A. J. SALLE

BACTERIOLOGÍA

EDITORIAL

BACTERIOLOGÍA

A. J. SALLE

Profesor de Bacteriología
en la Universidad de California (Los Ángeles)

BACTERIOLOGÍA

Versión
de la 4.ª edición norteamericana
por
IGNACIO RODRIGO GARCÍA
Químico farmacéutico

Segunda tirada

EDITORIAL S. A.

BIBLIOTECA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
VALPARAISO

EDITORIAL GUSTAVO GILI, S. A.
BARCELONA, 8 ✧ C. Enrique Granados, 45 ✧ MCMLX

DEPÓSITO LEGAL. B. 12223. - 1960

NÚM. REG. B. 275 - 1960

5110

© *Editorial Gustavo Gili, S. A.*

Casa Provincial de Caridad : Imprenta-Escuela : Montalegre, 5 : Barcelona

PRÓLOGO

> Lo que un hombre no logró, otro lo ha conseguido, y lo que era desconocido en una época se ha puesto en claro durante la siguiente. Las ciencias y las artes no se vacían en un molde, sino que se plasman y pulen poco a poco mediante manipulaciones y retoques reiterados; y al manipular y amasar este nuevo material una y otra vez más, agitándolo y calentándolo, doy a quien venga detrás de mí cierta facilidad para que lo aproveche sin tanto esfuerzo, y se lo hago más flexible y manejable..., como él lo hará para quien le suceda.
>
> MICHEL MONTAIGNE.

Este libro ha sido minuciosamente revisado y refundido por completo, para poner al día su contenido. La revisión no ha respetado ningún capítulo; enumerar los importantes cambios introducidos significaría incluir aquí casi toda la obra.

El autor ha intentado aprovechar exclusivamente datos fundamentales confirmados, a fin de proporcionar al principiante una base sólida para profundizar en la materia. Todos los fenómenos se explican, siempre que ha sido posible hacerlo.

Gran parte del material aparece por vez primera, y puede requerir la estimación ajena antes de ser admitido como cierto. Hay que prevenir al estudiante contra la aceptación irreflexiva de opiniones tal vez inseguras. La preparación que proporciona la ciencia y la educación contemporáneas parecen ser adecuadas para formar estudiantes con espíritu crítico y afán inquisitivo.

Se ha dado importancia a la química en lo que atañe a la composición de la bacteria y a sus reacciones. Un estudiante podría instruirse en bacteriología sin buena parte de la química contenida en este libro, y el profesor tal vez encuentre apropiado eliminarla en su mayoría dentro de un curso para principiantes. Es posible que no se necesite tanta química para algunas fases de la bacteriología, pero se incluye para los estudiantes curiosos que deseen comprender mejor el tema, y sobre todo con el fin de desarrollar cumplidamente ciertos aspectos de la bacteriología que hacen indispensable el conocimiento de aquella disciplina.

Se han añadido muchas ilustraciones nuevas, y algunas de las antiguas han cedido el puesto a otras mejores. Los originales empleados para ellas se han preparado con gran esmero y reproducido con la máxima habilidad técnica a nuestro alcance.

La clasificación general de las bacterias y los nombres de microorganismos utilizados en todo el texto se basan en la sexta edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, que sirve de norma casi universal en Norteamérica. El autor está muy reconocido al redactor jefe, Dr. Robert S. Breed, por haberle permitido citar pasajes de ese libro.

Asimismo agradece al Dr. Gregory J. Jann, a Dexter H. Howard y a su esposa la ayuda que le han prestado leyendo y revisando las pruebas, y también expresa su gratitud a cuantos le han proporcionado ideas y comentarios valiosos durante la preparación del manuscrito.

El autor ha tratado de mencionar la procedencia de los datos incluídos en el texto y de las ilustraciones; todo error u omisión debe considerarse involuntario. Pero asume la plena responsabilidad por los defectos que se observen en el plan y la intención del libro, así como por los errores que hayan pasado inadvertidos.

A. J. SALLE.

CAPÍTULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

Bacteriología es la ciencia que trata de los organismos conocidos por bacterias, y Microbiología, en su más ampia acepción, es la ciencia que estudia todos los microorganismos, vegetales y animales, como bacterias, levaduras o fermentos, mohos, algas y protozoos. Actualmente se tiende a limitar el término a microorganismos clasificados en los grupos más elementales de la vida botánica o vegetal. Con frecuencia se emplean las palabras *microbio* y *germen* para indicar cualquier microorganismo, en especial las bacterias patógenas o productoras de enfermedades. Si bien en esta obra se trata de los microorganismos en general, la mayor parte de ella se dedica al estudio de los seres bacterianos.

El hombre, en su afán de clasificarlo todo, conceptúa los organismos vivientes como plantas o como animales, ya que la mayoría de estos seres vivos poseen características de uno u otro reino que permiten diferenciarlos bien. Sin embargo, las bacterias y otros microorganismos son formas intermedias o de transición, y presentan a la vez caracteres de plantas y de animales; esto impide situarlos en uno de los dos indicados grupos.

Haeckel (1884) consideró que podría evitarse en buena parte la confusión formando con las bacterias un nuevo reino, el de los *protistas*, según lo denominó. En él agrupaba todos los microorganismos que, como las levaduras, los mohos, las bacterias, los protozoos y las algas, ofrecen dificultades para incluirlos en uno de los clásicos reinos. No tuvo aceptación esta idea, y finalmente la abandonó el mismo Haeckel. Después de todo, poca importancia tiene que las bacterias sean plantas o animales, mientras estudiemos y comprendamos sus características fundamentales.

CLASIFICACIÓN DE LAS PLANTAS

Las bacterias se hallan entre las formas vivientes más simples que se conocen, y de ahí que compartan y muestren propiedades de plantas y de animales; pero se han agrupado, por razones de conveniencia, en el reino vegetal, sin que ello signifique que por sus propiedades se acerquen más a las plantas que a los animales.

El reino vegetal puede dividirse en cuatro tipos, a saber:

I. *Talófitas.*
II. *Briófitas.*
III. *Pteridófitas.*
IV. *Espermatófitas.*

Tipo I. *Talófitas.* — División del reino vegetal que comprende: 1.º, algas; 2.º, hongos (bacterias, levaduras y mohos), y 3.º, líquenes. Las formas más sencillas son unicelulares; en las superiores, el cuerpo de la planta es un talo, por lo general sin diferenciación en raíces, tallos y hojas.

Subtipo 1.º *Algas,* talófitas autotróficas con clorofila.

Clase 1.ª *Cianofíceas* o algas azules. — Son plantas unicelulares o filamentosas de organización primitiva, principalmente de color azul verdoso y de nutrición autotrófica; viven en tierras pantanosas, sobre rocas y árboles, y en el agua dulce o salada. Se reproducen por división celular.

Clase 2.ª *Flagelados.* — Diminutos organismos unicelulares con un núcleo verdadero. Se mueven con ayuda de uno o más cilios o flagelos, y se multiplican por división longitudinal.

Clase 3.ª *Clorofíceas* o algas verdes. — Viven libres o sedentarias en el agua dulce o en lugares húmedos. Algunas formas son aerófilas, y pueden resistir una desecación completa; su color es verde claro, pues la clorofila no está enmascarada por otros pigmentos. La multiplicación es asexual y también por medio de esporas sexuadas.

Clase 4.ª *Rodofíceas* o algas rojas. — La clorofila se halla encubierta por un pigmento rojo, ficoeritrina, y en algunos casos, además, por el pigmento azul ficocianina. Estas algas rojas son plantas marinas de gran belleza por sus formas y tonos de color. Se fijan por medio de filamentos especiales u órganos discoides. El talo presenta una gran variedad de formas; los esporangios desarrollan generalmente cuatro esporas asexuadas e inmóviles (tetrasporas). La reproducción sexual es oógama, y da como resultado esporas asexuadas distintas de las tetrasporas.

Clase 5.ª *Feofíceas.* — Son las algas pardas, plantas principalmente marinas, con frecuencia de tamaño gigantesco y formas muy diversas. La clorofila se encuentra enmascarada por caroteno, xantofila y, sobre todo, fucoxantina, pigmento pardo relacionado con la xantofila.

Clase 6.ª *Diatomáceas* o diatomeas. — Componen un extenso grupo de algas unicelulares, que viven en gran número en aguas dulces y saladas y en la tierra húmeda. Ofrecen una considerable variedad de formas. La membrana celular es muy rica en sílice, y queda como un esqueleto después de la muerte del microorganismo, formando la llamada tierra de infusorios, harina fósil, trípoli o «kieselguhr». Cada individuo o célula consta de dos mitades o valvas que encajan una en la otra. La multiplicación se efectúa por división longitudinal.

Clase 7.ª *Conjugadas.* — Algas verdes puras con células mononucleadas. Todas son formas conjugadas y constituyen un variado grupo de algas de agua dulce, unicelulares o en filamentos libres no ramificados. Son notables los miembros de esta clase por la ausencia de toda esporulación asexual.

Clase 8.ª *Caráceas.* — Se encuentran estas algas en charcas y pantanos, y forman en ocasiones verdaderos prados sumergidos de unos 30 cm de altura. Tienen tallos nudosos, con verticilos de hojas en los nudos, donde nacen también los complejos órganos de reproducción de ambos sexos.

Subtipo 2.º *Hongos.* — Comprende bacterias, levaduras y mohos.

Clase 9.ª *Esquizomicetos* o bacterias. — Son microorganismos unicelulares, sin verdadera clorofila, y se multiplican normalmente por escisión binaria o transversal. Algunas especies contienen bacteriocloro-fila, pigmento fotosintético que funciona a semejanza de la clorofila. Estos seres pueden ser esféricos, cilíndricos, arqueados, espirales o filamentosos, y con frecuencia se reúnen en cadenas o forman agregados planos o cúbicos.

Clase 10. *Mixomicetos.* — Son hongos mucosos o mucilaginosos que viven en aguazales y sobre materia vegetal en descomposición. Están constituídos por masas desnudas de protoplasma. A menudo alcanzan tamaño considerable, no contienen clorofila y muestran un lento movimiento de reptación. La multiplicación es asexual, mediante formación de esporangios que contienen esporas asexuadas.

