scheme for the identification of certain genera of gram negative bacteria, with special reference to the *Pseudomonadaceae*. J. Appl. Bacteriol., 23, 379.

11. SHEWAN, J. M.; HOBBS, G., y HODGKISS, W. 1960. The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 463.
12. SHEWAN, J. M.; HODGKISS, W., y LISTON, J. 1954. A method for the rapid differentiation of certain non-pathogenic asporogenous bacilli. *Nature*, **173**, 208.
13. TARR, H. L. A. 1954. Microbiological deterioration of fish post-mortem, its detection and control. *Bacteriol. Rev.*, **18**, 1.
14. ZOBELL, C. 1946. *Marine Microbiology*. The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA, INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA

UN CASO DE "MANCHAS ROJAS" EN PECES DE ACUARIO

POR

D. A. CONROY

INTRODUCCION

Durante las primeras semanas del año en curso, el autor efectuó un estudio de un interesante caso de «manchas rojas» en peces de acuario. Los peces afectados fueron ejemplares de *Barbus partipentazona* (Fam. *Cyprinidae*) que se mantuvieron juntos con otras variedades en un acuario público de esta capital. La condición descrita se notó únicamente en *B. partipentazona*; los demás peces del acuario permanecieron sanos. En uno de los ejemplares objeto de estudio se habían desarrollado pequeñas manchas rojas sobre la piel de los lados del cuerpo. Con el tiempo dichas manchas aumentaron de tamaño hasta constituir un cuadro tal como se ve en la *figura 1*. En ciertos casos se presentaron síntomas de una ligera descamación. Es importante hacer notar que no todos los peces de esta variedad fueron afectados, por lo cual es posible decir que no se trató de una verdadera epizootia.

MATERIALES Y METODOS

Fueron recibidos en la Cátedra cuatro ejemplares enfermos de *Barbus partipentazona*, de los cuales tres presentaron manchas rojas en los lados, y el cuarto pez tenía también puntitos rojos en la parte superior de la cabeza (*figura 1*). Dos de los peces se aislaron mediante

una red. Con mucho cuidado fue tomada de cada uno, por medio de un hisopo estéril de algodón, una muestra de la parte afectada, o sea, de la «mancha roja» misma. Estas muestras fueron luego sembradas en estrías sobre agar-glucosa en placas, dejándolas a la temperatura ambiente durante cuarenta y ocho horas. Se seleccionó de cada placa una colonia típica, que después de haberla pasado por agua peptonada,

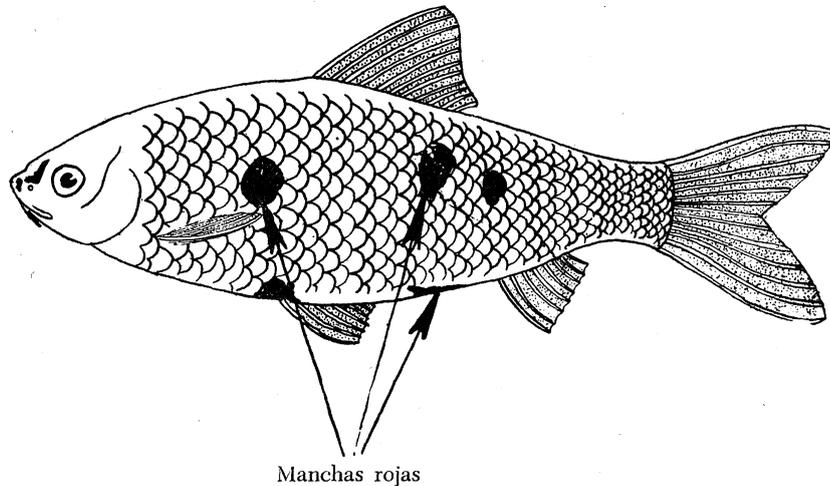


Figura 1

fue inoculada en una serie de hidratos de carbono, agar con almidón, gelatina nutritiva, medio de Koser citratado y agar nutritivo simple. Además, se prepararon antibiogramas duplicados con penicilina (2,5 U. I.), terramicina (10 γ /disco) y kanamicina (30 γ /disco). Al conocer los resultados de este último ensayo, se inoculó a cada pez una solución acuosa de kanamicina a una concentración de 20 γ /g de peso y por vía intraperitoneal.

RESULTADOS

El organismo predominante, un bastoncito móvil y Gram-negativo, se halló en gran cantidad en las dos placas. En cada caso, el organismo produjo ácido, pero no gas con la glucosa, sin actuar sobre lactosa, sacarosa, maltosa, manitol, dulcitol y arabinosa. No se licuó la gelatina;

no se utilizó el citrato como única fuente de carbono; y no produjo hidrólisis del almidón. En peptona produjo rápidamente amoníaco, pero no formó indol. En agar nutritivo se observó una fluorescencia y se notó el olor a pescado que caracteriza a la trimetilamina.

Por los antibiogramas se vio que el organismo no era sensible a la penicilina y terramicina, pero sí a la kanamicina (produjo zonas de inhibición de 12 mm y 14 mm de diámetro, respectivamente, en las dos placas).

Los tres peces que tenían manchas rojas en sus lados mejoraron en forma notable y no presentaron ningún síntoma al fin del tercer día después de la inyección de la kanamicina. En el caso del cuarto pez, se había desarrollado mientras tanto una infección micótica secundaria de las manchas rojas de la cabeza, y no obstante todos los esfuerzos realizados, este pez se murió.

Hasta el presente no ha sido posible conseguir ejemplares de carpas doradas para determinar la patogenicidad experimental del organismo aislado, debido a las dificultades en la compra de peces en esta época del año. Sin embargo, por los resultados obtenidos, parece probable que la bacteria aislada provocó la condición en el primer instante, ya que de las manchas rojas de dos individuos se aisló el mismo organismo. Además, la enfermedad fue curada por la kanamicina, un antibiótico al cual dicho organismo era sensible.

DISCUSION

La producción de fluorescencia en agar, junto con las otras propiedades de la bacteria, permite su inclusión en el grupo que se denomina «pseudomonádidos fluorescentes», algunos de los cuales son patógenos para los peces (4). Es diferenciada de los *Aeromonas* no solamente porque produce fluorescencia, sino también porque ataca a la glucosa y no a los demás hidratos de carbono.

La identificación específica de los pseudomonádidos fluorescentes es una tarea sumamente difícil (2) y por lo general basta esta misma clasificación. El organismo ataca por la vía oxidante a la glucosa, produce fluorescencia y no es sensible a la penicilina y terramicina. Todos estos caracteres corresponden al *Pseudomonas* grupo 1, de Shewan y cols. (3). Por la no licuación de gelatina y la producción de un

olor de trimetilamina, es posible suponer que se trata de una cepa de *Pseudomonas putida*. Se sabe que este organismo provoca una enfermedad caracterizada por manchas rojas de la piel (5) y es de interés notar que miembros de los *Cyprinidae*, familia a la que pertenece *Barbus partipentazona*, son muy susceptibles a esta enfermedad. Los síntomas se parecen a los producidos experimentalmente en carpas doradas por *Ps. putida* (1). El autor cree que la enfermedad fue provocada por una bacteria similar a *Ps. putida*, siendo posiblemente una cepa de la misma.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Prof. Dr. Luis C. Verna, titular de la Cátedra, su interés por este trabajo, y a mi esposa, su ayuda técnica y la ilustración que figura en el texto.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud a la Srta. Haydée di Palma y al Sr. Juan Renaudo, del Gran Acuario Internacional, de Buenos Aires, por haberme facilitado tan gentilmente los peces enfermos.

RESUMEN

Se describe una enfermedad del *Barbus partipentazona* caracterizada por la presencia de manchas rojas en los lados del cuerpo. Se aisló un pseudomonádido fluorescente de los cultivos sacados de las partes afectadas. El estudio realizado demostró que el organismo fue el mismo en todos los casos y que parecía *Pseudomonas putida*. La bacteria era insensible a la penicilina y terramicina, pero sensible a la kanamicina. La enfermedad fue curada por la kanamicina, en una concentración de 20 γ /g de peso, inyectándola en solución acuosa por vía intraperitoneal.

SUMMARY

A disease of *Barbus partipentazona* is described, characterised by the appearance of red spots on the lateral body surfaces. Cultures were taken from the diseased parts in two of these fish, and in both cases produced a heavy growth of a fluorescent pseudomonad. Studies

showed that the same organism was present in each of the two cultures, and that it resembled *Pseudomonas putida*. The bacterium was insensitive to penicillin and terramycin, but sensitive to kanamycin. The condition responded well to treatment with kanamycin at a concentration of 20 γ /g body weight, administered in the form of an aqueous solution by the intraperitoneal route.

BIBLIOGRAFIA

1. CONROY, D. A. 1962. Trabajo no publicado.
2. SHEWAN, J. M. 1960. Comunicación personal.
3. SHEWAN, J. M.; HOBBS, G., y HODGKISS, W. 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria, with special reference to the *Pseudomonadaceae*. J. Appl. Bacteriol, 23, 379.
4. SNIESZKO, S. F. 1958. Freshwater fish diseases caused by bacteria belonging to the genera *Aeromonas* and *Pseudomonas*. U. S. Fish Wildlife Serv., Fishery leaflet. No. 459.
5. VAN DUIJN, C. 1956. Diseases of fishes. Water Life Ltd., Londres.

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

CARACTERES DIFERENCIALES ENTRE RAZAS SENSIBLES Y RESISTENTES A LA BENCIL - PENICILINA, DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

POR
E. PORTO y B. REGUEIRO

INTRODUCCION

Quizás uno de los capítulos más interesantes de la microbiología médica sea el de la lucha contra el estafilococo, sobre la cual Dolman (9) hace una revisión histórica muy completa. En la actualidad el problema se centra sobre todo en los hospitales, donde los antibióticos han sido utilizados intensamente durante los últimos años y el estafilococo se vuelve resistente a casi todos ellos. Por esta razón son de interés actual todos los trabajos que se realicen sobre este germen, como indican diversos autores (11, 38, 50).

Los estafilococos pertenecen a la familia *Micrococcaceae*, del orden Eubacteriales y son células esféricas, Gram-positivas, agrupadas en racimos (30). Por otra parte, Shaw y cols. (47) revisan su clasificación y señalan como raza tipo la FDA.209-P, tipo fago 42D, sensible a la penicilina y que es la que nosotros empleamos originalmente en nuestros trabajos.

Es importante la determinación de los caracteres morfológicos y fisiológicos de los estafilococos, para poder establecer su patogenicidad. Dichos caracteres comprenden especialmente: el tipo de fago, sensibilidad a los antibióticos, y producción de toxinas y enzimas, para determinar correlaciones con la patogenicidad.

La técnica de la tipificación por fagos fue introducida por Wilson y Atkinson (51). Rountree (42) señala treinta y nueve razas de estafi-

lococos, fundadas en el tipo de fago, las cuales se agrupan a su vez en seis grupos serológicos. Borchardt (6), Fahlberg y Marston (16) y Levy y cols. (29), no encuentran correlación entre el tipo de fago y otras propiedades fisiológicas. Bynoe y cols. (7) y Greer y Mynard (25) tienen las mismas dudas en la correlación entre el tipo de fago y la sensibilidad a los antibióticos.

La mayoría de las razas de estafilococos son lisogénicas. Varios investigadores demuestran cambio de tipo de fago por lisogenización *in vitro* de un estafilococo por un fago apropiado. Esta lisogenización puede tener también lugar en condiciones naturales. Podemos señalar que la lisogenicidad, aparte de afectar a la alteración del tipo de fago, puede también hacer cambiar la sensibilidad a los antibióticos. Diversos autores han estudiado estos problemas (2, 24, 28, 43, 44).

La llamada «raza de hospitales» del estafilococo fue descubierta en Australia en 1949, y pertenece al tipo fago 80, que se observó es el de mayor morbilidad, así como también la raza de tipo fago 81. Tanto que estas razas productoras de epidemias se dicen de tipo 80/81, resistente a la penicilina. Es de interés anotar aquí el trabajo de Pattee y Baldwin (39), que estudian el fenómeno de transducción de resistencia a los antibióticos por medio de fagos, demostrando que una raza de tipo 80, productora de penicilinas, puede pasar esta propiedad a otra raza que era sensible a la penicilina.

Es muy importante, desde un punto de vista clínico, la información que puede suministrar la prueba de sensibilidad del estafilococo a los antibióticos, aun cuando los resultados sean variables (14-15, 52). Aun cuando la técnica de dilución en medio líquido es superior a la de difusión en medio sólido, muchos autores prefieren esta última desde un punto de vista biológico y porque en condiciones bien reguladas da resultados cuantitativos muy satisfactorios (4, 37). Con estas técnicas también se pueden realizar pruebas de sinergismo y antagonismo entre antibióticos (12-13, 27, 31-34, 40).

Ya ha pasado algún tiempo desde que Demerec (8) estudió el fenómeno de adquisición de resistencia a la penicilina y demostró que los cultivos de estafilococos contienen un cierto número de mutantes que resisten a la penicilina más que otros. Desde entonces se han propuesto numerosas teorías sobre el fenómeno de resistencia, sin haberse llegado todavía a un acuerdo (1, 10, 26, 36, 45, 49). Al lado de la adquisición de resistencia a los antibióticos por un microorganismo, se

produce otra serie de cambios morfológicos o fisiológicos; lo interesante es saber cuáles son fundamentales y cuáles derivados de los anteriores.

Algunos autores estudian el problema observando las diferencias en necesidades nutritivas entre las razas sensibles y las resistentes (3, 18-19, 23).