Clase 11. *Ficomicetos,* hongos algas. — Se incluyen aquí muchos microorganismos parásitos o saprófitos, cuyo aspecto varía desde el de una masa indiferenciada de protoplasma al de un micelio bien desarrollado y muy ramificado. El micelio vegetativo se presenta generalmente sin tabicar. La multiplicación es sobre todo asexual, por formación de conidios o esporangios. Este grupo ofrece todas las fases de transición, desde la producción asexual de esporas, pasando por la simple conjugación, hasta la multiplicación sexual perfecta, con óvulo y espermatozoide, en las especies superiores.

Clase 12. *Ascomicetos.* — Constituyen una amplia clase de hongos superiores, que se distinguen por contener hifas tabicadas y producir sus esporas en unos sacos o cavidades especiales, denominados ascas. Se incluyen aquí muchos grupos de mohos, y también, por lo general, un grupo de hongos unicelulares, las levaduras. Se reproducen por gemación, por escisión, por esporulación asexual y por copulación.

Clase 13. *Basidiomicetos.* — Son hongos con basidios y componen una clase importante, caracterizada por tener el micelio tabicado y las esporas en basidios; forman también clamidosporas. Entre los basidiomicetos inferiores se hallan muchos hongos parásitos de plantas.

Clase 14. *Hongos imperfectos.* — Los hongos de esta clase se separan de los demás por no tener cuerpos fructíferos bien definidos; no forman ascas ni basidios, sino únicamente conidios. Se incluyen en este grupo todos los hongos que no pueden clasificarse entre los ficomicetos, ascomicetos o basidiomicetos.

Subtipo 3.º *Líquenes.* — Plantas compuestas.

Clase 15. — *Líquenes.* — Un liquen es un organismo compuesto, formado por un hongo que vive simbióticamente con una alga. El hongo obtiene productos alimenticios del alga, y a su vez la protege contra la desecación y otros daños provenientes del medio. La fructificación de un liquen es obra siempre del hongo, no del alga, cuya función no pasa de ser vegetativa. El tornasol, indicador vegetal, se obtiene de un liquen.

Tipo II. *Briófitas.* — Esta división del reino vegetal comprende las hepáticas y los musgos, plantas caracterizadas por la presencia de arquegonios de compleja estructura y por cierta diferenciación en tallos y hojas. El grupo ofrece algunas semejanzas de estructura con las pteridófitas por una parte, y con las talófitas por otra.

Clase 1.ª *Hepáticas.* — Comprende las verdaderas hepáticas y los musgos escamosos, plantas pequeñas y con frecuencia de aspecto musgoso. El gametófito consiste en un simple talo o brote taloide. Viven las hepáticas en lugares húmedos, troncos y leños viejos, etc., y así tienen la adecuada estructura higromórfica. Sólo se conocen algunas formas verdaderamente acuáticas; otras, muy delicadas, vegetan entre los musgos. En el talo se desarrollan con variadas formas anteridios y arquegonios.

Clase 2.ª *Musgos.* — Presentan estos vegetales formas muy diversas en todos los lugares del mundo. Se caracterizan por sus tallos pequeños, frondosos, con frecuencia copudos, en donde se hallan los órganos sexuales, que originan oosporas al desarrollarse. Éstas se transforman luego en unas cápsulas desnudas y pedunculadas, que albergan las esporas asexuadas, las cuales, al germinar, dan origen a una estructura o *protonema,* de la que por gemación se deriva el gametófito o musgo propiamente dicho. Se encuentran los musgos en terrenos secos, sobre piedras, troncos de árboles, en ciénagas, en las selvas tropicales y en el agua.

Tipo III. *Pteridófitas.* — En esta división del reino vegetal se encuentran los helechos, helechos de agua, colas de caballo (equisetos) y licopodios. Representan el tipo más elevado de plantas sin flores, ya que poseen sistemas tegumentario y vascular bien desarrollados y ofrecen una diferenciación completa en raíces, tallos y hojas. El esporófito constituye la parte visible del aparato generador, dado que el gametófito queda reducido a un pequeño cuerpo taloide, el protalo, que sustenta arquegonios y anteridios. Con excepción de unos pocos helechos arborescentes, casi todas las pteridófitas son herbáceas.

Clase 1.ª *Psilofitíneas.* — Están consideradas como las pteridófitas más primitivas; carecen de hojas o las tienen muy pequeñas. Los esporangios, isospóreos, son terminales y no se hallan sobre las hojas.

Clase 2.ª *Licopodíneas.* — Comprenden los licopodios de hojas pequeñas y esporangios solitarios sobre la cara superior del esporofilo; pueden ser isospóreos o heterospóreos. Los espermatozoides son biciliados.

Clase 3.ª *Psilotíneas.* — Tienen hojas pequeñas y carecen de raíces. Los esporangios se encuentran en la cara superior de los esporofilos y son isospóreos. Sus espermatozoides son pluriciliados.

Clase 4.ª *Equisetíneas.* — Constituyen los equisetos o colas de caballo, de hojas pequeñas y verticiladas. Los esporangios nacen en grupos

en la cara inferior del esporofilo y pueden ser isospóreos o heterospóreos. Tienen espermatozoides pluriciliados.

Clase 5.ª *Isoetíneas.* — Hojas grandes en proporción al tallo; esporangios heterospóreos, solitarios en la superficie del esporofilo, y espermatozoides pluriciliados.

Clase 6.ª *Filicíneas.* — Constituyen los helechos, cuyas hojas (frondes) son grandes y tienen en el envés los esporangios, isospóreos o heterospóreos. Los espermatozoides son pluriciliados.

Clase 7.ª *Pteridospermas.* — Son de hojas grandes, con numerosos microsporangios heterospóreos en la cara inferior del esporofilo; el macrosporangio contiene una sola macrospora.

Tipo IV. *Espermatófitas.* — En esta división del reino vegetal se reúnen las plantas que producen semillas, las cuales constituyen el grupo más numeroso de vegetales, caracterizados por el manifiesto desarrollo del esporófito, con gran diferenciación de sus elementos en raíces, tallos, hojas, flores, etc., así como por la extremada reducción del gametófito y por la formación de semillas. Todos los miembros son heterospóreos. El óvulo se fecunda a través de un tubo polínico emitido por la microspora, o mediante espermatozoides.

Subtipo 1.º *Gimnospermas.* — Comprende las coníferas: pinos, abetos, etc. Las plantas de este grupo tienen semillas desnudas o no encerradas en un ovario; en algunas, la fecundación es obra de espermatozoides.

Subtipo 2.º *Angiospermas,* o plantas con flores, caracterizadas por tener las semillas encerradas en un ovario. — Este grupo comprende la inmensa mayoría de las plantas con semilla.

Clase 1.ª *Dicotiledóneas.* — Plantas con dos cotiledones, en las que se incluyen la mayoría de las que llevan flores. Hojas con nerviación reticulada; los haces vasculares forman un cilindro en el tallo, y los elementos florales se disponen generalmente en grupos de cinco, cuatro o dos.

Clase 2.ª *Monocotiledóneas.* — Plantas con un solo cotiledón u hoja embrionaria, como gramíneas, lirios, orquídeas, palmeras, etc. Hojas con nerviación paralela; haces vasculares dispersos en el tallo, y elementos florales en grupos de seis o tres.

DISTRIBUCIÓN DE LAS BACTERIAS

Las bacterias están ampliamente distribuídas en la Naturaleza, pues se hallan en casi todas partes. Las encontramos en charcas y acequias, en arroyos y ríos, en el agua del mar, en montones de basura o de estiércol, en el suelo, en el aire, en el petróleo de regiones muy bajas, en los alimentos, en la materia orgánica en descomposición, en la superficie y las cavidades de nuestro cuerpo, dentro del tubo intestinal del hombre y de los animales, etc. Su número varía de un lugar a otro, según las condiciones del ambiente.

Algunas bacterias existen siempre en ciertos lugares. La presencia

normal de una o más especies en un determinado medio hace considerarlas como flora natural del mismo. Por ejemplo, la leche se agria normalmente por obra del *Streptococcus lactis,* microorganismo presente en los excrementos y el pelaje de las vacas, y que se infiltra en la leche al ordeñar. Prácticamente toda muestra de leche lo contiene.

Bacterias del suelo. El número y las especies de microorganismos presentes en el suelo dependen de la clase de terreno, la cantidad de residuos vegetales y animales (humus), la acidez o alcalinidad, la profundidad, la humedad y el tratamiento. La inmensa mayoría de los gérmenes del suelo se hallan en las capas superficiales; su número disminuye con la profundidad, a causa de la escasez de oxígeno y de substancias nutritivas. Una buena tierra de cultivo contiene muchos más microorganismos que un terreno inculto y baldío.

Bacterias del aire. En la atmósfera hallamos bacterias transportadas por corrientes de aire. Los microbios no se desarrollan ni multiplican en este medio, por no ser favorables las condiciones; esto explica que no exista una flora atmosférica normal. La abundancia o escasez y la diversidad de bacterias varían según la localidad, la proporción de humedad, las partículas de polvo, los vientos y la presencia de gases tóxicos. En general, el aire de alta mar contiene menos microorganismos que el de tierra, y el de las altas montañas suele estar exento de ellos. El aire de las poblaciones y el del campo difieren en número y especies presentes, en habitaciones polvorientas se hallan usualmente muchos más microbios que en las aseadas, y como las bacterias, por lo general, se adhieren a partículas de polvo, la contaminación bacteriana será tanto más fácil cuantas más partículas se hallen suspendidas en el aire. Esporas viables de levaduras, mohos y bacterias se encuentran normalmente en el aire, por ser esos cuerpos más resistentes a las radiaciones ultravioleta de la luz solar que las células vegetativas de donde proceden; ellas son causa frecuente de contaminaciones en laboratorios bacteriológicos, y su gran resistencia al calor requiere temperaturas elevadas para destruirlas.

Bacterias del agua. La mayoría de las aguas contienen bacterias en abundancia. Su número varía considerablemente según el origen de aquéllas, que pueden ser profundas o superficiales, de manantial, río, lago, charca o pantano, etc. El agua contaminada por las de alcantarillado puede contener, por centímetro cúbico, millares y hasta millones de microorganismos; en determinadas condiciones se encuentran también gérmenes productores de enfermedades. Algunas especies de bacterias existen constantemente en el agua, y constituyen su flora natural. En el agua del mar, por lo común, hallamos menos especies de bacterias que en la terrestre, tal vez por ser aquélla de peor calidad como medio de cultivo.