Otros autores interpretan el fenómeno desde un punto de vista bioquímico; así, uno dice que la resistencia es una «manifestación del estado alterado de enzimas y proteínas». Fusillo (20) ve que células resistentes a los antibióticos no sintetizan acetaldehído, lo cual indica una disminución en la actividad carboxilásica. Ramsay (41) estudia la cinética de crecimiento en razas sensibles y resistentes de estafilococo al cloranfenicol. Fusillo y Weiss (21) observan que variaciones en sensibilidad son correlativas con la capacidad oxidante de la población bacteriana y que el factor fundamental en la manifestación de la sensibilidad o resistencia depende de la selección por la célula de caminos aerobios o anaerobios del metabolismo. Fusillo y Weiss (22) también demuestran que las razas resistentes han aumentado su capacidad oxidante para los intermediarios de glucosa y logran aislar razas sensibles a partir de las resistentes, por anaerobiosis selectiva. Marco (35) trata de investigar la correlación entre las alteraciones metabólicas que suceden en las razas resistentes y las modificaciones en la estructura celular, sobre todo en la pared celular, donde parece se localizan las enzimas o factores que en los gérmenes sensibles son responsables de la penetración selectiva de drogas y alimentos.

Por otra parte, la resistencia podría orientarse desde un punto de vista genético donde dicha variación de sensible a resistente, se produciría, como afirman Schnitzer y Grunberg (46), por adaptación enzimática, mutación bacteriana y fusión sexual. De todas maneras, el verdadero mecanismo específico y original aún no está claramente demostrado.

Nosotros orientamos el problema hacia el estudio comparativo de razas sensible y resistente de estafilococo con objeto de evaluar los caracteres bioquímicos similares y ver de regularlos. En el presente trabajo, estudiamos el crecimiento del *Staphylococcus aureus* sensible y resistente a la penicilina, en diferentes medios de cultivo (caldo común, caseína hidrolizada, tioglicolato), determinamos el contenido en ácidos nucleicos (ADN y ARN) en ambas razas en crecimiento, vemos la sen-

sibilidad o resistencia a los antibióticos (aislados y asociados) y, por último, determinamos cuantitativamente la sensibilidad de las dos razas a la bencil-penicilina.

MATERIALES Y METODOS

Trabajamos con la raza de *Staphylococcus aureus* 209-P, de tipo fago 42D y sensible a la penicilina (S). Después de una serie sucesiva de pases por agar-caldo aparece una variante, tipo fago 80 y resistente a la penicilina (R). Ambas razas son parecidas en los caracteres morfológicos que se determinan.

Los medios de cultivo empleados en este trabajo son los siguientes: caldo común, agar-caldo, medio antibiótico núm. 3, caseína hidrolizada y tioglicolato, todos de Difco; medio 110, Oxoid; medio de agar con yema de huevo. Para la determinación de las curvas de crecimiento, se inocula 1 ml de cultivo de veinticuatro horas a 37 °C en caldo común, 100 ml del medio de cultivo colocado en un matraz de Kitasato (500 ml). Este lleva un tubo lateral en el que se realizan las lecturas sin necesidad de abrir el matraz. Las pruebas se llevan a estufa a 37 °C o a un agitador de vaivén (90 golpes/min, con 10 cm de desplazamiento) a 30 °C. Las lecturas se realizan en el fotocolorímetro de Kipp, con filtro 55 (en estas condiciones, el inóculo da una turbidez de 70).

Para la determinación de ácidos nucleicos se parte de gérmenes desecados, para lo cual se separan por centrifugación y lavan varias veces; se añade acetona fría, centrifuga, adiciona éter frío, centrifuga y coloca en desecador a vacío, donde se conservan. En una determinada cantidad se realiza el aislamiento y la determinación de los ácidos nucleicos, por los métodos dados por Vaamonde y Regueiro (48).

Para realizar las pruebas de sensibilidad o resistencia a los antibióticos, utilizamos los multidiscos Oxoid, que presentan ventajas evidentes. Se realiza en placas de Petri con medios de agar-caldo y agar-caldo con 5 por ciento de sangre desfibrinada e inoculados con suspensión de estafilococos, que se deja secar a estufa. Se coloca el multidisco e incuba a 37 °C durante veinticuatro horas. Se miden los diámetros de los halos de inhibición. Para las pruebas de sinergismo o antagonismo entre antibióticos, se superponen dos discos de forma que puedan realizarse todas las combinaciones binarias posibles y se sigue la misma técnica anterior.

RESULTADOS

Aplicando los métodos anteriores, estudiamos las diferencias de crecimiento de las razas S y R del estafilococo, en distintos medios de cultivo, determinando a su vez el contenido en ácidos nucleicos en las distintas fases de crecimiento. Por último, determinamos la sensibilidad y resistencia de las razas S y R a diferentes antibióticos, realizando una prueba para ver la influencia de la bencil-penicilina a distintas concentraciones, sobre el crecimiento de ambas razas.

a) Crecimiento de las razas S y R, del estafilococo

Se preparan los medios de cultivo, que en cantidades de 100 ml se colocan en matraces de 500 ml y se esterilizan a 121 °C durante quince minutos. Se inoculan con 1 ml de cultivo de estafilococo en caldo común a 37 °C durante veinticuatro horas (14×10^8 gérmenes/ml). Una serie de matraces se incuban a 37 °C en estufa y otra serie de ellos se pone en agitador de vaivén a 30 °C. Se realizan lecturas en fotocolorímetro a diferentes períodos de tiempo y los resultados se expresan gráficamente.

Se pueden deducir algunas generalizaciones de los resultados de crecimiento en: caldo común, caseína hidrolizada y tioglicolato (*figuras 1-6*).

Observamos que con aireación, el orden de crecimiento máximo es el siguiente: caldo común, caseína hidrolizada y tioglicolato, con diferencias muy pequeñas; en todos los casos, la raza R da mayor crecimiento que la raza S.

En el crecimiento sin aireación, a 37 °C, las diferencias son mayores entre los tres medios, siendo el orden: caseína hidrolizada, caldo común y tioglicolato. En el primero, el crecimiento es doble que en el último. También en este caso, la raza R da crecimiento superior a la raza S. En relación con lo anterior, el crecimiento con aireación es doble que en reposo en el caso del medio de caseína hidrolizada, triple en el caso del caldo común y cuatro veces en el caso del medio de tioglicolato.

Realizamos una prueba para ver de diferenciar el estafilococo R del S, por cultivo en medio de agar-yema de huevo, incubando a 37 °C durante veinticuatro horas. Observamos (*figura 7*) una diferencia cuan-

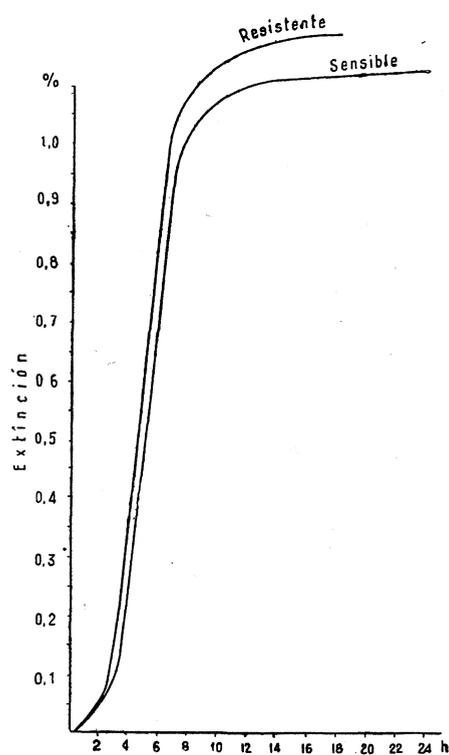


Figura 1. Caldo común. Con agitación, a 30 °C

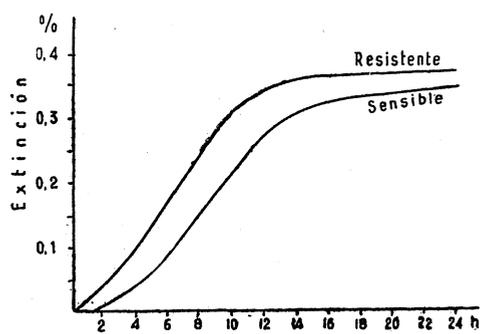


Figura 2. Caldo común. En reposo, a 37 °C

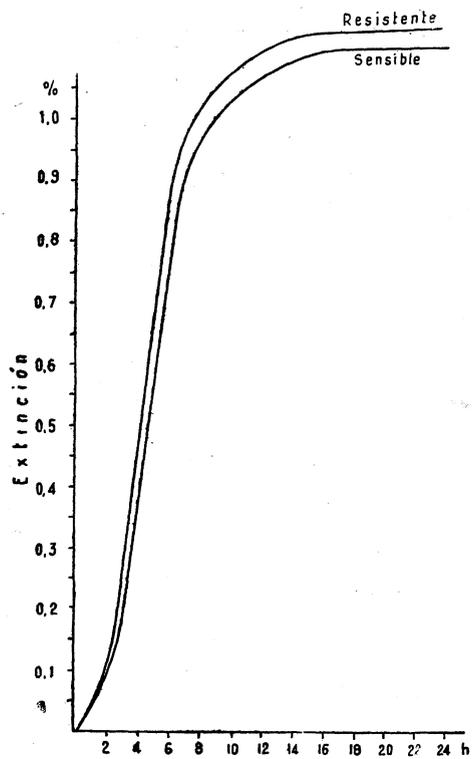


Figura 3. Caseína hidrolizada. Con agitación, a 30 °C

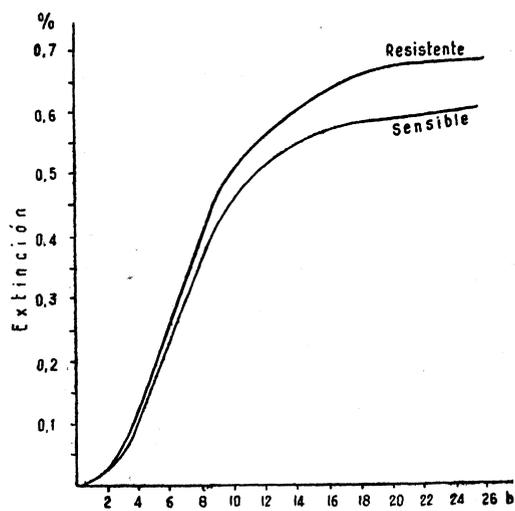


Figura 4. Caseína hidrolizada. En reposo, a 37 °C

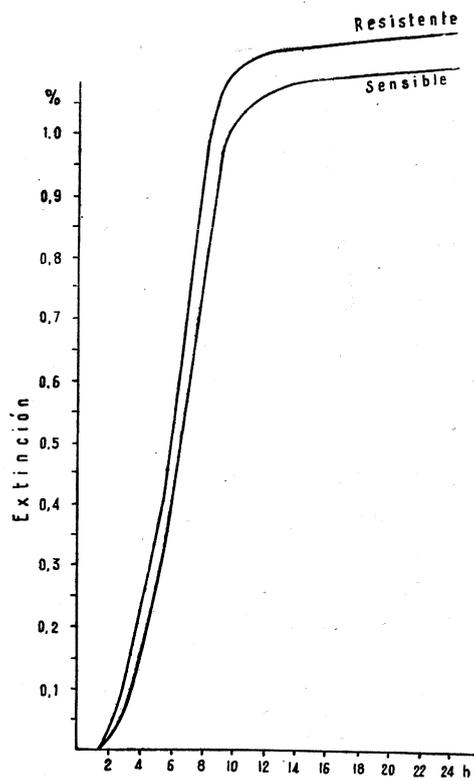


Figura 5. Tioglicolato. Con agitación, a 20 °C

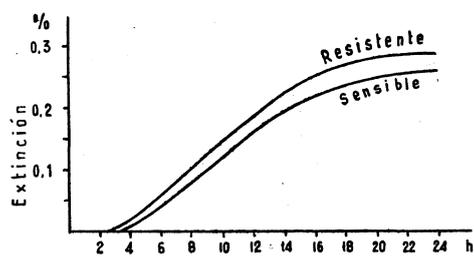


Figura 6. Tioglicolato. En reposo, a 37 °C

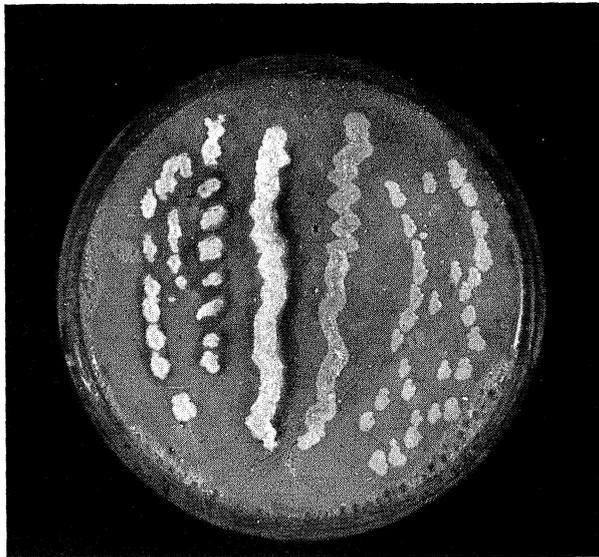


Figura 7

titativa de crecimiento y un halo de hidrólisis alrededor del cultivo de la raza S. Si la placa la dejamos dos-tres días a temperatura ambiente, el halo se hace más intenso, así como la pigmentación amarillo naranja de las colonias, también más pronunciada en la raza S. Si bañamos las placas con una solución de azul nilo (1 por ciento), observamos que las colonias de la raza R fijan más el colorante que las colonias de la raza S. Esta diferencia no se aprecia si el cultivo se hace en medio agar-caldo, lo cual indica es debida a la presencia de la yema de huevo. Deberá comprobarse esta técnica de diferenciación en mayor número de razas de estafilococos para poder generalizar los resultados obtenidos aquí y emplearla en la práctica.

b) Ácidos nucleicos en las razas S y R del estafilococo

Si consideramos que las diferencias bioquímicas se originan de diferencias genéticas, es lógico pensar en el papel fundamental que juegan los ácidos nucleicos en dichas diferencias. Por esta razón realizamos una experiencia inicial para ver la composición cuantitativa en ácidos nucleicos, en las dos razas con que trabajamos. Aplicamos los métodos generales, cultivando los gérmenes en agitación a 30 °C y en medio de caldo común. Colocamos dos series de matraces iguales, a

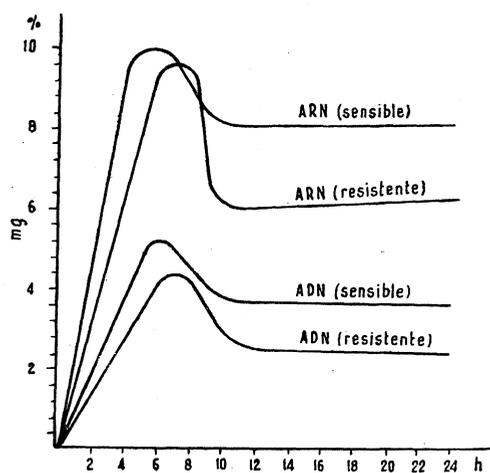


Figura 8

intervalos de tiempo separamos un matraz de cada raza, centrifugamos los cultivos y los desecamos en acetona. Con todas las muestras, determinamos los ácidos nucleicos por los métodos generales. Con los resultados construimos una gráfica y un cuadro (*figura 8, cuadro 1*).

Cuadro 1. Cultivos en caldo común, 28 °C, con agitación

Horas	ARN		ADN	
	S	R	S	R
	mg, porcentaje			
6	10,0	9,3	5,2	4,0
8	9,0	9,3	4,3	4,3
10	8,0	6,0	3,7	2,7
24	8,0	6,3	3,5	2,3

S = Sensible R = Resistente

Comparando la gráfica de ácidos nucleicos con la correspondiente al crecimiento en caldo común en agitación, vemos que la mayor concentración de los mismos se forma en la raza R, casi al final de la fase logarítmica, lo cual indica que la biosíntesis de los ácidos nucleicos en la raza R es más lenta, a pesar de que su crecimiento es más rápido y mayor. En todos los casos, el comienzo de la fase estacionaria se caracteriza por disminución y estabilización de la biosíntesis de los dos ácidos nucleicos. También en todos los casos, el contenido en ARN es mayor que en ADN. En contenido total, produce más la raza S que la R, como señalamos anteriormente.

En otra prueba realizada en las mismas condiciones y determinando el contenido en ácidos nucleicos a las veinticuatro horas, encontramos los resultados siguientes: para la raza S: 8,24 % de ARN y 4,20 % de ADN; para la raza R: 7,50 % de ARN y 1,95 % de ADN (en todos los casos, los resultados se expresan en porcentaje de peso seco de gérmenes). Las conclusiones que se derivan de esta experiencia corroboran los resultados de la anterior.

c) Sensibilidad a los antibióticos de las razas S y R del estafilococo

Hemos observado al principio que la diferencia fundamental entre las razas S y R, aparte del tipo de fago, es su sensibilidad a la penicilina. Creemos de interés el conocer ahora si la adquisición de resistencia a un antibiótico se acompaña de variaciones en sensibilidad a otros antibióticos.

Realizamos esta experiencia en la forma indicada en los métodos generales, con los multidiscos. Se incuban las placas y se miden los ha-

Cuadro 2

	Caldo-agar		Caldo-agar		Sangre-agar	
	S	R	S	R	S	R
Diámetro del halo de inhibición, mm						
Eritromicina, 10 γ	21	24	20	25	20	24
Novobiocina, 5 γ	21	24	17	24	17	16
Nitrofurantoina, 200 γ	21	24	18	23	19	18
Bacitracina, 5 U. I.	21	24	16	16	17	17
Tetraciclina, 10 γ	18	21	17	19	17	17
Cloranfenicol, 10 γ	20	20	19	19	20	18
Oleandomicina, 5 γ	18	18	18	14	20	16
Neomicina, 10 γ	12	14	12	17	14	14
Sulfofurazol, 100 γ	\pm	+	12	+	16	+
Penicilina G, 1,5 U. I.	36	+	25	+	25	+
Estreptomina, 10 γ	+	+	10	+	+	+
Polimixina B, 10 γ	+	+	+	+	+	+

+ = Crecimiento total, no inhibición \pm = Crecimiento débil, no inhibición

los de inhibición, cuyos diámetros se expresan (cuadro 2). La resistencia se expresa por crecimiento total o débil. Viendo estos resultados, se puede afirmar que la raza S es sensible en mayor o menor grado a todos los antibióticos probados, menos a la estreptomina y polimixina B; demostrando la máxima sensibilidad a la penicilina G. Por otra parte, la raza R es sensible a todos los antibióticos menos a la estrep-

tomicina, polimixina B, penicilina G y sulfofurazol; la máxima sensibilidad la muestra hacia la eritromicina.

Durante los últimos años se viene empleando cada vez más las combinaciones de dos o más agentes antibacterianos para combatir las infecciones. En el particular caso del estafilococo, casi es aconsejable, por la facilidad de adquisición de resistencia cuando se le trata por un agente quimioterápico. Por estas últimas razones, estudiamos aquí la sensibilidad de las razas S y R, a combinaciones binarias de anti-

Cuadro 3

	Sensible												
	Tetraciclina	Cloranfenicol	Eritromicina	Sulfofurazol	Novobiocina	Oleandomicina	Penicilina	Estreptomina	Bacitracina	Nitrofurantoina	Polimixina	Neomicina	
	Diámetro del halo de inhibición, mm												
Resistente	Tetraciclina	20	26	18	22	22	16	16	18	18	20	22	
	Cloranfenicol	16		28	18	18	28	14	10	10	22	16	24
	Eritromicina	24	18		28	26	28	30	26	26	26	18	22
	Sulfofurazol	±	12	28		18	9	18	12	24	19	+	±
	Novobiocina	26	25	24	22		20	22	24	25	26	22	25
	Oleandomicina	20	25	28	18	20		18	16	24	18	21	24
	Penicilina G	16	±	22	+	24	17		16	20	20	18	14
	Estreptomina	13	18	26	14	24	19	±		17	22	13	12
	Bacitracina	17	18	24	15	24	22	17	17		22	16	17
	Nitrofurantoina	18	18	26	20	26	24	20	20	18		19	24
	Polimixina B	24	14	21	+	22	20	+	14	15	14		17
	Neomicina	24	18	20	+	24	18	±	15	16	18	16	

bióticos por el método dado en la parte experimental y que suman un total de 66. Los resultados se expresan como en el caso anterior (cuadro 3).

Podemos hacer la observación general de un aumento de sensibilidad para la raza S, si se compara con los antibióticos aislados, aunque

esto puede ser debido a la acción aditiva de dos antibióticos. Encontramos resistencia de esta raza a las asociaciones sulfofurazol-polimixina B y sulfofurazol-neomicina. Encontramos la máxima sensibilidad a las asociaciones eritromicina-penicilina G, eritromicina-sulfofurazol, eritromicina-cloranfenicol y eritromicina-oleandomicina. En contraposición al efecto de los antibióticos aislados, la raza S es sensible a la asociación estreptomina-polimixina B.

En relación con la sensibilidad de la raza R a las asociaciones de antibióticos, debería mostrar resistencia a las asociaciones de los antibióticos a los que muestra resistencia aisladamente (penicilina G, sulfofurazol, estreptomina y polimixina B).

Pero se encuentra que es sensible a las asociaciones penicilina G-estreptomina, sulfofurazol-estreptomina y polimixina B-estreptomina. En cambio, es resistente a una combinación de dos antibióticos, neomicina-sulfofurazol, a los que es sensible separadamente. Casos de antagonismo entre antibióticos son posiblemente penicilina G-cloranfenicol, sulfofurazol-tetraciclina, penicilina G-estreptomina y penicilina G-neomicina. Las asociaciones de mayor actividad, es decir, donde se manifiesta más el efecto sinérgico, son sulfofurazol-eritromicina y oleandomicina-eritromicina; las demás asociaciones dan menos.

d) Sensibilidad de las razas S y R a la bencil-penicilina

La afirmación de raza sensible o raza resistente a la penicilina, que venimos empleando hasta ahora, no puede realizarse en términos absolutos. En general, por sensible, se entiende que lo es a bajas concentraciones y por resistente, que lo es a concentraciones elevadas. Aquí realizamos una experiencia para concretar la sensibilidad y la resistencia de nuestras razas

Se hace crecer el estafilococo, razas S y R, en caldo común, con agitación y a 30 °C durante veinticuatro horas y en diferentes concentraciones de bencil-penicilina. Se determina el crecimiento en fotocolorímetro y el resultado se expresa gráficamente (*figuras 9-10*).

En relación con la raza S, se observa respuesta de crecimiento a concentraciones de penicilina de 0,05-0,55 U. I./ml. A medida que aumenta la concentración de antibiótico, disminuye el crecimiento total y la velocidad del mismo, seguramente por disminuir el número de variantes más o menos resistentes, sobre todo a partir de una concen-

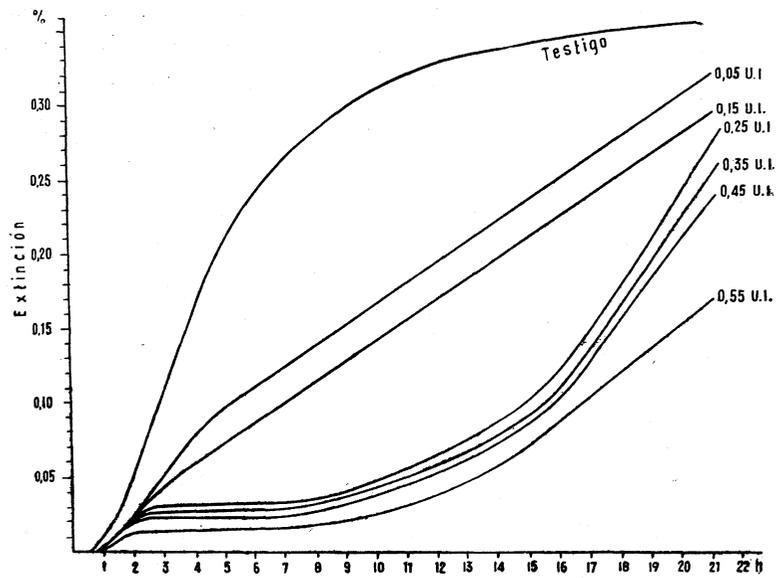


Figura 9. Raza S

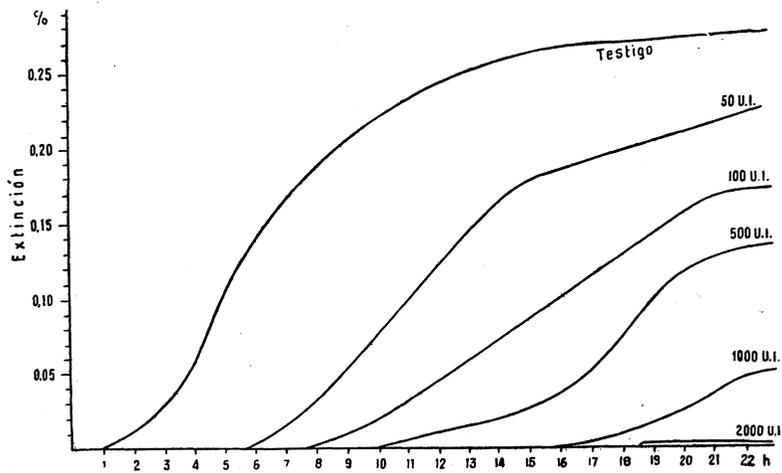


Figura 10. Raza R

tración de 0,25 U. I./ml, en que tras un período estacionario de doce horas, hay un crecimiento rápido.

Con relación a la raza R, la respuesta de crecimiento es a concentraciones de penicilina de 50-2.000 U. I./ml. A esta última concentración no hay respuesta de crecimiento. Como en el caso anterior, al aumentar la concentración de antibiótico, disminuye el crecimiento total y la velocidad del mismo, seguramente también por disminuir el número de variantes más o menos resistentes.

DISCUSION

Por las razones expuestas al comienzo de este trabajo, se afirma que el estafilococo patógeno aún presenta perspectivas de investigación, sobre todo en lo referente al estudio de los mecanismos bioquímicos, origen de su patogenicidad y sobre los mecanismos de defensa del organismo. En relación con esto, es interesante el estudio de los llamados factores de patogenicidad, así como el estudio de los posibles mecanismos a los que el estafilococo debe la adquisición de resistencia a los agentes quimioterápicos. Todos los trabajos del estafilococo deben estar presididos por el concepto de su variabilidad, por lo que lo que es verdad para una raza no lo es para otra; por esto deben mirarse con recelo todas las posibles generalizaciones que se realicen.

Orientados en este sentido, los trabajos sobre estafilococo pueden realizarse sobre un número crecido de razas para investigar factores comunes, o bien sobre unas pocas razas para estudiar el mayor número de factores de patogenicidad y relaciones entre ellos. Bajo este último aspecto es como nosotros enfocamos nuestros trabajos sobre el estafilococo. Trabajamos con una raza de *Staphylococcus aureus* 209P, de tipo fago 42D y sensible a la penicilina y un mutante del mismo de tipo fago 80 y resistente a la penicilina.