Bacterias de los alimentos. Las substancias alimenticias raramente

se hallan libres de microorganismos vivos. Algunos de ellos se aprovechan para producir ciertas fermentaciones beneficiosas, como sucede en la oxidación del alcohol, que lo transforma en ácido acético o vinagre, en la fermentación láctica de las coles para acidificarlas, etc. Los alimentos contienen a menudo microorganismos nocivos, productores de transformaciones anormales; a veces, las substancias alimenticias son causa de intoxicaciones y procesos morbosos por la presencia de gérmenes o productos de su metabolismo.

Bacterias de la leche. Probablemente, las ubres de las vacas no están nunca libres de las bacterias, por lo que la leche recién ordeñada no es estéril. La que se extrae primero contiene siempre más gérmenes que la última del ordeño, porque las bacterias se van eliminando de las ubres al comienzo de la operación. No obstante, la mayoría de los microorganismos contenidos en la leche llegan a ella durante su extracción y manipulación; a menos que se conserve a baja temperatura inmediatamente después de ordeñada, esos microbios son capaces de originar transformaciones tales que la inutilicen para el consumo humano.

Bacterias del cuerpo. En la parte externa de la piel hay siempre microorganismos, y puede decirse lo propio del tubo digestivo y las vías respiratorias del hombre y de los animales. La piel, el conducto intestinal y las vías respiratorias tienen una flora bacteriana normal, en su mayor parte inofensiva. Algunas especies de bacterias, al penetrar ocasionalmente por cualquier grieta de la piel o de las paredes intestinales, originan enfermedades; pero, por lo general, estos microorganismos son destruídos por los mecanismos defensivos del huésped. Se ha dicho que una cuarta parte del peso del residuo seco del contenido intestinal del hombre corresponde a células bacterianas.

La *Escherichia coli* se halla en el intestino grueso del hombre; existen también allí otras bacterias, pero esta especie es la que predomina en un adulto sometido a dieta mixta, y por ello se considera como principal componente de la flora natural del intestino grueso. Los cambios que experimentan las condiciones del medio llevan aparejados otros cambios en la flora bacteriana; si la dieta de un adulto se transforma, substituyendo el predominio de proteínas por el de carbohidratos, la *E. coli* disminuirá gradualmente en número, para ser reemplazada por otros gérmenes mucho mayores, de la especie conocida por *Lactobacillus acidophilus,* los cuales, de mantenerse la substitución referida, llegarán a preponderar en el intestino grueso.

FUNCIONES DE LAS BACTERIAS

Quienes no están familiarizados con las actividades de las bacterias suponen generalmente que la inmensa mayoría de ellas son dañinas, que tienen por principal misión introducirse en el cuerpo y provocar enfermedades de varias clases. Esta creencia es totalmente errónea. La mayoría de las bacterias no sólo son innocuas, sino que resultan absolutamente necesarias para la existencia de los seres vivos; la vida no sería posible si ellas faltasen totalmente.

Plantas y animales deben su vida a la fertilidad del suelo, y ésta, a su vez, depende de la actividad de los microorganismos que en él viven. Las plantas absorben los elementos nutritivos del suelo en forma de minerales, pues no pueden utilizar compuestos orgánicos tales como grasas, carbohidratos y proteínas. Los gérmenes del suelo atacan los restos humanos y animales, y mineralizan los componentes orgánicos, que así se hacen asimilables por las plantas; lo mismo ocurre con los restos de cosechas vegetales, rastrojos, hojas, etc. Sin las bacterias del suelo, las plantas no podrían vivir ni desarrollarse, y, en ausencia de plantas, no habría vida animal sobre la tierra. El hombre depende naturalmente de la vida vegetal y animal.

Algunas especies de bacterias pueden absorber nitrógeno atmosférico y convertirlo en compuestos aprovechables por los vegetales. Sin abonos, como estiércoles animales, nitratos y sales amónicas, no habría nitrógeno en el suelo, de no ser por la actividad de estos microorganismos. El azufre y el fósforo, dos elementos necesarios para el crecimiento vegetal, son transformados también por bacterias en sales inorgánicas solubles, y absorbidos así por las raíces de las plantas.

Un suelo fértil se distingue siempre de una tierra pobre por albergar mayor número de microorganismos viables. Si el suelo abunda en residuos vegetales, posee humedad suficiente, adecuada temperatura y pH (concentración de hidrogeniones), habrá muchos microbios que ataquen los restos vegetales y animales, convirtiendo los componentes insolubles e inertes en substancias solubles y asimilables por las plantas.

Las bacterias son necesarias para aprovechar las aguas residuales; convierten proteínas, grasas y carbohidratos (celulosa) insolubles en compuestos solubles e inodoros, que pueden utilizarse sin peligro.

La leche se agria en virtud de una acción bacteriana; ésta es la primera fase de la preparación de la manteca y varios tipos de queso. La maduración de los quesos para mejorar su aroma y sabor se debe a bacterias y mohos.

Diversos tipos de fermentaciones industriales de carbohidratos se realizan con ayuda de bacterias, levaduras y mohos. Por acción bacteriana se fabrican ácido butírico, acetona y alcohol butílico. El alcohol

etílico es obra de levaduras, y los ácidos glucónico y cítrico son resultado de las actividades de ciertos mohos.

Éstos son únicamente unos pocos ejemplos del papel desempeñado en la Naturaleza por la acción combinada de tales microorganismos. En varios capítulos de esta obra se estudiarán otros muchos efectos útiles de su intervención.

REFERENCIAS

Brian, P. W.: Microbiology, *J. Roy. Soc. Arts*, **101**: 194, 1953.
Coulter, M. C.: «The Story of the Plant Kingdom», Chicago, University of Chicago Press, 1935.
Haeckel, Ernst: «The History of Creation», vol. II, Nueva York, D. Appleton-Century Company, Inc., 1884.
Hardin, Garret: «Biology», San Francisco, W. H. Freeman Company, 1952.
Knobloch, Irving W.: «Readings in Biological Science», Nueva York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1948.
Lawrence, George H. M.: «Taxonomy of Vascular Plants», Nueva York, The Macmillan Company, 1951.
Pauli, Wolfgang F.: «The World of Life», Boston, Houghton Mifflin Company 1949.

CAPÍTULO II

EL MICROSCOPIO

Las bacterias son tan pequeñas que resulta imposible percibirlas a simple vista; hay que aumentarlas muchísimo para poderlas distinguir y estudiar bien. El empleo de un microscopio es por ello de todo punto indispensable al bacteriólogo y al biólogo en general.

Puede definirse el microscopio como un intrumento óptico que consiste en una combinación de lentes para conseguir imágenes aumentadas o agrandadas de objetos diminutos. La palabra microscopio deriva de dos voces griegas: μῖκρός, pequeño, y σκοπεῖν, contemplar.

Un microscopio simple consiste sencillamente en una lente o cristal de aumento montado en una armazón, por lo general graduable, y con frecuencia provisto de un soporte para la conveniente colocación del objeto y de un espejo que refleja la luz. Un microscopio compuesto se diferencia del simple en que consta de dos juegos de lentes, uno conocido por objetivo, y el otro por ocular, usualmente montados en un tubo (fig. 1). Se consigue un enfoque preciso con ayuda de un tornillo micrométrico. Los microscopios compuestos dan aumentos mucho mayores que los simples, y son necesarios para ver y examinar objetos tan minúsculos como las bacterias.

Hay que conocer primero los fundamentos del microscopio para poderlo utilizar con el mayor provecho. Como dijo A. E. Wright (1907):

> Todo aquel que haya de emplear el microscopio debe decidir por sí mismo si lo hará de acuerdo con un sistema rutinario de aproximación o tratará de valerse de un método racional, basado en el estudio de su instrumento y en la consideración de los principios científicos de la técnica microscópica.

PRINCIPIOS GENERALES DE ÓPTICA

En la figura 2 se representa la trayectoria que sigue la luz a través del microscopio. Los rayos luminosos atraviesan el condensador, el objeto situado en el plano I y el objetivo, y forman una imagen real e invertida en el plano II, si previamente se ha quitado el ocular *F*. Con éste montado, se interceptan los rayos, y la imagen se forma en el plano III.

Se examina entonces la imagen real a través de la lente *E* del ocular, que actúa como simple lupa y produce una imagen virtual y aumentada en el plano IV. La distancia entre la imagen virtual (plano IV) y el

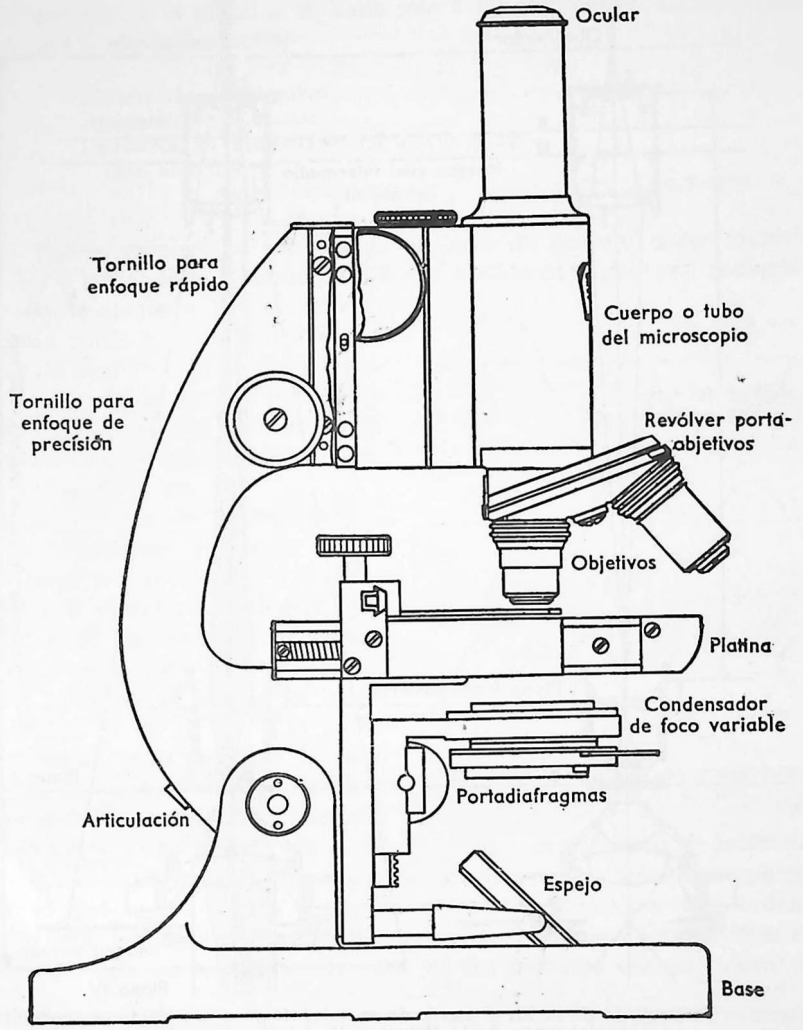


Fig. 1. — Microscopio compuesto y sus partes. (Con licencia de la Bausch & Lomb Optical Company.)

ojo o punto de vista se conoce por distancia de visión distinta o de proyección. El objeto es amplificado primero por el objetivo y luego por el ocular. Con un tubo de 160 mm (la mayoría de los constructores de microscopios han adoptado esta longitud tipo para el tubo), el aumento

total del microscopio es igual al producto del poder amplificador del objetivo por el del ocular.