Para iniciar un trabajo sobre la patogenicidad del estafilococo es importante determinar sus caracteres morfológicos y fisiológicos, para ver posibles diferencias y correlaciones. Las razas antes mencionadas no presentan diferencias apreciables, aparte del tipo de fago y la sensibilidad a los antibióticos.

Algunos autores estudian el problema de la nutrición de las diferentes razas de estafilococo, no observando diferencias esenciales, aun-

que, por ejemplo, Boniece (5) observa que las razas resistentes tienen una mayor capacidad de síntesis de aminoácidos y vitaminas esenciales para el crecimiento. En el presente trabajo se hace un estudio de crecimiento de raza sensible y raza resistente en diferentes medios y condiciones físicas. En todos los casos, la raza resistente se desarrolla más que la sensible, quizás debido a su mayor capacidad de síntesis, como demostró el autor anterior. En general, la aireación favorece el crecimiento en todos los casos.

Se busca una reacción diferencial entre razas sensibles y razas resistentes y encontramos que el crecimiento de las razas S y R, en medio con yema de huevo, da diferencias notables. La raza S se rodea de un halo de hidrólisis, que se hace más intenso y la pigmentación más pronunciada si se adiciona azul nilo, que, por otra parte, es más fijado por la raza R que por la S. Como decíamos anteriormente, conviene extender esta prueba a gran número de razas, para poder realizar una conclusión de carácter general.

Decíamos anteriormente que diferencias de caracteres se deben a diferencias genéticas y que en esto juegan papel importante los ácidos nucleicos. Hacemos determinación cuantitativa de ambos ácidos (ARN y ADN) en las dos razas, encontrando diferencias sensibles, que deberán estudiarse más profundamente. Así, los valores, tanto de ARN como de ADN, son mayores en la raza S, a pesar del mayor crecimiento de la raza R; esto va de acuerdo con la conclusión de Marco (35), de que las razas resistentes disminuyen la acumulación de ácidos nucleicos en la fase logarítmica de crecimiento.

Otra cuestión de interés es investigar si el cambio de resistencia a la penicilina afecta a la sensibilidad hacia otros antibióticos. Las dos razas, S y R, son sensibles a todos los antibióticos probados, a excepción de la estreptomycin y polimixina B. La adquisición de resistencia a penicilina por la raza R se acompaña de adquisición de resistencia al sulfofurazol, lo que parece indicar un parecido mecanismo de resistencia. Al tiempo, la raza R se hace más sensible a la eritromicina y oleandomicina, antibióticos parecidos estructuralmente.

Hoy día es frecuente el empleo de asociaciones de agentes antimicrobianos en la terapia de las infecciones. Numerosos trabajos se publicaron últimamente sobre el posible sinergismo o antagonismo de dichas asociaciones. Nosotros comprobamos la acción de sesenta y seis asociaciones sobre nuestras razas S y R, habiendo señalado anterior-

mente diferentes casos de sinergismo y de antagonismo y de efectos aditivos, encontrando algunas conclusiones parecidas a las de Furezt y cols. (17). No hay que extrañarse de resultados no concordantes con otros autores, después de que Greer y Mynard (25) demuestran que un cambio de tipo de fago se acompaña de cambio de antibiograma y viceversa, y cambios de tipos de fago son muy abundantes y diferentes.

En nuestros trabajos se observa, en general, una mayor sensibilidad de la raza sensible a las asociaciones de antibióticos, siendo las combinaciones más activas para las dos razas las que contienen eritromicina. Estos resultados obtenidos *in vitro* no deben de llevarse a la práctica hasta su comprobación clínica.

Los cultivos de estafilococo no pueden considerarse homogéneos, pues cultivos de razas sensibles, siempre contienen algunas variantes resistentes y viceversa. El origen de estas variantes puede ser la mutación o la variación; aún no se conoce el mecanismo original. De aquí se deduce que tanto sensibilidad como resistencia no son términos absolutos, sino niveles de una escala de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

Para demostrar esto, se hace una experiencia de crecimiento de las razas S y R en diferentes concentraciones de bencil-penicilina. La raza S responde a concentraciones de 0,05-0,55 U. I./ml y la raza R a concentraciones de 50-2.00 U. I./ml. En los dos casos, a medida que aumenta la concentración del antibiótico, disminuye el crecimiento total y la velocidad del mismo, lo cual seguramente significa que existen variantes resistentes en el inóculo de estafilococo, o bien se hacen resistentes por adaptación y luego se desarrollan más lentamente por unidad de tiempo. La raza sensible la podemos inhibir completamente con 1 U. I./ml, y la resistente, con 2.000 U. I./ml dentro de las veinticuatro horas en que se lleva la experiencia. Esto último debe de considerarse en el tratamiento clínico, cuando se dan dosis de antibiótico sin conocer el nivel de sensibilidad del agente infeccioso.

CONCLUSIONES

Estudiando la sensibilidad y resistencia del *Staphylococcus aureus* a los antibióticos, encontramos una variación de sensible a resistente a la penicilina, que se acompaña de cambio de tipo de fago de 42D a 80.

Los caracteres morfológicos y fisiológicos de ambas razas son muy similares; aunque en pruebas de crecimiento en diferentes medios y condiciones físicas, la raza resistente crece más que la sensible, siendo la aireación favorable a ambas razas. Se sugiere una reacción diferencial por cultivo en medio con yema de huevo y adición de azul nilo.

El contenido en ARN y ADN es mayor en la raza sensible que en la resistente.

La adquisición de resistencia a la penicilina y el cambio de tipo de fago se acompañan en el presente caso, de adquisición de resistencia al sulfofurazol y aumento de sensibilidad a la oleandomicina y la eritromicina. Esta última, en asociaciones de antibióticos, parece actúa sinérgicamente contra las dos razas.

La raza sensible responde proporcionalmente a concentraciones 0,05-0,55 U. I./ml de bencil-penicilina, mientras que la resistente lo hace de 50-2.000 U. I./ml. Esto indica niveles de susceptibilidad, más que resistencia.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. R. E. O. Williams, del «Laboratory Reference *Staphylococcus*», del C.P.H.S., de Londres, la tipificación de los dos estafilococos con que trabajamos. Asimismo, agradecemos a Penibérica, S. A., el envío de la raza original de estafilococo y el suministro de alguno de los medios con que trabajamos. A la Dra. R. Vaamonde agradecemos las determinaciones de ácidos nucleicos realizadas.

RESUMEN

Trabajando en el problema de resistencia del *Staphylococcus aureus* a los antibióticos, encontramos una variación espontánea de sensible a resistente a la bencil-penicilina (penicilina G), acompañada de variación en el tipo de fago, del 42D al 80. En el presente trabajo estudiamos los caracteres morfológicos y de cultivo de ambas razas, encontrando que la raza resistente crece más en todos los medios de cultivo utilizados, contiene menos cantidad de ADN y de ARN y al tiempo que adquiere resistencia a la penicilina, la adquiere al sulfofurazol. Esta raza se inhibe completamente con 2.000 U. I./ml de bencil-penicilina.

SUMMARY

Working on the *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics, we find by chance, a spontaneous variation from sensible to resistant at bencil-penicillin (penicillin G), accompanied of a variation of phage type from 42D to 80. In the present work, we studied the morphological and cultural characteristics of both strains. We find that the resistant strain have a superior growth in all the culture mediums that we use; contain less amount of RNA and DNA; at same time that get resistance to penicillin G, get resistance to sulfafurazol. That strain its is inhibited by 2,000 I. U./ml of penicillin G.

BIBLIOGRAFIA

1. BARBER, M. 1953. Penicillin-resistant and penicillin-dependent staphylococcal variants. J. Gen. Microbiol., 8, III.
2. BLAIR, J. E., y CARR, M. 1961. Lisogeny in staphylococci. J. Bacteriol., 82, 984.
3. BONDI, A.; KORNBLUM, J., y PHALLE, M. ST. 1954. The aminoacids requirements of penicillin resistant and penicillin sensitive strains of *Micrococcus pyogenes*. J. Bacteriol., 68, 617.
4. BONDI, A.; SPAULDING, E. H.; SMITH, D. E., y DIETZ, C. C. 1947. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. Am. J. Med. Sci., 213, 221.
5. BONIECE, W. S. 1958. Nutritional requirements of staphylococci with *in vivo* acquired antibiotic resistance growth a minimal medium. Antibiotics & Chemotherapy, 6, 209.
6. BORCHARDT, K. E. 1958. A study of staphylococci concerning bacteriophage typing antibiotic sensitivity patterns and factors of virulence Antibiotics & Chemotherapy, 8, 564.
7. BYNOE, T.; ELDER, R. H., y COMTOIS, R. D. 1956. Phage-typing and antibiotic-resistance of staphylococci isolated in a general hospital. Can. J. Microbiol., 2, 346.
8. DEMEREC, M. 1945. Genetics changes in *Staphylococcus aureus* producing strains resistant to various concentrations of penicillin. Ann. Missouri Botan. Garden, 32, 131.
9. DOLMAN, C. E. 1956. The *Staphylococcus*, seven decades of research. Can. J. Microbiol., 2, 189.

10. EAGLE, H.; FLEISCHMAN, R., y LEVY, M. 1952. Development of increased bacterial resistance to antibiotics. *J. Bacteriol.*, 63, 623.
11. ELEK, S. D. 1958. *Staphylococcus pyogenes* in relation to Medicine. Livingstone Co. Ltd.
12. ELEK, S. D., y HILSON, C. R. F. 1953. Laboratory aspects of combined antibiotic treatment. *Brit. Med. J.*, 2, 1.290.
13. ELEK, S. D.; HILSON, C. R. F., y JEWELL, P. 1954. Combined agar diffusion and replica plating technique in the study of antibacterial substances. *J. Clin. Pathol.*, 7, 37.
14. ERICSSON, H. 1960. The paper disc method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, 1.
15. ERICSSON, H., y SVARTZ-MALMBERG, G. 1959. Determination of bacterial sensitivity *in vitro* and its clinical evaluation. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6, 41.
16. FAHLBERG, W. J., y MARSTON, J. 1959. Comparaison of physiological properties of certain phage-typable coagulase-positive staphylococci. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 102, 349.
17. FUREZT, S.; ZANGAGLIA, O., y SCOTTI, R. 1958. The effect of fixed combinations of antibiotics on staphylococci *in vitro*. *Antibiotics & Chemotherapy*, 8, 571.
18. FUSILLO, M. H. 1955. Growth of versatile staphylococci. I. *Antibiotics & Chemotherapy*, 5, 480.
19. FUSILLO, M. H. 1955. Growth of versatile staphylococci. II. *Antibiotics & Chemotherapy*, 5, 486.
20. FUSILLO, M. H. 1956. Selection of stable multiple antibiotic-resistant variants of *Micrococcus pyogenes* in the absence of antibiotics. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6, 125.
21. FUSILLO, M. H., y WEISS, D. L. 1958. Intermediary metabolism of antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive staphylococci. *Antibiotics & Chemotherapy*, 8, 21.
22. FUSILLO, M. H., y WEISS, D. L. 1959. Selection of antibiotic-sensitive staphylococci from antibiotic-resistant populations by 2.4.dinitrophenol and sodium salicylate. *Antibiotics & Chemotherapy*, 9, 455.
23. GALE, E. F., y RODWELL, A. W. 1948. Aminoacids metabolism of penicillin-resistant staphylococci. *J. Bacteriol.*, 55, 161.
24. GORRIL, R. A. 1957. Studies on lisogeny of staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 17, 254.
25. GREER, J. E., y MYNARD, R. R. 1960. Related association of staphylococcal antibiograms and phage-type. *Bacteriol. Proc.*, 102.
26. HUGHES, W. H. 1952. Variation in penicillin resistance in single-cell cultures of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 6, 175.
27. JAWETZ, E., y GUNNISON, J. B. 1952. Studies on antibiotic synergism and antagonism. A scheme of combined antibiotic action. *Antibiotics & Chemotherapy*, 2, 243.

28. KARSKA, B.; KOZAK, W.; NARBUTOWICZ, B., y STOLARSKA, A. 1960. The lysogenicity of staphylococci isolated in Poland. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 577.
29. LEVY, E.; RIPPON, J. E., y WILLIAMS, R. E. O. 1953. Relation of bacteriophage pattern to some biological properties of staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 9, 97.
30. MACKIE, T. J., y MC CARTNEY, J. E. 1962. *Handbook of Bacteriology*. 10th edition. Livingsstone Co. Ltd.
31. MANN, P. H. 1959. Additional studies comparing the *in vitro* susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* to various antibiotics. *Antibiotics & Chemotherapy*, 9, 755.
32. MANTEN, A. 1954. Synergism and antagonism between antibiotic mixtures containing erythromycin. *Antibiotics & Chemotherapy*, 4, 1228.
33. MANTEN, A. 1956. The action of antibiotics combinations on pathogenicity staphylococci *in vitro*. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6, 480.
34. MANTEN, A., y WISSE, M. J. 1961. Antagonism between antibacterial drugs. *Nature*, 192, 671.
35. MARCO, A. DI. 1959. Biochemical interpretation of antibiotic resistance of microorganisms. *Proc. Intern. Congr. Biochem.* 4th Congr., Viena, 1958.
36. MAYR-HARTING, A. 1953. The acquisition of penicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Oxford. *J. Gen. Microbiol.*, 13, 9.
37. MORLEY, D. C. 1945. A single method of testing the sensitivity of wound bacteria to penicillin and sulphathiazol by the use of impregnated blotting paper disc. *J. Pathol. Bacteriol.*, 57, 579.
38. MUDD, S. 1959. The *Staphylococcus* problem. *Sci. American*, 200, 41.
39. PATTEE, P. A., y BALDWIN, J. N. 1961. Transduction of resistance to chlortetracycline and novobiocin in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 82, 875.
40. PORTOLÉS, A. 1961. Técnicas microbiológicas para estudiar el comportamiento de asociaciones antibióticas. *Microbiol. Españ.*, 14, 17.
41. RAMSAY, H. M. 1958. The growth of sensitive strain of *Micrococcus pyogenes* in the presence of varying concentrations of chloramphenicol. *Antibiotics & Chemotherapy*, 8, 250.
42. ROUNTREE, P. M. 1949. The serological differentiation of staphylococcal bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.*, 3, 164.
43. ROUNTREE, P. M. 1959. Changes in the phage-typing patterns of staphylococci following lysogenization. *J. Gen. Microbiol.*, 20, 620.
44. ROUNTREE, P. M., y ASHESHOV, E. H. 1961. Further observations on changes in the phage-typing pattern of phage type 80/81 staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 26, 111.
45. SAZ, A. K., y EAGLE, H. 1953. The co-killing of penicillin sensitive and penicillin resistant bacteria at low concentrations of the antibiotic. *J. Bacteriol.*, 66, 347.