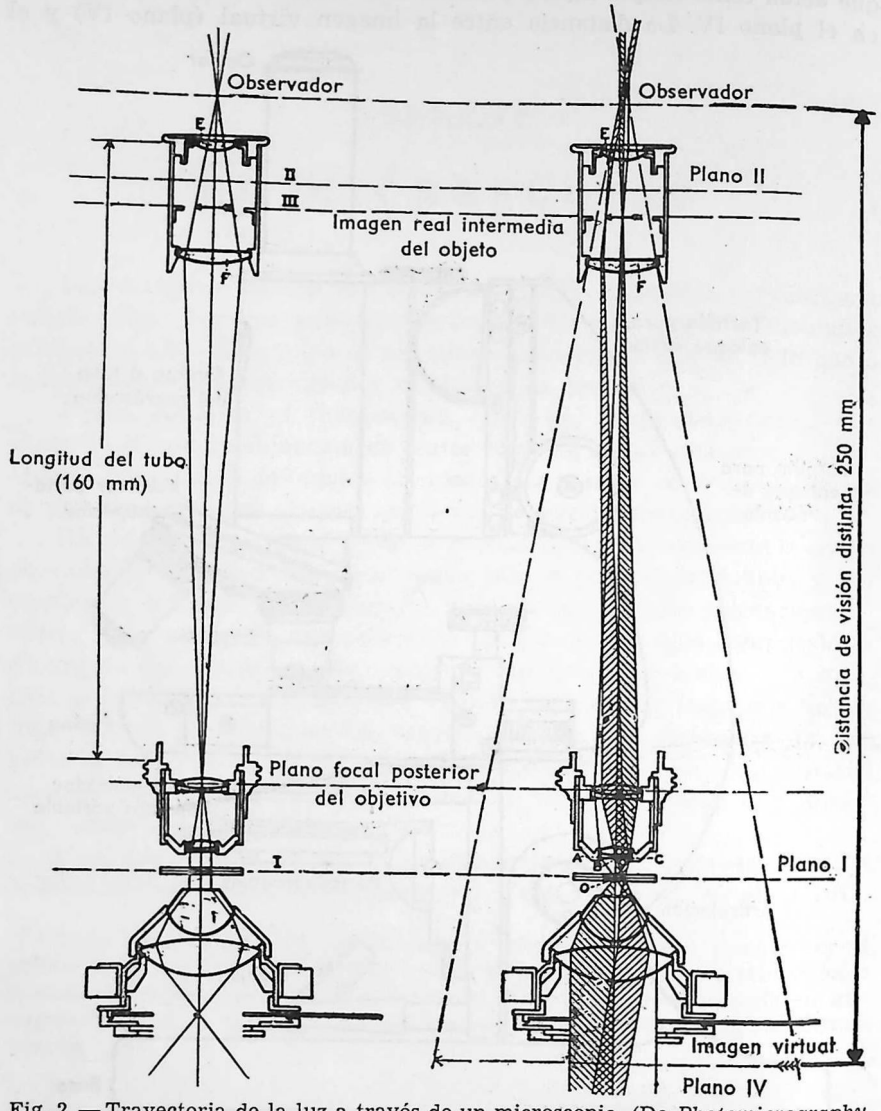


Fig. 2. — Trayectoria de la luz a través de un microscopio. (De *Photomicrography*, con licencia de la Eastman Kodak Company.)

Tales aumentos se obtienen sobre un cristal esmerilado que se coloca a 250 milímetros del ocular del microscopio. Una vez ajustada la longitud del tubo, el aumento total se puede calcular multiplicando el poder amplificador del objetivo por el del ocular y por 4/100 de la distancia de éste al vidrio esmerilado, en milímetros. Por ejemplo, si

la pantalla esmerilada se halla a 250 milímetros del ocular, el aumento total del microscopio viene dado por el producto de los aumentos del objetivo y del ocular; si está a 500 milímetros, el aumento será el doble del anterior, y la mitad si se halla sólo a 125 milímetros. Expondremos un caso o ejemplo concreto:

Ampliación del objetivo	97
Ampliación del ocular	10
Distancia, en milímetros, del vidrio esmerilado al ocular.	175
Amplificación total	$97 \times 10 \times 0{,}7 = 679$

Podría creerse que empleando oculares de distinto poder amplificador o variando la longitud del tubo es posible conseguir casi cualquier grado de aumento. Si bien de esta forma puede hacerse mayor el poder de amplificación de un microscopio, no se mejora el detalle de la imagen, ya que esto se halla estrechamente limitado por la estructura de la luz.

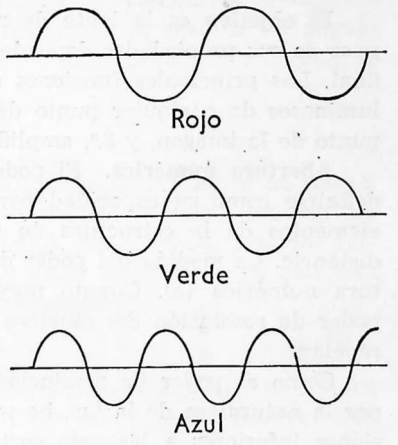


Fig. 3. — Longitudes de ondas luminosas de distintos colores.

Estructura de la luz. Se admite generalmente que la luz se propaga por movimientos ondulatorios o vibratorios del éter, que parten de los cuerpos luminosos y llegan así al ojo o a otros objetos; esto es lo que se conoce por teoría ondulatoria de la luz. Las ondas luminosas se propagan a la velocidad de unos 300.000 kilómetros por segundo, y las vibraciones son transversales al sentido de transmisión del movimiento ondulatorio.

Cuando un rayo de luz atraviesa un prisma, se obtiene un espectro en el que varios colores forman una serie de fajas, por este orden: rojo obscuro, anaranjado, amarillo, verde, azul, índigo y violeta obscuro. Se sabe que las longitudes de onda de los distintos colores tienen un

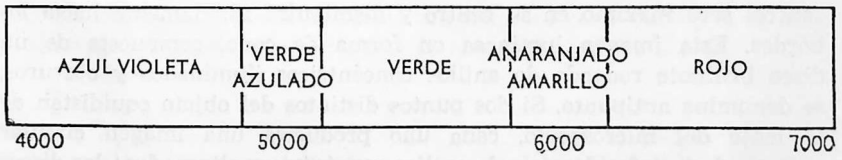


Fig. 4. — Rayos luminosos del espectro visible, y sus correspondientes longitudes de onda, en unidades Ångström.

valor diferente; las del rojo son las más largas, y las del violeta, las más cortas del espectro visible.

La longitud de una onda de luz es la distancia que media entre las crestas de dos ondas consecutivas (fig. 3). La unidad de medida es el ångström (Å), que equivale a 1/10.000.000 mm. Puede representarse el espectro visible, juntamente con las longitudes de ondas de los rayos luminosos, en unidades Ångström, como se indica en la figura 4. Las ondas de luz visible se hallan comprendidas en la zona de 4.000 a 7.000 Å, que puede dividirse aproximadamente en tres partes: azul violeta, de 4.000 a 5.000 Å; verde, de 5.000 a 6.000 Å, y rojo, de 6.000 a 7.000 Å.

OBJETIVOS

El objetivo es la lente de mayor importancia de un microscopio, pues de sus propiedades depende que se consiga o se frustre la imagen final. Las principales funciones del objetivo son: 1.ª, reunir los rayos luminosos de cualquier punto del objeto; 2.ª, concentrar la luz en un punto de la imagen, y 3.ª, amplificar la imagen.

Abertura numérica. El poder de resolución de un objetivo puede definirse como su capacidad para distinguir claramente dos pequeños elementos de la estructura de un objeto, separados por muy escasa distancia. La medida del poder de resolución de un objetivo es la abertura numérica (a). Cuanto mayor sea esta abertura, mayor será el poder de resolución del objetivo y la finura de los detalles que puede revelar.

Como el poder de resolución del objetivo viene limitado y fijado por la naturaleza de la luz, no pueden percibirse los objetos de dimensiones inferiores a las más cortas longitudes de onda de luz visible. Para ver objetos tan diminutos, es necesario servirse de rayos de menor longitud de onda. Los rayos invisibles, tales como los de luz ultravioleta, son más cortos que los de luz visible, pero su utilidad es limitada, pues no sirven para la observación visual (solamente para fotografía).

La imagen de un objeto originada al pasar la luz a través de un microscopio no será un punto, sino que, por la difracción que la luz experimenta en el diafragma, tomará la forma de un círculo brillante rodeado de anillos obscuros e iluminados concéntricos. El brillo del disco central será máximo en su centro y disminuirá rápidamente hacia los bordes. Esta imagen luminosa en forma de cono, compuesta de un disco brillante rodeado de anillos concéntricos iluminados y obscuros, se denomina antípunto. Si dos puntos distintos del objeto equidistan de la lente del microscopio, cada uno producirá una imagen circular rodeada de la referida serie de anillos concéntricos alternados; los discos se verán claramente si están separados por completo, pero si las imágenes se superponen, se funden en una sola zona brillante, cuya parte central aparece casi uniforme, y así los dos discos no se ven como imágenes separadas. No se conoce exactamente hasta qué punto pueden aproximarse los centros de las imágenes sin dejar de verse como antipuntos separados.

La distancia mínima entre las imágenes de dos puntos distintos del objeto disminuye a medida que aumenta el ángulo AOC que forma la luz emanada del objeto O (fig. 2); este ángulo formado por los rayos extremos se conoce por abertura del objetivo. La capacidad de las lentes del objetivo para dar imágenes distintas de dos puntos no contiguos del objeto es proporcional al seno trigonométrico del ángulo. Este último resulta ser, por tanto, una medida del poder de resolución del objetivo; pero, en realidad, lo que se tiene en cuenta es el ángulo AOB, que constituye exactamente la mitad del ángulo AOC, y usualmente se expresa por sen μ. Puesto que en el triángulo rectángulo el seno de un ángulo se puede definir como la relación entre el lado opuesto al ángulo y la hipotenusa, tenemos:

$$\text{sen } \mu = \frac{AB}{AO}$$

La luz, al atravesar el objetivo, sufre la influencia del índice de refracción n del espacio situado ante la cara frontal de la lente; éste es otro factor que afecta al poder de resolución de un objetivo. Los dos factores, índice de refracción n y sen μ, pueden combinarse en una sola expresión, abertura numérica, que cabe expresar así:

$$a = n \text{ sen } \mu.$$

Importancia de la abertura numérica. Si para iluminar se emplea un haz luminoso muy estrecho, un microscopio podrá resolver con amplificación suficiente el más fino detalle, que será igual a

$$\frac{\lambda}{a}$$

donde λ representa la longitud de onda de la luz empleada para iluminar, y a, la abertura numérica del objetivo. El poder de resolución de un objetivo es proporcional a la anchura del haz luminoso utilizado; así, pues, con una iluminación mayor aumenta el poder de resolución, que alcanza su máximo cuando la luz ocupa la abertura total del objetivo. En este caso, el poder de resolución tiene un valor doble; el detalle mínimo que entonces puede revelar el objetivo es igual a

$$\frac{\lambda}{2\,a}$$

Por ejemplo, la zona más brillante del espectro tiene una longitud de onda de 5.300 Å. Un objetivo con abertura numérica igual a 1 resolverá

dos líneas que estén separadas por una distancia de 5.300 Å/1 = 5.300 Å (0,00053 mm), si el haz luminoso es muy fino, y de 5.300 Å/ (2×1) = 2.650 Å (0,000265 mm), si el objetivo se halla totalmente iluminado.

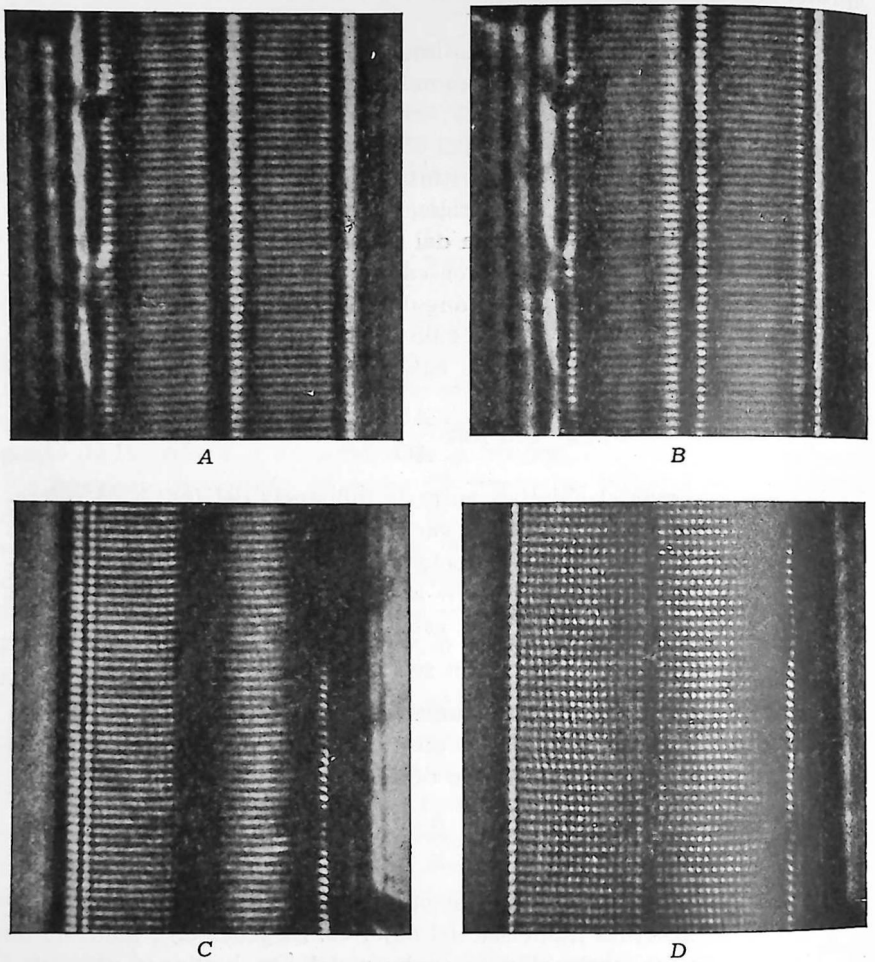


Fig. 5. — *Amphipleura pellucida*, diatomea. Efecto de la luz de distintas longitudes de onda sobre el poder de resolución de un objetivo. (De *Photomicrography*. con licencia de la Eastman Kodak Company.)

A, amarillo, 5.790 Å. *B*, verde, 5.460 Å. *C*, violeta, 4.360 Å. *D*, ultravioleta, 3.650 Å.

De lo expuesto se deduce que la máxima eficacia de un objetivo se consigue sólo iluminando por completo su lente posterior. Esto se comprueba quitando el ocular del microscopio y observando a simple vista la citada lente; si la vemos totalmente llena de luz, el poder del objetivo coincidirá entonces con las cifras que lleva grabadas.

Poder de resolución. En la figura 5 se ilustra la relación existente entre la longitud de onda y el poder de resolución. Con la luz de longitud de onda más corta, el objetivo resolverá los detalles más finos. Si empleamos un objetivo cuya abertura numérica sea 1, y un filtro amarillo (que transmite luz de 5.790 a 5.770 Å), es posible apreciar una distancia aproximada de 0,000289 mm, y de 0,000273 mm con un filtro verde (para luz de 5.460 Å); con filtro violeta (para luz de 4.360 Å) se resolverán dos puntos a 0,000218 mm, y con luz ultravioleta (para luz de 3.650 Å), el poder de resolución cubrirá una distancia aproximada de 0,0001825 mm.

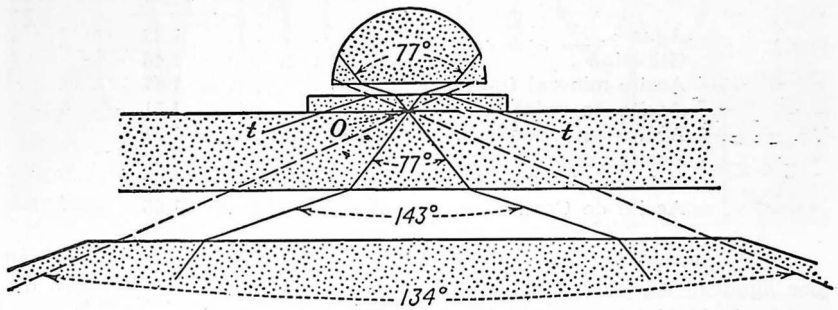


Fig. 6. — Paso de la luz a través de un objeto colocado sobre un porta, empleando objetivos en seco y de inmersión. (De *Photomicrography*, con licencia de la Eastman Kodak Company.)

Objetivos de inmersión. Cuando se emplea un objetivo en seco, a ambos lados del portaobjetos y del cubreobjetos hay una caja de aire; en este medio, el mayor cono de luz procedente de *O* (fig. 6) utilizable es de 180 grados, que viene a equivaler en el vidrio a un ángulo de 82 grados, correspondiente a una abertura numérica de 1. Sin embargo en la práctica estas cifras son de 143 y 77 grados, respectivamente, porque el espacio de aire tiene que ser bastante amplio para acomodarse a una distancia práctica de funcionamiento del objetivo. Los rayos de abertura angular superior a 82 grados en el vidrio, procedentes por difracción del punto *O* del objeto, experimentan reflexión total en la superficie interna *t* del cubreobjetos.

El índice de refracción *n* del aire es igual a 1; si el espacio que media entre el cubreobjetos y el objetivo se llena con un fluido de índice de refracción superior, como el agua ($n = 1{,}33$), o, lo que es aún mejor, con un líquido que tenga un índice de refracción sensiblemente igual al del vidrio, tal como el aceite de cedro ($n = 1{,}51$), se consiguen ángulos de más de 82 grados. Con este método se logran aberturas numéricas superiores a 1. El aceite de cedro permite que la luz atraviese sin desviación un medio homogéneo, dando un cono de luz de unos 134 grados, lo que corresponde a una abertura numérica de 1,4. Por este

procedimiento pueden resolverse, pues, finos detalles; con un objetivo de inmersión en aceite y una abertura numérica de 1,4 se separan dos líneas que disten 0,2 μ. Esto significa que el poder de resolución o la capacidad del objetivo para reproducir pormenores aumenta con su abertura numérica. En la tabla 1 se consignan los índices de refracción de varios medios empleados para objetivos de inmersión.

TABLA 1

	Índice de refracción a 25° C
Agua	1,33
Glicerina	1,46
Aceite mineral (parafina líquida)	1,47
Aceite de cedro	1,51
Aceite de sándalo	1,51
Aceite de inmersión de Shillaber	1,52
Bálsamo del Canadá	1,53
Aceite de Crown	1,55

Profundidad de foco. La profundidad de foco se conoce también por agudeza o penetración. La profundidad de foco de un objetivo depende de la abertura numérica y del aumento, y es inversamente proporcional a ambos; por tanto, a mayor abertura numérica y amplificación corresponde una profundidad menor de foco. Así, los objetivos muy potentes exigen un enfoque más minucioso que los de menos ampliación. Estas cualidades no puede cambiarlas el óptico.

Equivalencia de foco. En ocasiones, los objetivos se designan por su distancia focal equivalente, expresada en pulgadas o en milímetros. Designar un objetivo por una equivalencia focal de 1/12 de pulgada ó 2 mm significa que el sistema de lentes produce una imagen real del objeto de igual tamaño que la obtenida mediante una simple lente biconvexa o convergente con distancia focal de 1/12 de pulgada o 2 mm. Un objetivo designado por 1,3 pulgadas ó 33 mm produce una imagen real del mismo tamaño obtenido mediante una sola lente biconvexa con 1,3 pulgadas ó 33 mm de distancia focal.