46. SCHNITZER, R. J., y GRUNBERG, E. 1957. Drug resistance of microorganisms. Academic Press.
47. SHAW, C.; STITT, J. M., y COWAN, S. T. 1951. Staphylococci and their classification. J. Gen. Microbiol., 5, 1.010.
48. VAAMONDE, R., y REGUEIRO, B. 1957. Estudios del metabolismo de ácidos nucleicos de bacterias. I. Microbiol. Españ., 10, 461.
49. VOUREKA, A. 1952. Induced variations in a penicillin-resistant *Staphylococcus*. J. Gen. Microbiol., 6, 352.
50. WELCH, H. 1959. Antibiotic therapy for staphylococci diseases. Medical encyclopedia.
51. WILSON, G. S., y ATKINSON, J. D. 1945. Typing of staphylococci by the bacteriophage method. Lancet, 1, 647.
52. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1961. Standardization of methods for conducting microbial sensitivity test. Tech. Rept. Ser. No. 210.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FOTORREACTIVACION BACTERIANA (*AEROBACTER AEROGENES*)

POR

L. C. VERNA y TERESA S. DAURAT

Las bacterias, de manera análoga a otras formas de vida, están influidas por las radiaciones, siendo los efectos de éstas, en general, nocivos, sobre todo si son de corta longitud de onda; las de la zona visible del espectro, infrarrojas y hertzianas, son mucho menos efectivas.

Las distintas radiaciones son el resultado de la propagación de diferentes formas de energía a través del espacio. Esta propagación puede hacerse por medio de ondas o por partículas atómicas o subatómicas, que se mueven a gran velocidad por la acción de campos eléctricos o por proyección de sustancias radiactivas.

Cuando esta energía radiante llega a algún objeto y choca contra él, puede ser absorbida, y la energía cedida por la absorción está regida por la ley relacionada con el cuanto de energía propagada por la radiación, y es igual al producto de su frecuencia por la constante de Planck:

$$E = h \cdot \nu = h \frac{c}{\lambda}$$

E = energía utilizable para absorción

ν = frecuencia

h = constante de Planck

λ = longitud de onda de la radiación

c = velocidad de la luz

El efecto nocivo de las radiaciones sobre los organismos, puede estar en relación con reacciones químicas características, y se supone

que las bacterias pueden ser muertas por las radiaciones ionizantes, o no serlo, por los motivos siguientes:

- a) Inactivación total o parcial del equipo enzimático bacteriano.
- b) Producción de sustancias tóxicas por descomposición de compuestos celulares (ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos...), o como productos finales de reacciones comunes que se producen por la formación de iones pares.
- c) Mutación letal.
- d) Formación de sustancias tóxicas en el medio circundante.
- e) Acción combinada de las radiaciones sobre las bacterias y sobre el medio circundante.

Hollaender (6) demostró que la energía necesaria para inactivar al 90 por ciento de las bacterias, con radiaciones de 2.537 Å varía desde 11.000 a 197.000 erg/cm². Una lámpara de mercurio de baja presión (de 30 W), da alrededor de 800 erg. cm²/s, a 1 m de distancia; esto indica que en 1-2 min de exposición, las bacterias mueren en su gran mayoría.

Empleando radiaciones de longitud de onda de 3.500 -4.500 Å, se necesitará 1.000.000 de veces más energía para obtener el mismo efecto.

El efecto de las radiaciones en experimentos de corta duración depende de la relación tiempo-intensidad, es decir, que duplicando la intensidad necesitaremos la mitad del tiempo, lo que nos dice que la acción depende de la cantidad total de radiaciones.

En 1949, Kelner (10), así como Novick y Szilard, observaron un extraño comportamiento de las bacterias sometidas a la acción de la luz ultravioleta, y luego expuestas, antes de hacer recuentos por cultivo, a la acción de la luz visible. Dulbeco, en 1949-50, observó el mismo fenómeno, trabajando con bacteriófagos.

Kelner (11), al intentar obtener mutantes de *Streptomyces griseus* sometiéndole a la acción de la luz ultravioleta, se encontró con un inesperado aumento de sobrevivientes (gran número de colonias) en los cultivos que después del tratamiento anterior y antes de incubarlos, habían sido expuestos por casualidad, solamente breve tiempo a la acción de la luz visible, comparados con los cultivos solamente sometidos a la acción de las radiaciones ultravioletas. Así, los cultivos sometidos a la acción de la luz visible aumentaban en mucho el número de colonias. A este fenómeno se le designa indistintamente con los nombres de fotorreactivación, fotorrecuperación, fotorrenovación y fotorrestau-

ración; pero prevalece en la actualidad, por haber sido el más aceptado, el de fotorreactivación.

Ahora bien; se obtiene la *fotorreactivación* si se someten ciertas especies microbianas (desarrolladas en medios sólidos o líquidos) a la acción de la luz visible, después de haber sido sometidas a la acción de la luz ultravioleta.

El lapso máximo aceptado por los diversos autores entre una y otra es de tres horas, ya que después de ese intervalo, generalmente, no se produce la fotorreactivación.

La luz ultravioleta debe ser administrada en tal cantidad que pueda comprobarse la muerte del 90-99 por ciento de las células microbianas en los cultivos testigos no sometidos a la fotorreactivación. Este fenómeno, no sólo da vida a un gran porcentaje de bacterias «muertas» por la acción de la luz ultravioleta, sino que también restaura las condiciones genéticas de las mismas, pues prácticamente desaparecen los mutantes ocasionados por la acción de dichas radiaciones.

Muchos experimentadores estudiaron la longitud de onda necesaria para obtener la máxima fotorreactivación, con la especie estudiada en cada caso. Así, para *Escherichia coli*, el promedio es de 3.750 Å, mientras que para el *Streptomyces griseus*, es de 4.350 Å; es decir, que la máxima actividad fotorreactivante está en general entre las más largas longitudes de onda del ultravioleta y las más cortas de la zona visible del espectro. Sin embargo, para el *Staphylococcus aureus* se ha obtenido la máxima fotorreactivación con 6.600 Å. Para utilizar las distintas bandas de longitud de onda, los investigadores utilizan filtros (que no son muy adecuados), o monocromadores (más convenientes).

A pesar de todo lo expuesto, debemos hacer notar que el fenómeno de fotorreactivación no es un hecho general que acontece regularmente en el campo microbiano. Por numerosos trabajos se ha demostrado que existen grupos bacterianos, y aun hasta familias, cuyas especies no son fotorreactivables, o que lo son algunas de sus especies y no lo son otras; se da también el caso de que dentro de una misma especie hay inconstancia de reactivación, según sea la cepa tratada (1, 3, 4, 9, 10-12, 16). Parece ser que esas especies o esas cepas no poseen el mecanismo bioquímico necesario para provocar la fotorreactivación. Pero en muchos casos ha sido posible fotorreactivar mutaciones ocasionadas por la acción de la luz ultravioleta, así como trans-

formaciones en el sistema enzimático, en la pigmentación, en la morfología, etc.

Por la amplitud y por las consecuencias de la forreactivación, se define a este fenómeno como la restauración o recuperación de las lesiones observables, que generalmente conducen a la muerte, que ocasiona la luz ultravioleta en un sistema biológico por el empleo de radiaciones de mayor longitud de onda que la utilizada para lesionar a la célula.

Además, en la fotorreactivación deben tenerse en cuenta las condiciones en que se realizan las experiencias, pues influyen grandemente en los resultados obtenidos (aunque en la inactivación tengan menos importancia); estas condiciones son, entre otras, el pH del medio, el estado físico y fisiológico del microorganismo; se supone que la fotorreactivación es posible gracias a la presencia de cromóforos, tanto dentro del núcleo como quizá en el citoplasma. La naturaleza, constitución, y aun el número de cromóforos son desconocidos. La composición química estaría constituida por moléculas o partes de moléculas de ADN, ARN, proteínas, porfirinas, riboflavinas, piridoxal, fosfatos, etc.

Algunos investigadores sugieren que sólo las lesiones nucleares son fotorreactivables.

Siguiendo el camino abierto por Kelner (10) en tan interesante tema, hemos iniciado nuestras experiencias sobre fotorreactivación bacteriana, empleando para nuestros ensayos una cepa de *Aerobacter aerogenes* 21.

Como luz ultravioleta, utilizamos la emitida por un tubo de 15 W (General Electric) a una distancia de 20 cm de las bacterias que se van a irradiar.

En la primera etapa, determinamos la dilución microbiana más conveniente para estos ensayos; establecimos la cantidad de cultivo en caldo de veinticuatro horas de *Aerobacter aerogenes* que deberíamos sembrar en superficie en placas de Petri con caldo agar, para que el desarrollo de los testigos diera una cantidad adecuada de colonias.

Por repetidos y diferentes ensayos logramos establecer el tiempo de exposición a la luz ultravioleta, así como determinar la distancia del tubo emisor necesaria para reducir adecuadamente el número de colonias de microorganismos desarrolladas después de la incubación. Pudimos establecer así, que para el microorganismo en estudio, una

exposición de 20-25 s, a una distancia de 20 cm de la fuente emisora, nos daba una reducción superior al 95 por ciento, comparado con el testigo.

Para lograr la fotorreactivación, utilizamos sucesivamente, en nuestros primeros ensayos, una lámpara de arco voltaico para microscopía, una lámpara común de 200 W, y por último, una lámpara puntiforme para microscopía, de 6 V, 5 A.

Los resultados obtenidos, por ser más uniformes y mejores, nos inclinaron a seguir nuestras experiencias con la última de las lámparas nombradas.

En experimentos ulteriores, agregamos a la lámpara puntiforme un filtro que permitía el paso de radiaciones de alrededor de 4.000 Å, que es el término medio de las longitudes de onda que se consideran con mejores propiedades fotorreactivantes.

Significó un gran adelanto y ventaja reemplazar en nuestros ensayos nuestros cultivos en medio sólido por suspensiones de microorganismos en medio líquido.

En estas últimas condiciones, conseguimos en el 40 por ciento de las experiencias, aproximadamente, fotorreactivación positiva posterior a la irradiación ultravioleta que llegaba a matar el 95-100 por ciento de las células bacterianas.

Conseguido un instrumental más adecuado, pudimos avanzar en estos estudios tratando de contribuir a desentrañar el complejo mecanismo por el cual células «muertas» por unas radiaciones pueden ser «revividas» por otras.

Continuamos nuestras experiencias, según se detalla más adelante, y estudiamos la influencia que distintos factores (tiempo de fotorreactivación, temperatura, medio de cultivo, edad del cultivo, etc.) ejercen sobre este fenómeno. El mejor estudiado hasta ahora, y que es el que pasamos a detallar en la presente comunicación, es la influencia que sobre la capacidad de recuperación celular ejerce el tiempo durante el cual se someten las bacterias a la acción de la luz fotorreactivante a 37 °C, inmediatamente después de la irradiación ultravioleta, que «mata» de 95-100 por ciento de las células microbianas.

MATERIALES Y METODOS

Para la irradiación ultravioleta utilizamos un tubo de 15 W de «General Electric», que emite luz de 2.537 Å.

Como foco reactivante, una lámpara de mercurio de 125 W HPR, de Phillips (Holanda), en la que el 50 por ciento de las radiaciones emitidas están comprendidas entre 3.300-4.400 Å; y un baño de agua regulable para trabajar a temperatura determinada y constante durante la fotorreactivación.

El ambiente en que se irradiaban los cultivos y se procedía a la siembra de los mismos antes de proceder a la fotorreactivación, estaba iluminado con luz amarilla.

Como medio de cultivo utilizamos el M 9 con glucosa, y para las diluciones, agua gelatinosa al 1 por ciento.

Partiendo de cultivos de *Aerobacter aerogenes* con cantidades de microorganismos variables entre $3-8 \times 10^8$ se efectuaron diluciones apropiadas en el agua gelatinosa, determinando la cantidad de unidades viables del cultivo original por recuento de colonias.

Una cantidad de, más o menos, 10 ml de dilución apropiada fue colocada en placa de Petri de 10 cm de diámetro, de modo que el espesor del líquido no fuera superior a 3-4 mm; sometimos la placa destapada a la irradiación ultravioleta a una distancia de 20 cm del tubo emisor, agitando continuamente durante el tiempo de exposición, que generalmente fue de 20-25 s.

Previa comprobación de la supervivencia de los microorganismos por recuento de unidades viables, posterior a la irradiación, sembrando en placas de Petri, operando en cuarto iluminado con luz amarilla, sometimos parte de la solución irradiada (3-4 ml en un tubo de ensayo) a la acción fotorreactivante de la lámpara de mercurio a una distancia de 15 cm y a temperatura constante de 37 °C, por inmersión en baño de agua.

Después de fotorreactivar, se sembró por diseminación en placa de Petri, en caldo-agar; se consignan el tiempo de exposición y la temperatura.

La finalidad de nuestros ensayos fue buscar las condiciones necesarias para obtener el 100 por ciento de las pruebas con fotorreactiva-

ción positiva, ya que en el método inicialmente descrito, sólo alcanzamos el 40 por ciento.

La lámpara de mercurio utilizada nos permitió, en las condiciones de nuestra experiencia, obtener absoluta constancia en los resultados. Conseguimos así fotorreactivación en la totalidad de los casos de las pruebas realizadas con el *Aerobacter aerogenes*, variando únicamente el porcentaje de células recuperadas si se variaban las condiciones de experimentación.

Se establecieron las condiciones convenientes para poder determinar siempre por recuentos de unidades viables, el porcentaje de «muertes» por luz ultravioleta y de recuperación posterior por fotorreactivación.

Las diluciones 10^4 para irradiar y 10^5 para fotorreactivar, mostraron ser en la mayor parte de los casos, las más convenientes para el recuento de colonias y para establecer con la fórmula de Kelner

$$100 \frac{NL - ND}{No - ND}$$

el porcentaje de fotorreactivación.

Como dijimos anteriormente, establecimos la influencia que sobre la capacidad de recuperación del *Aerobacter aerogenes* ejerce el tiempo que actúa la luz fotorreactivante a temperatura constante de 37 °C. Los resultados obtenidos con el *A. aerogenes* defieren, como veremos, con el obtenido por distintos investigadores, trabajando con *Escherichia coli* B/r (cepa que aumentó su resistencia a la irradiación ultravioleta por cinco generaciones sucesivas), que ha sido el microorganismo más estudiado en fotorreactivación.

RESULTADOS

De los numerosos ensayos realizados, elegimos para ilustrar los resultados obtenidos, dos ejemplos.

En la *figura 1* partiendo de un cultivo con 5×10^5 de células microbianas y con «muerte» por radiación ultravioleta (exposición de 25 s) del 99,8 por ciento de los microorganismos, empleando la fórmula de Kelner ya citada, a los 2 min de fotorreactivación obtuvimos un 20 por ciento, que asciende a un máximo de 53 por ciento a los 5 min,

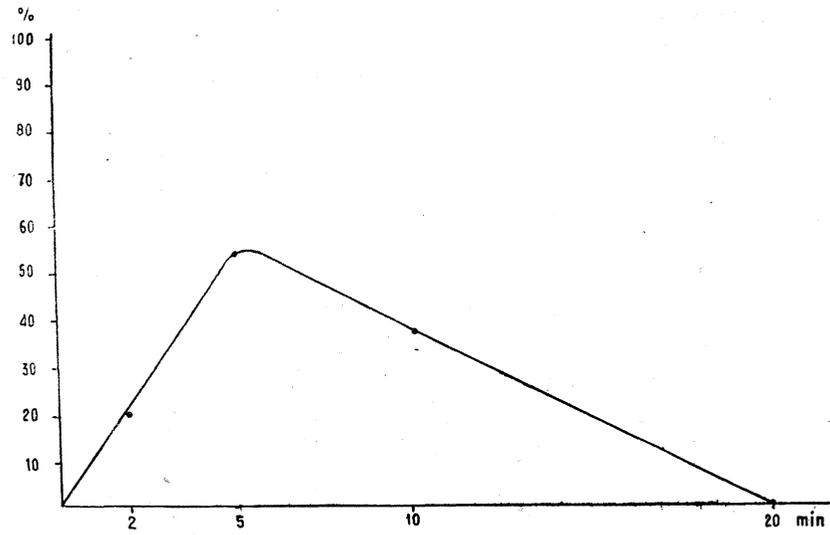


Figura 1

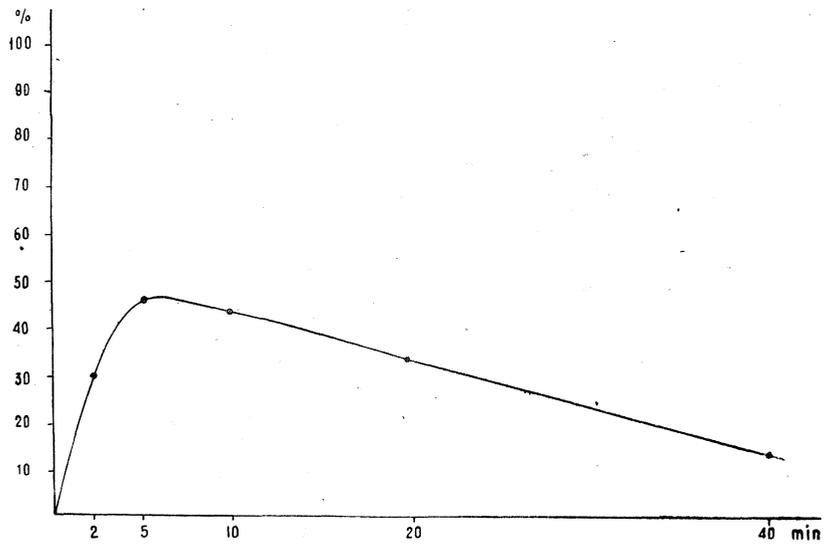


Figura 2

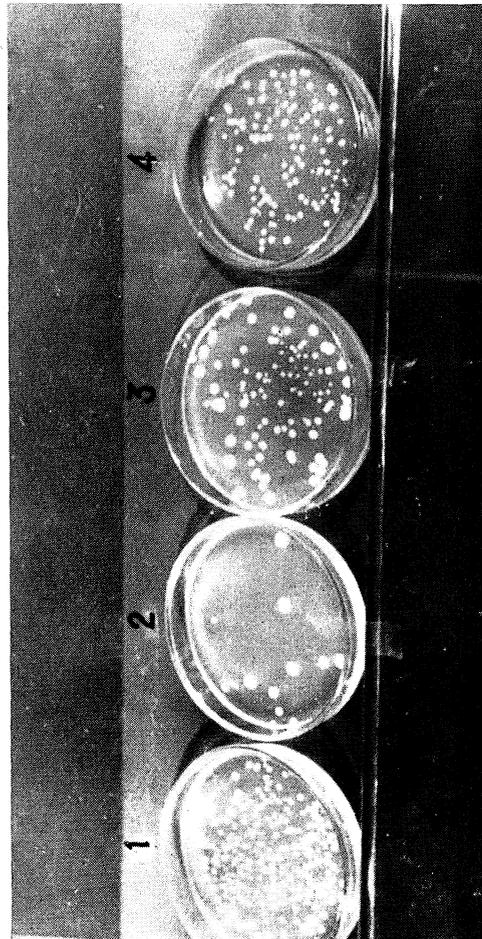


Figura 1

para descender a los 10 min a 38 por ciento y alcanzar el 0 por ciento a los 20 min. Si bien en la mayor parte de nuestras pruebas, después de 10 min de fotorreactivación se inicia un descenso en el porcentaje de la misma, no ha sido lo más común llegar a 0 por ciento a los 20 min, como ha sucedido en este caso.

En la *figura 2* (otro de los ejemplos de las muchas pruebas realizadas) podemos observar que con una cantidad de microorganismos inicial de 4×10^8 «matamos» después de 25 s de exposición a las radiaciones ultravioletas, el 99,8 por ciento de las células. Fotorreactivamos a 37 °C, obteniendo a los 2 min la recuperación de un 30 por ciento, que llega a un máximo de 47 por ciento a los 5 min, manteniéndose constante después de 10 min (45 por ciento); desciende paulatinamente con el tiempo de exposición a 34 por ciento a los 20 min, y a 15 por ciento después de 40 min de exposición.

La *figura 3* reproduce parcialmente los resultados obtenidos. Placa 1: testigo; placa 2: resultante de la acción de la luz ultravioleta; placa 3: resultante de la fotorreactivación a los 5 min; placa 4: ídem, a los 10 min.

De la observación de las gráficas, se deduce que hay una cantidad de energía (fotones) que absorbida por la célula «muerta» por las radiaciones ultravioletas le permite su recuperación, anulando el daño que de otro modo sería mortal; pero que si esa cantidad de energía aumenta dentro de ciertos límites, empieza a ser perjudicial para algunas de las células, hasta llegar a la muerte de todas.

CONCLUSIONES

En el transcurso del trabajo se realizaron más de cincuenta experiencias sobre fotorreactivación, empleando el *Aerobacter aerogenes*, y se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se consiguió la «muerte» de alrededor del 99 por ciento de las células de *A. aerogenes* tratadas por la luz ultravioleta, empleando un tubo de la «General Electric», de 15 W, a una distancia de 20 cm, en un tiempo aproximado de 25 s de exposición.

2. Por distintas fuentes de luz visible se consiguió la reactivación de las mismas, en un promedio que fue del 40 por ciento, hasta llegar

paulatinamente al 100 por ciento de los casos, a medida que las técnicas empleadas fueron más eficientes.

3. Mientras la mayor parte de los autores encuentran como tiempo óptimo de fotorreactivación 20 min, nos encontramos que en el *A. aerogenes* hay un porcentaje apreciable de fotorreactivación a los 2 min de exposición, para llegar a un máximo entre 5-10 min y disminuir luego con más exposición.

RESUMEN

Hemos confirmado el fenómeno de la fotorreactivación en el *Aerobacter aerogenes*, utilizando una lámpara que emite el 50 por ciento de radiaciones comprendidas entre 3.300 y 4.400 Å y empleando distintas técnicas que pudimos ir perfeccionando hasta conseguir, en el 100 por ciento de las pruebas realizadas, *fotorreactivación positiva*.

Se está estudiando la influencia que distintos factores ejercen sobre este fenómeno. El mejor estudiado hasta ahora, y del que informamos en esta primera comunicación, ha sido la influencia que sobre las células que «reviven» o se «recuperan», ejerce el tiempo que actúa la luz fotorreactivante, después de sometidas a una radiación ultravioleta que mata de 95-100 por ciento de las células.

En la mayor parte de los microorganismos estudiados por otros autores, fundamentalmente el *Escherichia coli* B/r que ha sido el más utilizado, el tiempo fotorreactivante óptimo encontrado ha sido 20 min.

Nosotros hemos llegado a establecer que con el *Aerobacter aerogenes*, la fotorreactivación se inicia inmediatamente, siendo ya apreciable el porcentaje de células recuperadas a los 2 min, para llegar a un máximo entre 5-10 min; una mayor exposición tiende a disminuir la capacidad fotorreactivante.

SUMMARY

The authors have confirmed the phenomenon of photoreactivation with *Aerobacter aerogenes*, using a lamp emitting 50 per cent radiations between 3,300-4,400 Å. By the use of different techniques this figure was improved upon until a *positive photoreactivation* was obtained in 100 per cent of the experiments performed.

The influence which various factors exercise upon this phenomenon is being studied in detail. In the present communication is described the influence upon the cells which «survive» or «recuperate» of the time in which the light source acts, after submission to an ultraviolet radiation which destroys 95-100 per cent of the total cells.

For the greater part, *Escherichia coli* B/r has been the micro-organism used by other workers, and the optimum time for photoreactivation has been described as 20 minutes.

The authors have established that with *Aerobacter aerogenes*, photoreactivation commences immediately, an appropriate percentage of cells being recovered after 2 minutes. A maximum is reached between 5 and 10 minutes, a longer exposure tending to reduce the photoreactive capacity.

BIBLIOGRAFIA

1. BELLAMY, W. D., y GERMAIN, M. T. 1955. An attempt to photoreactivate ultraviolet inactivated streptococci. *J. Bacteriol.*, 70, 351-52.
2. DEMEREC, M., y LATARJET, R. 1946. Mutation in bacteria induced by radiations. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 11, 38-50, 76, 80, 158 y 160.
3. GOODGALL, S. H.; RUPERT, C. S., y HERRIOT, R. M. Photoreactivation of *H. influenzae* transforming factors for streptomycin resistance by an extract of *E. coli* B. En Mc. ELROY y B. GLAS (Ed.). *The chemical basis of heredity*, 1957. Johnson Hopkins Press Baltimore.
4. GOUCHER, C. R.; KAMEI, J., y KOCHOLATY, W. 1956. Ultraviolet inactivation and photoreactivation of *Azotobacter*. *J. Bacteriol.*, 72, 184-88.
5. HOLLANDER, A., y DUGGAR, B. M. 1938. The effect of sublethal doses of monochromatic ultraviolet radiation on the grow properties of bacteria. *J. Bacteriol.*, 36, 17-37.
6. HOLLANDER, A. 1943. Effects of long ultraviolet and short visible radiation (3,500-4,000 Å) on *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 46, 531-41.
7. HOLLANDER, A., y STAPLETON, G. E. 1959. Fundamentals aspects of radiation protection from a microbiological point of view. *Physiol. Revs.*, 33, 77-84.
8. JAGGER, J. 1958. Photoreactivation. *Bacteriol. Rev.*, 22, 99-142.
9. JOHNSON, F. H.; FLAGER, E. A., y BLUM, H. F. 1950. Relation of oxigen to photoreactivation of bacteria after ultraviolet radiation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 74, 32-35.
10. 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.
11. KELNER, A. 1950-51. Action spectra for photoreactivation of ultraviolet irradiated *E. coli* and *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Physiol.*, 34, 835-52.