Distancia de observación para objetos descubiertos. Si el objeto colocado en el porta no está tapado con el cubreobjetos, podemos decir que la distancia de observación es la que media entre la lente frontal o anterior del objetivo y el objeto perfectamente enfocado. Esta distancia es siempre menor que la equivalencia focal del objetivo, según se aprecia en la figura 7 A. Puede determinarse fácilmente la distancia de observación contando el número de vueltas completas del tornillo micrométrico necesarias para llevar el objetivo desde la superficie del portaobjetos hasta su posición de enfoque exacto. Veamos un ejemplo concreto:

Cada vuelta del tornillo micrométrico = 0,1 mm
Número de vueltas necesarias para enfocar perfectamente el objeto. . . = 6
Distancia de observación = $6 \times 0{,}1 = 0{,}6$ mm

Distancia de observación para objetos cubiertos. Si el objeto se halla bajo un cubreobjetos, la distancia entre la cara superior de éste y la lente frontal del objetivo será menor que cuando está descubierto.

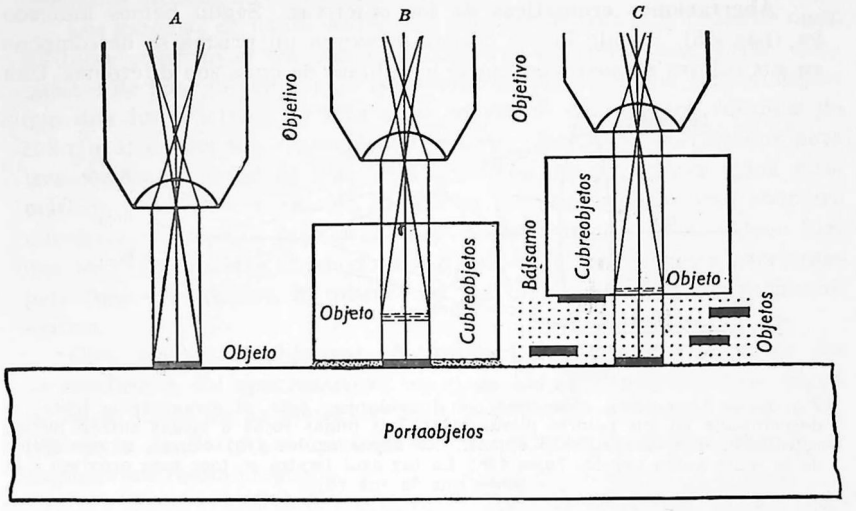


Fig. 7. — Distancia de observación de un objetivo. *A*, objeto descubierto; *B*, *C*, objeto bajo un cubre. (Reproducido de Gage, *The Microscope*, The Comstock Publishing Company, Inc.)

Es evidente que si el espesor del cubre es mayor que la distancia de observación del objetivo resultará imposible enfocar el objeto. Por otra parte, si el vidrio es fino, se podrá enfocar el objeto, mas el foco del microscopio no será el mismo para un objeto sin cubrir que para uno cubierto. En consecuencia, un objeto colocado bajo un cubreobjetos de vidrio u otro cuerpo muy refringente aparecerá como levantado, y esta elevación dependerá del índice de refracción del vidrio u otro medio que lo cubra, es decir, que aumenta con la refringencia del material cubriente, según se aprecia en la figura 7 B, C. Puede calcularse la profundidad aparente del objeto, desde la superficie del medio que lo cubre, tomando la cantidad inversa del índice de refracción de este último; si tal índice es de 1,52, su inversa será $1/1{,}52 = 2/3$, aproximadamente, lo que nos indica que la profundidad aparente del objeto es sólo de dos terceras partes de la real.

La distancia de observación para objetos cubiertos puede determinarse contando el número de vueltas completas del tornillo micromé-

trico necesarias para llevar el objetivo desde la superficie del cubreobjeto hasta su posición de enfoque exacto. He aquí un ejemplo concreto:

Cada vuelta del tornillo micrométrico = 0,1 mm
Número de vueltas necesarias para enfocar con precisión el objeto. . . = 3,5
Distancia de observación = 3,5 × 0,1 = 0,35 mm

Aberraciones cromáticas de los objetivos. Según hemos indicado ya (pág. 15), cuando la luz blanca atraviesa un prisma se descompone en sus colores elementales, cuyas longitudes de onda son diferentes. Una

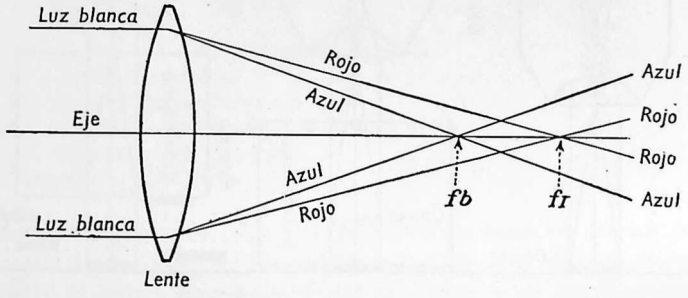


Fig. 8. — Aberración cromática con luz blanca; ésta, al atravesar la lente, se descompone en sus colores elementales. Las ondas rojas o largas sufren menor refracción que las azules o cortas. Los rayos azules (*fb*) cruzan el eje óptico de la lente antes que los rojos (*fr.*) La luz azul tendrá su foco más próximo a la lente que la luz roja.

lente simple o compuesta, formada de un solo material, puede mostrar distancias focales distintas para los diversos componentes de la luz blanca; esto obedece al poder de dispersión de la lente. Cada onda es refractada de modo distinto, según su longitud, más las cortas y menos las largas. Los rayos de color azul violeta cruzan primero el eje de la lente, que atraviesan luego los rayos rojos. Por tanto, tal como se indica en la figura 8, sobre el eje de la lente habrá una serie de focos de los distintos colores que componen la luz blanca, y la lente no nos dará una clara imagen de esta luz, sino una imagen rodeada de zonas o halos coloreados, que estorban la observación visual de su verdadero color. Este fenómeno se denomina aberración cromática, que puede aminorarse reduciendo la abertura de la lente, o todavía mejor empleando lentes formadas por más de un material (lentes compuestas). Para corregir la aberración cromática de un objetivo se necesitan dos o más vidrios o minerales diferentes, y el grado de corrección depende del poder de dispersión de los componentes del objetivo.

Escogiendo cuidadosamente dos vidrios ópticos para que den la imagen de dos longitudes de onda distintas en el mismo punto focal, tendremos una lente acromática, y el objetivo que posee tal sistema de

lentes se denomina objetivo acromático. Los restantes rayos de la luz blanca se reflejarán aproximadamente en el mismo punto; un objetivo acromático proporcionará imágenes sin halos de color pronunciado. Si el foco está algo desviado, pueden verse tenues halos verdes y rosados, que no constituyen grave inconveniente para los usos ordinarios del microscopio. Los objetivos acromáticos son universales para el trabajo visual y resultan muy satisfactorios en fotomicrografía si se emplea luz monocromática (conseguida mediante filtros).

Los sistemas de lentes corregidos para luz de tres longitudes de onda distintas constituyen los llamados objetivos apocromáticos. Están compuestos de fluorita combinada con lentes de vidrio óptico. Las imágenes que dan los objetivos de esta clase muestran sólo ligeros residuos de color azul o amarillo (espectro secundario). Por estar rectificados para tres colores en lugar de dos, estos objetivos son superiores a los acromáticos, y su gran corrección cromática permite emplear una abertura numérica mayor. Los rayos violeta se hacen coincidir en el mismo foco que los rayos visibles, de modo que dichos objetivos resultan excelentes para fines fotográficos, lo mismo con luz blanca que con luz monocromática.

Otro grupo de objetivos, de propiedades intermedias entre los acromáticos y los apocromáticos, es el de los semiapocromáticos. Si en su construcción se ha empleado fluorita mineral, reciben el nombre de «objetivos de fluorita»; también dan magníficos resultados cuando se emplean en fotomicrografía.

OCULARES

Las principales funciones del ocular son las siguientes:

1.ª Amplificar la imagen real del objeto que forma el objetivo.

2.ª Corregir algunos de los defectos del objetivo.

3.ª Reflejar retículos, escalas u otros objetos que se coloquen en el ocular.

Del tipo de objetivo que tenga el microscopio depende la clase de ocular empleado. Los más comúnmente usados son los de Huygens, los compensadores y los de campo plano.

Ocular de Huygens. Este tipo de ocular comprende dos lentes simples planoconvexas, una de las cuales está debajo del plano de la imagen (fig. 9); las superficies convexas de ambas lentes miran hacia abajo. En ocasiones, los oculares de este grupo son llamados oculares negativos. Constan de una lente de gran campo, que recoge los haces luminosos procedentes del objetivo y los dirige hacia el eje, sin alterar en absoluto la convergencia o divergencia de los rayos en los haces luminosos individuales. Por encima de esta lente, a alguna distancia de

ella, hay otra pequeña, la del ojo, cuya misión es convertir cada haz de luz en un sistema de rayos paralelos o muy poco divergentes, susceptibles de ser enfocados por el ojo. Los rayos, después de salir de esta lente, pasan por un pequeño espacio circular, conocido por círculo de

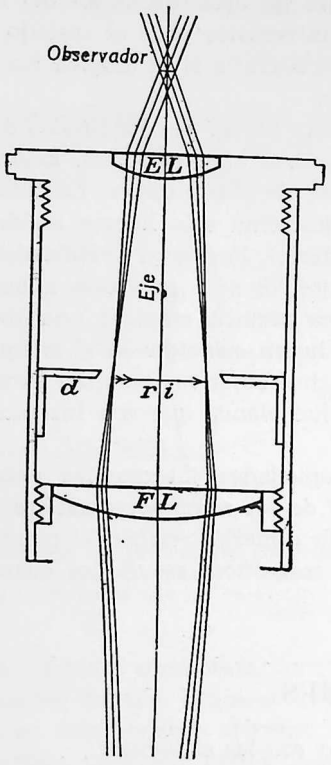


Fig. 9. — Ocular de Huygens. *EL*, lente ocular; *FL*, lente de campo; *ri*, imagen real formada entre las lentes oculares y el diafragma *d*. (Reproducido de Gage, *The Microscope*, The Comstock Publishing Company. Inc.)