12. KELNER, A. 1953. Growth, respiration, and nucleic acid synthesis in ultraviolet irradiated and in photoreactivated *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 252-62.
13. KELNER, A.; BELLAMY, W. D.; STAPLETON, G. E., y ZELLE, M. R. 1955. Symposium on radiation effects on cells and bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 19, 22-44.
14. LEA, D. E. 1956. Action of radiations on living cells. Macmillan Co. N. Y.
15. ROBERTS, R. B., y ALDOUS, E. 1949. Recovery from ultraviolet irradiation in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 57, 363-75.
16. STUY, J. H. 1955. Photoreactivation of ultraviolet inactivated bacilli. *Biochim. et Biophys. Acta*, 17, 206-11.
17. STUY, J. H. 1956. Studies on the mechanism of radiation inactivation of microorganisms. II. Photoreactivation of some bacilli and of the spores of two *B. cereus* strains. *Biochim. et Biophys. Acta*, 22, 238-40.
18. THIMANN, K. V. 1955. The life of bacteria, Macmillan Co, N. Y.
19. WELLS, P. H. 1956. Photoreactivation of ultraviolet-inactivated diphosphopyridine nucleotide. *Science*, 124, 31-32.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISILOGIA VEGETAL
SECCION DE BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DEL SUELO

ACCION LITICA DE UN *STREPTOMYCES* SOBRE LEVADURAS: OBTENCION DE PROTOPLASTOS

POR

CONCEPCIÓN GARCÍA-MENDOZA y J. R. VILLANUEVA

Durante los últimos años se han publicado una serie de trabajos relacionados con la facilidad de varios microorganismos de clarificar suspensiones turbias de bacterias, pudiendo destacarse varias especies de *Bacillus* y *Streptomyces* entre aquellos organismos de acción lítica más señalada. En muchos de estos casos es posible que se produzca una substancia antibiótica que puede actuar como inductora de la autólisis o facilitando alteraciones en la permeabilidad celular, siendo por tanto responsable del proceso lítico. En muchos otros, uno se puede encontrar con verdaderos agentes líticos, si bien sólo en casos contados el mecanismo de tal lisis ha sido estudiado e interpretado (12).

Las actividades líticas de las especies de *Streptomyces* parecen ser debidas a una variedad de sistemas con carácter exo-enzimático. La existencia de una enzima parecida a la lisozima se supuso en experimentos iniciales llevados a cabo por Nakhimsouskaia (8) y Salton (11), a causa de la gran similitud entre el espectro lítico de algunos filtrados de cultivos de *Streptomyces* y el de la lisozima de la clara de huevo. Los *Streptomyces* además secretan otra enzima bacteriolítica del tipo de la polisacaridasa, aislada por McCarty (7) y caracterizada por su espectro lítico, totalmente diferente del de la lisozima o del de la actinomicetina, denominada enzima de Ghuysen (6).

Es posible pensar que las enzimas descritas por Ghuysen y McCarty son diferentes a la enzima que denominamos estrepzima, de un organismo aislado en este laboratorio, el *Streptomyces* GM, motivo de la

presente comunicación, ya que el espectro de acción sobre los microorganismos es totalmente diferente, actuando las dos primeras sobre varias especies de bacterias, y la segunda sobre levaduras y hongos, y no sobre bacterias, si bien aparte de esta acción específica nada conocemos aún de su modo de acción (3).

La obtención de protoplastos ha resultado ser de un valor considerable en estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos, en un elevado número de bacterias de donde se han obtenido. Igualmente se podría pensar de la utilidad de estas estructuras homogéneas en otros microorganismos. Intentos de obtención de protoplastos o estructuras semejantes a los protoplastos, en levaduras, han sido fructíferos gracias a la aplicación de la enzima del caracol, *Helix pomatia*, por Necas (9) y Eddy y Williamson (1), si bien este método cuenta con algunas limitaciones.

La presente comunicación describe un método enzimático parecido, que ha dado lugar a una elevada proporción de protoplastos en varias especies de levaduras y hongos, si bien el agente lítico es de carácter microbiológico, el sistema extracelular enzimático del *Streptomyces* GM.

MÉTODOS Y RESULTADOS

Obtención de paredes celulares de levaduras

Crecida la levadura en un medio sintético (medio Hansen: sacarosa, 50 g; peptona, 10 g; fosfato magnésico, 3 g, y agua, 100 cm³) se procede a su lavado por centrifugación y resuspensión en agua destilada, tres veces. A continuación se prepara una suspensión de dichas levaduras [40-50 mg (peso seco)/cm³] y tomando 10 cm³ de esta suspensión y 10 cm³ de partículas de vidrio Ballotini núm. 12, se someten a la acción del desintegrador de Mickle. Se sigue el proceso de desintegración mediante observación microscópica, y cuando el rendimiento se aproxima al 100 por ciento, las paredes celulares se separan de los restantes materiales por centrifugación diferencial, a base de lavados con soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones, disolución de cloruro sódico y finalmente con agua destilada, según la técnica descrita por García Mendoza y Villanueva (4). Las paredes así obtenidas son de gran pureza, como se ha comprobado en los microscopios óptico y electrónico (*figura 1*).

Aislamiento de los Streptomyces líticos sobre paredes celulares de levaduras

Se prepara un medio solidificado con agar a base de sales y paredes celulares de levaduras como única fuente de carbono y nitrógeno, fundamentalmente según el procedimiento descrito por Salton (11).

Sobre estas placas sembramos más de 80 *Streptomyces* diferentes, previamente aislados de suelos españoles en este laboratorio, pudiendo así seleccionar los que presentaban la propiedad de digerir las paredes celulares utilizando sus componentes como fuentes de carbono y nitrógeno, pasando después a trabajar con el *Streptomyces* GM, por considerarlo el más activo, no sólo en cultivo en medio sólido, sino también en líquido. La figura 2 muestra la acción lítica de algunos de estos organismos.

Cultivo del Streptomyces GM en medios líquidos

Con el fin de investigar la producción de la enzima (s) lítica, se han ensayado los siguientes medios:

a) Medio a base de paredes y sales, semejante al utilizado en las placas. Paredes aisladas, 10 mg (peso seco)/cm³; PO₄HK, 0,1 por ciento; SO₄Mg · 7H₂O, 0,05 por ciento.

b) Medio a base de levaduras intactas [alrededor de 50 mg (peso seco)/cm³] y sales, semejante al anterior.

c) Medio «GAE». Glucosa, 10 g; asparagina, 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; PO₄HK-, 0,5 g; SO₄Mg · 7H₂O, 0,5 g; (SO₄)₃Fe₂, 0,01 g; agua, 100 cm³, y agua destilada, 900 cm³.

d) Medio «Triptglu». Triptona, 5 g; almidón, 10 g; extracto de carne, 3 g; glucosa, 2 g; PO₄HNa₂, 1,2 g; PO₄H₂K, 0,8 g; SO₄Mg · 7H₂O, 0,5 g; SO₄Fe · 7H₂O, 0,1 g; agua destilada, 1.000 cm³.

e) Medio «6». Hidrolizado de caseína, 3 g; glucosa, 10 g; agua destilada, 1.000 cm³.

f) Medio para estímulo de proteasas. NO₃Na, 2 g; PO₄HK₂, 1 g; ClK, 1 g; SO₄Mg · 7H₂O, 1 g; hidrolizado de caseína, 10 g; agua destilada, 1.000 cm³.

La incubación se efectuaba a 28 °C y a 37° C, unas veces, en condiciones estáticas y, otras, en agitación.

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad lítica se refiere, han sido diversos, por lo que este aspecto se encuentra sujeto a una investigación más intensa, pero las observaciones preliminares nos hacen pensar que la producción de la enzima, de carácter extracelular y por tanto recogiénola en los filtrados de los cultivos, se relaciona con la edad del cultivo, esporulación del *Streptomyces* y fase de lisis del mismo.

Determinación de la actividad lítica

La medida de la actividad enzimática se practica viendo el descenso de densidad óptica que sufre una suspensión de paredes celulares o células intactas de levaduras, cuando se adiciona un pequeño volumen del líquido metabólico obtenido según ya se ha indicado.

En algunos de los medios ensayados en los que la actividad parecía ser baja, dicho caldo se precipita con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 60 por ciento de saturación, se redisuelve el precipitado en un pequeño volumen de agua destilada y se dializa también frente a agua destilada. En una investigación previa se vio cómo la actividad lítica aumenta considerablemente en la fracción del 60 por ciento de saturación de sulfato amónico.

Las condiciones del ensayo eran las siguientes: a 2,5 cm³ de suspensión de paredes celulares de levadura en tampón 0,1-0,05 M de fosfato a pH 6,8, con una densidad óptica de 0,5-1, se adicionan 0,5 cm³ del filtrado del cultivo con supuesta actividad lítica y se incuban a 37 °C. Las lecturas se efectúan en el espectrofotómetro Beckman, con una longitud de onda de 600 m μ , en diferentes tiempos, siguiendo la disminución de densidad óptica que sufren las suspensiones de paredes.

De igual modo se realizó el experimento con suspensiones de células vivas intactas y los resultados obtenidos fueron idénticos. Sin embargo, cuando la suspensión empleada es la de células muertas por el calor en autoclave, la acción lítica fue menor. Cuando el *Streptomyces* GM crecía en el medio de paredes celulares o de células intactas de levadura, así como en medio «Triagl», los filtrados mostraban una actividad lítica elevada. Estos experimentos, expresados en forma más extensa, se encuentran en fase de publicación (5).

Obtención de protoplastos

Dado que la acción lítica sobre células vivas es notoria, según acabamos de indicar, es lógico pensar en la posibilidad de obtención de protoplastos de varias especies de levaduras e incluso de hongos.

Primeramente elegimos la levadura *Candida utilis*, porque, además de ser muy sensible a la acción de la enzima, presenta la particularidad de su forma alargada (figura 3) y, por consiguiente, puede ser más espectacular la formación de protoplastos. El procedimiento empleado fue el siguiente: se hace crecer la levadura en 20 cm³ de medio a base de 0,3 por ciento de extracto de levadura y 2 por ciento de glucosa, incubando durante la noche a 28 °C y con agitación. Este cultivo sirve de inóculo sobre otros 80 cm³ del mismo medio, que se incuban durante tres o cuatro horas en las mismas condiciones, encontrándose al cabo de este tiempo todas las células en fase de crecimiento activo. Se lavan las células con agua destilada y se resuspenden en el tampón de fosfato 0,1-0,05 M a pH 6,8, adicionado de manitol en proporción de 0,8. Sobre esta suspensión se añaden 0,2-0,5 cm³ de la disolución del agente enzimático y se incuba a 28 °C, con agitación suave. A las tres o a las cuatro horas ya se pueden observar gran cantidad de protoplastos (figura 4).

Ensayando con otros tipos de levaduras, tales como *Saccharomyces* PM-1 y SM-100, *Sacch. elegans*, *Sacch. mestrus*, *Sacch. pastorianum*, *Sacch. rosei*, *Sacch. fragilis*, *Kloeckera apiculata* y *Torula utilis*, se han obtenido igualmente protoplastos con rendimientos diferentes. Un cultivo de *Torulopsis aedis* ha resultado ser totalmente resistente a la acción lítica, y anteriormente a la desintegración en el Mickle, por lo que este organismo está siendo objeto de una más profunda investigación.

Una serie de estudios preliminares han demostrado también la posibilidad de emplear la preparación enzimática del filtrado de cultivo del *Streptomyces* GM para la obtención de protoplastos de varias especies de hongos, bien empleando micelio (10) o esporas (2).

DISCUSION

En este trabajo se expone el procedimiento que hemos seguido hasta obtener protoplastos de diferentes levaduras, con un sistema enzimático lítico del *Streptomyces* GM. Es de hacer notar que se trata de un método diferente al ya conocido utilizando la enzima del intestino del *Helix pomatia*, y presentando sobre aquél ciertas ventajas, como son mayor estabilidad y rapidez de acción. Además, las preparaciones de protoplastos obtenidas del modo expuesto muestran gran limpieza, mostrando ausencia total de restos de paredes celulares, a diferencia de las obtenidas con la enzima del caracol.

Por el momento, dado que este trabajo se encuentra en su fase preliminar de desarrollo, no podemos precisar aún el modo de acción del sistema lítico del *Streptomyces* GM, suponiéndose que la acción proteolítica es reducida. El hecho de que el preparado lítico ataque a las células de levaduras vivas, pudiera sugerir la presencia de una sustancia antibiótica que interfiere de algún modo sobre la pared celular. Además, existen pruebas bastante precisas de otra acción de carácter enzimático, como se desprende de que el factor lítico es termolábil, precipita del filtrado del cultivo con 60 por ciento de saturación de sulfato amónico y no es difusible cuando se dializa.

Una especulación, fruto de una observación reciente, podría ser el que el filtrado tuviera varias acciones líticas, algunas de ellas capaces de actuar sobre las paredes de levaduras y otras sobre las de hongos, con composición química de aquellas estructuras muy diferente. La que actúa sobre hongos, a diferencia de la otra, parece ser menos estable.

RESUMEN

Se describen las técnicas de obtención de paredes celulares de levaduras y el aislamiento de un organismo con propiedades líticas sobre dichas paredes, así como la obtención de líquidos metabólicos activos del *Streptomyces* GM. Se ha demostrado cómo con tales preparaciones se obtienen protoplastos de levaduras y de hongos, por lo que el método ofrece las mayores posibilidades.

El material activo parece estar formado, al menos, por un sistema enzimático, ya que se precipita por una saturación de sulfato amónico del 60 por ciento, es termolábil y no dializable. La enzima (s) se produce principalmente durante la fase de esporulación del organismo.

SUMMARY

A method of preparation of yeast cell-wall has been described, as well as the isolation of a new organism named *Streptomyces* GM, which shows lytic properties on the cell-walls of a number of species of fungi.

The lytic substance was mainly produced during sporulation of the organism in the culture fluid and precipitated in a 60 per cent saturated solution of ammonium sulphate, being thermolabil and non dialyzable.

Spherical, osmotically sensitive, protoplasts are liberated from a number of yeast and molds by the action of the *Streptomyces* enzyme preparation.

BIBLIOGRAFIA

1. EDDY, A. A., y WILLIAMSON, D. H. 1957. *Nature*, 179, 1.252.
2. GARCÍA-ACHA, I., y J. R. VILLANUEVA. 1962. *Can. J. Microbiol.* (en prensa).
3. GARCÍA-MENDOZA, C., y J. R. VILLANUEVA. 1962. *Nature* (en prensa).
4. GARCÍA-MENDOZA, C., y J. R. VILLANUEVA. 1962. *Can. J. Microbiol.* (en prensa).
5. GARCÍA-MENDOZA, C., y J. R. VILLANUEVA. 1962. *J. Bacteriol.* (en prensa).
6. GHUYSEN, J. M. 1952. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 146, 1.268.
7. McCARTY, M. 1952. *J. Exptl. Med.*, 96, 555.
8. NAKHIMSOUSSKAIA, M. I. *Mikrobiologiya.*, 6, 131.
9. NECAS, O. 1956. *Nature*, 177, 898.
10. RODRÍGUEZ-AGUIRRE, M. J., y J. R. VILLANUEVA. 1962 *Experientia* (en prensa).
11. SALTON, M. R. J. 1955. *J. Gen. Microbiol.*, 12, 25.
12. WELSCH, M. 1958. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 491.

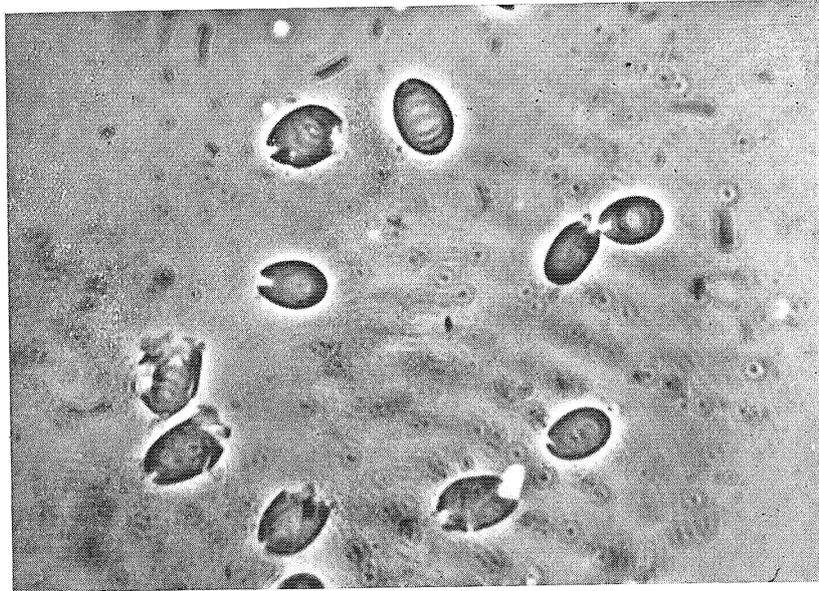


Figura 1. Paredes aisladas de Candida utilis

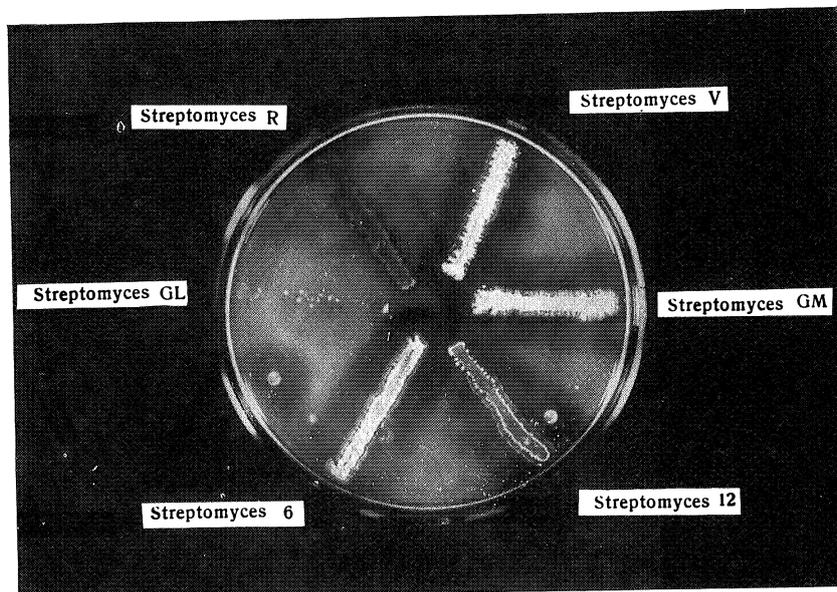


Figura 2. Actividades líticas de varias cepas de Streptomyces creciendo sobre placas de paredes celulares de Saccharomyces cerevisiae PM 1-sales-agar. Tiempo de incubación, siete días

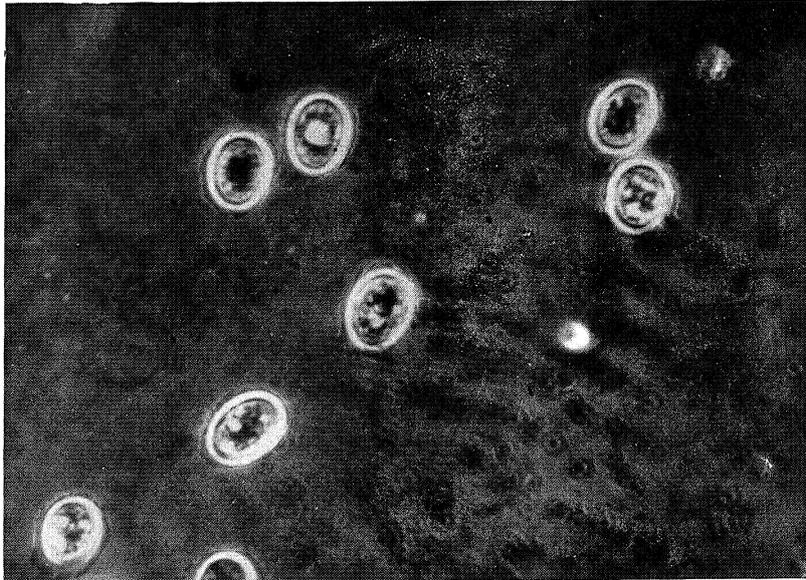


Figura 3. Células intactas de Candida utilis

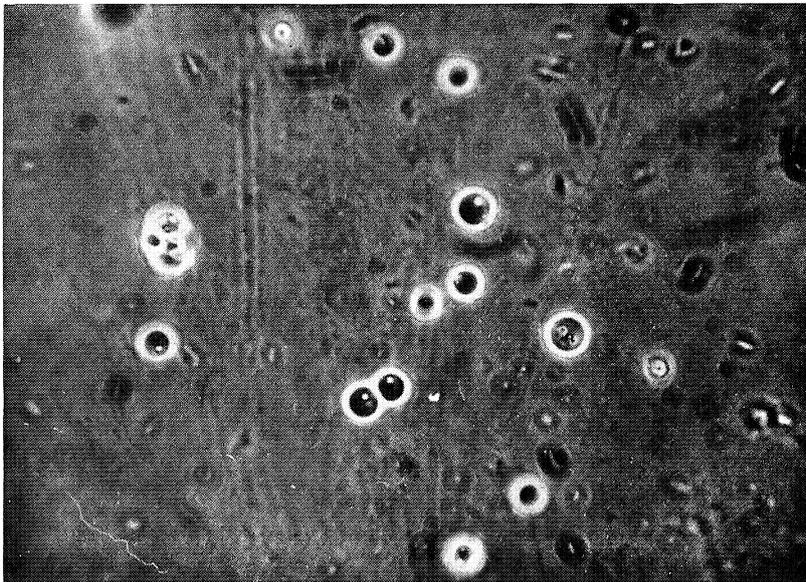


Figura 4. Protoplastos de Candida utilis obtenidos por la acción de la enzima del Streptomyces GM

CONFERENCIA DEL DR. RUBIO

En la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, pronunció una conferencia el Dr. Miguel Rubio Huertos, el día 27 del pasado mes de abril, sobre el tema «La multiplicación de los virus de las plantas».

COLECCION DE MICROORGANISMOS

En el Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, y bajo la dirección del Jefe de Sección del mismo, Dr. Julio Rodríguez Villanueva, se ha organizado una Colección de Microorganismos en conexión con el Centro Internacional para la Información y Distribución de Cultivos Tipo, de Lausana (Suiza).

Quedan invitados las entidades científicas e industriales y laboratorios particulares a depositar cultivos en la Colección. Cada cultivo deberá ir acompañado del nombre de la persona que aisló el organismo, laboratorio en que se efectuó el aislamiento, fecha de éste, medios y condiciones óptimas de mantenimiento y desarrollo, así como referencia de las publicaciones correspondientes, cuando existan.

Se piensa editar en plazo breve un catálogo de la Colección, que se renovará periódicamente. Se enviarán cultivos y el catálogo a todos aquellos que lo soliciten. Cualquier cultivo solicitado que no exista en la Colección, se tratará de conseguirlo con la mayor rapidez, a través del Centro de Lausana, sin que esto signifique gasto alguno para el peticionario, salvo el de envío.

CURSO DE BIOQUIMICA MICROBIANA

Durante los pasados meses de febrero-abril, en el Centro de Investigaciones Biológicas, tuvo lugar un curso sobre «Bioquímica de Microorganismos», a cargo del doctor Julio Rodríguez Villanueva, con la colaboración de los doctores Gertrudis de la Fuente, Manuel Losada, Miguel Rubio Huertos y Alberto Sols.

CONFERENCIA DEL DR. RUBIO

En la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, pronunció una conferencia el Dr. Miguel Rubio Huertos, el día 27 del pasado mes de abril, sobre el tema «La multiplicación de los virus de las plantas».

COLECCION DE MICROORGANISMOS

En el Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, y bajo la dirección del Jefe de Sección del mismo, Dr. Julio Rodríguez Villanueva, se ha organizado una Colección de Microorganismos en conexión con el Centro Internacional para la Información y Distribución de Cultivos Tipo, de Lausana (Suiza).

Quedan invitados las entidades científicas e industriales y laboratorios particulares a depositar cultivos en la Colección. Cada cultivo deberá ir acompañado del nombre de la persona que aisló el organismo, laboratorio en que se efectuó el aislamiento, fecha de éste, medios y condiciones óptimas de mantenimiento y desarrollo, así como referencia de las publicaciones correspondientes, cuando existan.

Se piensa editar en plazo breve un catálogo de la Colección, que se renovará periódicamente. Se enviarán cultivos y el catálogo a todos aquellos que lo soliciten. Cualquier cultivo solicitado que no exista en la Colección, se tratará de conseguirlo con la mayor rapidez, a través del Centro de Lausana, sin que esto signifique gasto alguno para el petionario, salvo el de envío.

CURSO DE BIOQUIMICA MICROBIANA

Durante los pasados meses de febrero-abril, en el Centro de Investigaciones Biológicas, tuvo lugar un curso sobre «Bioquímica de Microorganismos», a cargo del doctor Julio Rodríguez Villanueva, con la colaboración de los doctores Gertrudis de la Fuente, Manuel Losada, Miguel Rubio Huertos y Alberto Sols.

CONFERENCIA DEL DR. RUBIO

En la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, pronunció una conferencia el Dr. Miguel Rubio Huertos, el día 27 del pasado mes de abril, sobre el tema «La multiplicación de los virus de las plantas».

COLECCION DE MICROORGANISMOS

En el Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, y bajo la dirección del Jefe de Sección del mismo, Dr. Julio Rodríguez Villanueva, se ha organizado una Colección de Microorganismos en conexión con el Centro Internacional para la Información y Distribución de Cultivos Tipo, de Lausana (Suiza).

Quedan invitados las entidades científicas e industriales y laboratorios particulares a depositar cultivos en la Colección. Cada cultivo deberá ir acompañado del nombre de la persona que aisló el organismo, laboratorio en que se efectuó el aislamiento, fecha de éste, medios y condiciones óptimas de mantenimiento y desarrollo, así como referencia de las publicaciones correspondientes, cuando existan.

Se piensa editar en plazo breve un catálogo de la Colección, que se renovará periódicamente. Se enviarán cultivos y el catálogo a todos aquellos que lo soliciten. Cualquier cultivo solicitado que no exista en la Colección, se tratará de conseguirlo con la mayor rapidez, a través del Centro de Lausana, sin que esto signifique gasto alguno para el peticionario, salvo el de envío.

CURSO DE BIOQUIMICA MICROBIANA

Durante los pasados meses de febrero-abril, en el Centro de Investigaciones Biológicas, tuvo lugar un curso sobre «Bioquímica de Microorganismos», a cargo del doctor Julio Rodríguez Villanueva, con la colaboración de los doctores Gertrudis de la Fuente, Manuel Losada, Miguel Rubio Huertos y Alberto Sols.

DEPÓSITO LEGAL: M. 702.-1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Lorente, 15 - Madrid