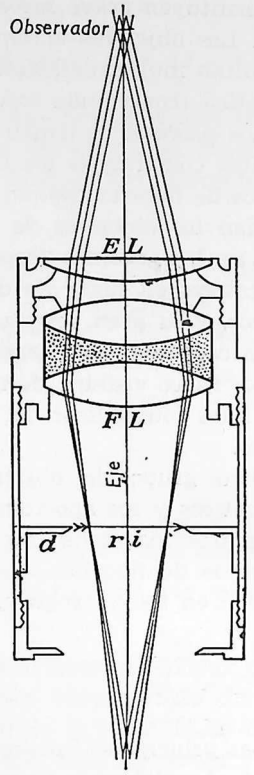


Fig. 10. — Ocular compensador. *EL*, lente ocular; *FL*, lente de campo compuesta de tres elementos; *ri*, imagen real, formada debajo de las lentes, en el diafragma *d*. (Reproducido de Gage, *The Microscope*, The Comstock Publishing Company, Inc.)

Ramsden o punto de vista. Puede verse que la imagen real se forma entre las dos lentes del ocular. La distancia que separa las dos lentes, en un ocular de este tipo es siempre un poco menor que la distancia focal del ocular; así se evita que cualquier suciedad de la lente de campo sea enfocada perfectamente por el ojo. La imagen se mirará por el orificio de Ramsden, a fin de conseguir el máximo campo visual y también la máxima luminosidad del mismo.

Un ocular de Huygens amplificará por igual luz de varios colores aun cuando las imágenes dadas por los distintos rayos no coincidan

todas en un mismo plano; esto se explica porque el ojo, gracias a su poder de acomodación, no es muy sensible a los efectos de desenfoque. El ocular de Huygens, que prácticamente es acromático, se ha proyectado para emplearlo principalmente con objetivos acromáticos.

Ocular compensador. Los oculares de este tipo consisten en un triplete acromático de lentes (fig. 10). Su corrección es mucho más perfecta que la de los oculares de Huygens, pues están rectificados para neutralizar las diferencias cromáticas de ampliación de los objetivos apocromáticos, a lo cual se aplicaron en principio, aun cuando pueden emplearse satisfactoriamente con poderosos objetivos acromáticos y de fluorita.

Ocular de campo plano. Los objetivos apocromáticos, cuando se emplean con oculares compensadores, dan campos que no son planos, y para corregir este defecto se han ideado los oculares de campo plano, que proporcionan campos mucho más planos que los otros tipos ya descritos, si bien su corrección cromática no es tan perfecta. Los oculares de esta clase reciben diversos nombres, tales como aplanéticos, planoscópicos, periplanéticos, etc. Pueden emplearse con fuertes objetivos acromáticos, de fluorita y apocromáticos, sin originar aberraciones cromáticas en la imagen. Su compensación para los colores viene a estar comprendida entre las de los oculares de Huygens y los oculares compensadores.

CONDENSADORES

Son varios los métodos empleados para iluminar el objeto que ha de examinarse. Los dos sistemas más usados en bacteriología son: iluminación por luz refractada e iluminación sobre campo obscuro.

Iluminación por luz refractada. Podemos decir que un condensador consiste en una serie de lentes destinadas a iluminar, por transmisión de la luz, el objeto que ha de estudiarse en el microscopio. Se halla colocado el condensador bajo la platina, entre el espejo y el objeto, mientras que las lentes del ocular y del objetivo están situadas por encima de la platina. A veces se le denomina condensador de luz oblicua. (Véase la figura 11.)

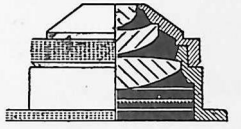


Fig. 11. — Condensador de luz oblicua; *A.N.* = 1,4 (Con licencia de Carl Zeiss, Inc.)

El condensador es necesario para observar un objeto cuando se emplea un objetivo de inmersión en aceite, a fin de obtener la iluminación adecuada. También es preferible emplearlo si se trabaja con potentes objetivos en seco. Los condensadores más comúnmente utilizados son probablemente los de abertura numérica de 1,2; si se emplea un objetivo de inmersión con 1,3 de abertura, la del condensador deberá ser

de 1,4, y, a medida que ésta aumenta, disminuyen la distancia de observación y el campo iluminado.

Un buen condensador envía la luz a través del objeto con un ángulo suficientemente amplio para que ocupe toda la abertura de la lente posterior del objetivo; en tal caso, éste presentará entonces su máxima abertura numérica. Para comprobarlo, se enfoca primero el objeto con un objetivo de inmersión; se quita luego el ocular del tubo y se mira por éste para observar la lente posterior del objetivo, teniendo cuidado de no desenfocar el aparato. La lente posterior del objetivo deberá estar uniformemente iluminada; de no ser así, ha de centrarse bien el espejo. Si el condensador tiene una abertura numérica inferior a la del objetivo, las partes periféricas o marginales de la lente posterior de éste no se iluminarán, aunque esté muy abierto el diafragma iris del condensador. Por el contrario, cuando la abertura numérica del objetivo es mayor que la del condensador, puede recibir aquél un exceso de luz, con el resultado de pérdida de contraste. A una abertura menor corresponde mayor profundidad de foco y contraste más acentuado de los componentes de la imagen. Se alcanza la mínima abertura tolerable cuando empiezan a aparecer bandas de refracción próximas a los bordes de la imagen del objeto. Esta dificultad puede salvarse ampliamente cerrando el diafragma iris del condensador hasta que sus láminas parezcan rodear la lente posterior del objetivo; entonces se dice que el diafragma está bien ajustado. Este ajuste varía con diferentes objetivos.

Iluminación sobre campo obscuro. La forma más corriente de emplear el microscopio es con luz que atraviese el objeto, y recibe el nombre de «microscopia» con luz refractada o transmitida o «microscopia en campo brillante». Un objeto no podrá verse de este modo a menos que absorba o refracte la luz que pase por él, con lo cual se establece un contraste entre el objeto y el medio circundante. Por lo mismo, no es fácil ver los objetos que contrastan muy débilmente con el fondo empleando iluminación en campo brillante.

Si la abertura del condensador se lleva al máximo, y se coloca un obturador para campo obscuro debajo del condensador, los rayos luminosos que llegan al objeto forman un cono hueco. Eligiendo un obturador de tamaño adecuado, se puede conseguir que todos los rayos directos procedentes del condensador caigan fuera del objetivo. Así, cualquier objeto que se halle dentro de este haz luminoso reflejará algo de luz hacia el objetivo, y se hará visible. Este método de iluminación, con el que se consigue que el objeto parezca luminoso, destacándose de un fondo obscuro, se conoce por iluminación sobre campo obscuro.

Para este segundo tipo de iluminación se emplean tres clases de condensadores: el de Abbe, el paraboloide y el cardioide.

El de Abbe es probablemente el de más extenso uso, pues sirve en particular para objetos que no requieren los aumentos mayores para

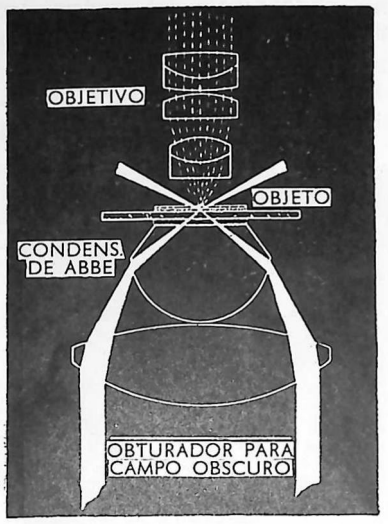


Fig. 12. — Condensador de Abbe con obturador para campo obscuro en su parte inferior. (De *Dark Field Optical Systems*, con licencia de la Bausch & Lomb Optical Company.)



Fig. 13. — Condensador de Abbe con elemento de campo obscuro. (De *Dark Field Optical Systems*, con licencia de la Bausch & Lomb Optical Company.)

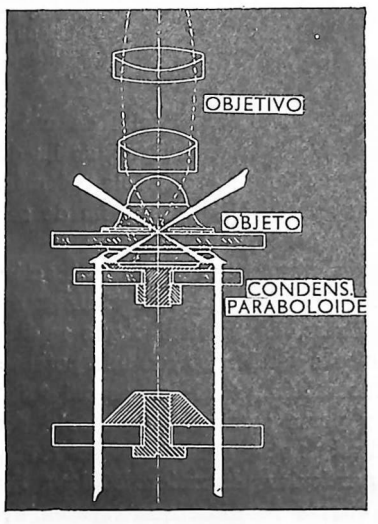


Fig. 14. — Condensador paraboloide. (De *Dark Field Optical Systems*, con licencia de la Bausch & Lomb Optical Company.)

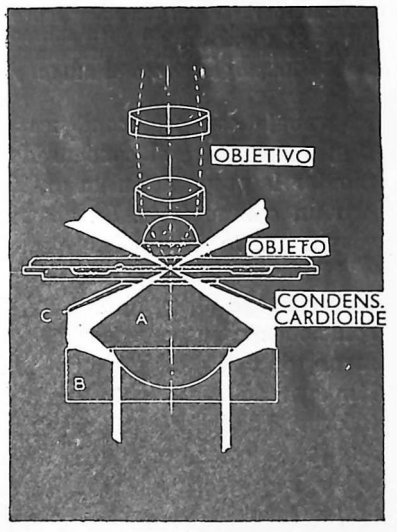


Fig. 15. — Condensador cardioide. (De *Dark Field Optical Systems*, con licencia de la Bausch & Lomb Optical Company.)

hacerse visibles. Se puede emplear colocando debajo del condensador un obturador para campo obscuro (fig. 12), o destornillando la parte alta del condensador para substituirla por un elemento de campo obscuro.

El condensador paraboloide se ha ideado para emplearlo con fuertes objetivos de inmersión y focos luminosos intensos (fig. 14). Cuando

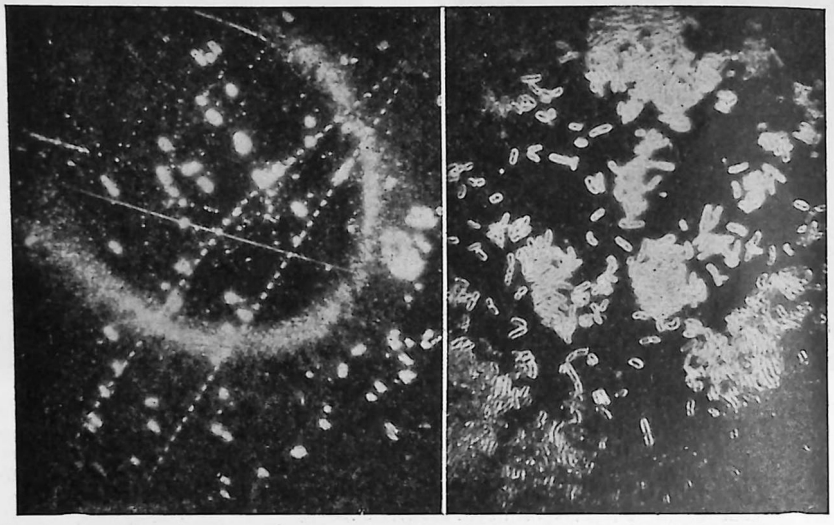


Fig. 16. — Portaobjetos para microscopia sobre campo obscuro. A la izquierda, fotomicrografía con luz solar sobre campo obscuro de *Caryophanon*, montado en porta de vidrio con un buen cubreobjetos; obsérvense los resguños y la suciedad. A la derecha, la misma preparación sobre porta de mica con un cubreobjetos limpio; el fondo es nítido, y excelente el efecto de campo obscuro.

se trabaja con este condensador es necesario aplicar aceite de cedro o glicerina entre el condensador y el portaobjetos. Asimismo, se ha de montar la preparación en un líquido o cemento, protegiéndola, además, con un cubreobjetos. La abertura numérica del objetivo no ha de ser mayor que la del condensador.

El condensador cardioide es el de mayor exactitud para iluminación sobre campo obscuro (fig. 15). Se destina especialmente al examen de soluciones o suspensiones coloidales, esto es, de partículas que miden menos de 0,25 μ de diámetro. Da los mejores resultados con una potente lámpara de arco; pero como la concentración de la luz es así muy intensa, no deberán usarse los cubre y porta corrientes de vidrio, ya que los defectos perceptibles y la dificultad de eliminar cuerpos extraños del vidrio estorban la visibilidad de partículas ultramicroscópicas. Es mejor servirse de cubres y portas de cuarzo fundido, que carecen de burbujas de aire y otros defectos, y pueden calentarse a la llama para eliminar cualquier suciedad, después de haberlos limpiado químicamente. Pijper (1951) recomienda emplear portaobjetos delgados, a los

que se adhieren trozos de mica de análogas dimensiones mediante bálsamo del Canadá. Una vez endurecido el bálsamo, se hace saltar una delgada capa de mica con un cuchillo afilado, y queda así una superficie intacta, sin rayas ni polvo, perfectamente apropiada para microscopia sobre campo obscuro (fig. 16).

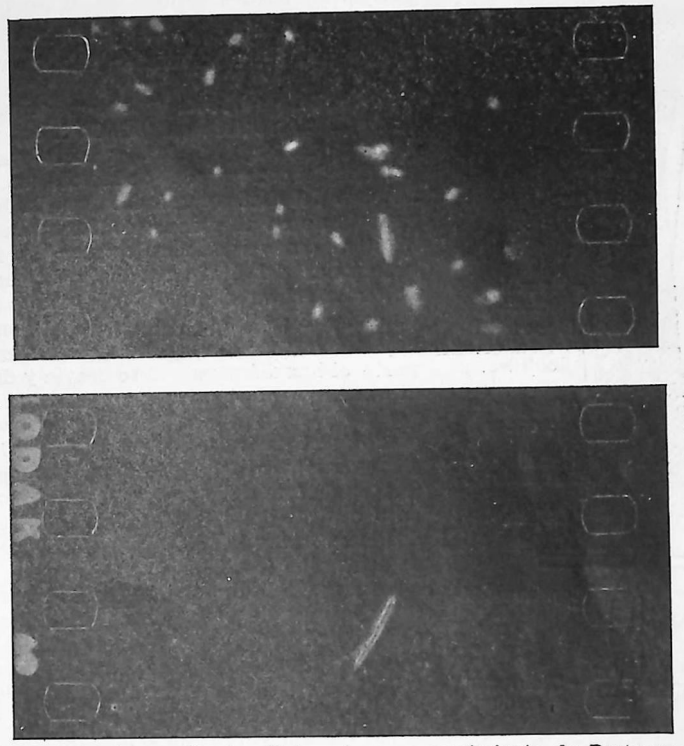


Fig. 17. — Fotomicrografía de células vivas en movimiento de *Proteus vulgaris*, obtenida con iluminación sobre campo obscuro.

En la figura 17 pueden verse unas fotomicrografías de células vivas de *Proteus vulgaris*, tomadas con iluminación sobre campo obscuro.

MICROSCOPIO DE FASE

El principio del microscopio de fase no es nuevo, pues su descubrimiento data de 1892, pero hasta hace poco no se ha adaptado a usos prácticos. No substituye los actuales métodos de microscopia, sino que les sirve de complemento.

La microscopia de fase sirve para comprobar el contraste en la imagen y hacer visibles microorganismos vivos sin teñir, así como sus

pormenores citológicos. También mejora la visibilidad de material teñido sin gran contraste. El método empleado para fijar y teñir bacterias puede alterar su tamaño. La célula bacteriana suele contraerse considerablemente al secarla y fijarla. Como los microorganismos presentan bordes nítidos en el microscopio de fase, cuando no se tiñen, es posible medir con él exactamente células vivas.

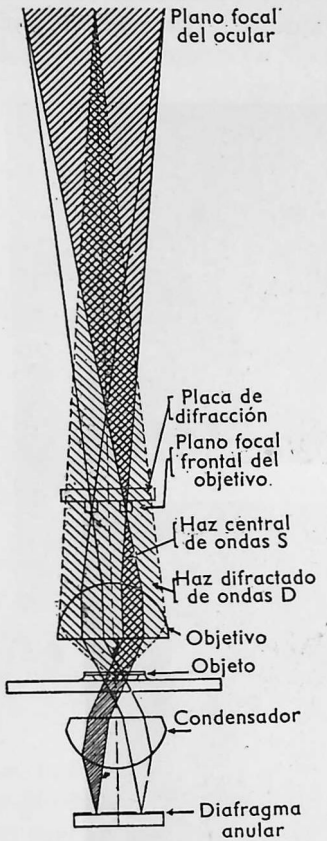


Fig. 18. — Esquema de la disposición óptica de un microscopio de fase. (Con licencia de la American Optica Co.)

En la figura 18 se expone un esquema de la disposición óptica general. Se coloca un diafragma anular (fig. 19) en el plano focal interior del condensador de luz oblicua. El haz obscuro del diafragma indica que la luz procedente de su abertura, no difractada por el objetivo, converge para formar la imagen geométrica del diafragma en el plano focal posterior del objetivo; así, todo el haz central de ondas *S* se limita a la imagen geométrica del diafragma del condensador. Por otra parte, el haz difractado *D* se desvía y dispersa al pasar por el objetivo, de modo que la mayoría de sus rayos atraviesan la zona del plano focal posterior no ocupada por la imagen geométrica del diafragma. Por tanto, la imagen de éste sirve para separar el haz luminoso central del haz difractado. En el sitio donde se forma la imagen se sitúa una placa de difracción (fig. 20).

La mayoría de los materiales transparentes y la materia viva poseen un índice superior al del medio acuoso circundante. En los casos, relativamente pocos, en que no sucede así, el haz *S* se retarda 1/4 de longitud de onda con relación al haz *D*; es decir, que si el haz central se retarda artificialmente 1/4 de longitud de onda, la partícula aparecerá más obscura que el fondo; pero si el que se retarda así es el haz difractado, la partícula se verá más clara que el fondo.

La introducción de un retardo artificial permite, pues, que una partícula transparente aparezca más clara que el fondo (contraste claro), o más obscura (contracte obscuro). En el microscopio de fase este retardo artificial se consigue por medio de una placa de difracción.

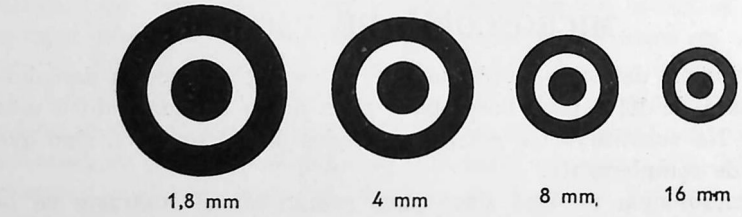


Fig. 19. — Diafragmas anulares. (Con licencia de la American Optical Company.)

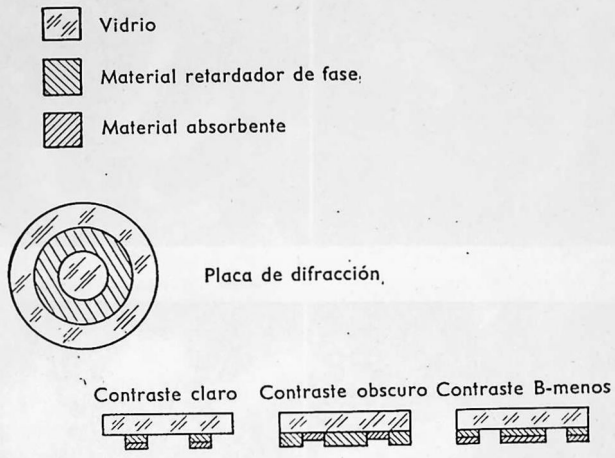


Fig. 20. — Placa de difracción. (Con licencia de la American Optical Company.)

En la figura 21 se exponen fotomicrografías de preparaciones de *Azotobacter agile*, obtenidas mediante microscopia de fase, con el fondo ligeramente teñido de nigrosina.

Más informes sobre microscopia de fase se encuentran en los trabajos de Bennet, Jupnik, Osterberg y Richards (1951), y de Richards (1952).

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

En los últimos años se ha desarrollado un instrumento cuyo poder de resolución es muy superior al del microscopio corriente que emplea luz visible. En su lugar utiliza un haz de electrones, y se conoce por el nombre de microscopio electrónico (fig. 22).

Los haces de electrones, o rayos catódicos, que avanzan rectamente en ausencia de cualquier substancia o campo, pueden concentrarse en ciertos casos y ser desviados por un campo magnético electrostático. Existe una gran semejanza entre la acción de un campo magnético o eléctrico giratorio, de carácter simétrico, sobre un haz electrónico, y la acción de una lente de vidrio sobre un rayo luminoso (fig. 23).

Con el microscopio electrónico es posible obtener imágenes sumamente aumentadas, gracias a los sistemas ópticos de electrones, por combinación de dos o más «lentes» electrónicas. La longitud de onda de los electrones, considerablemente menor que la de la luz visible, es

(1) Reproducido de «Phase Microscopes», American Optical Company, Buffalo, N. Y.

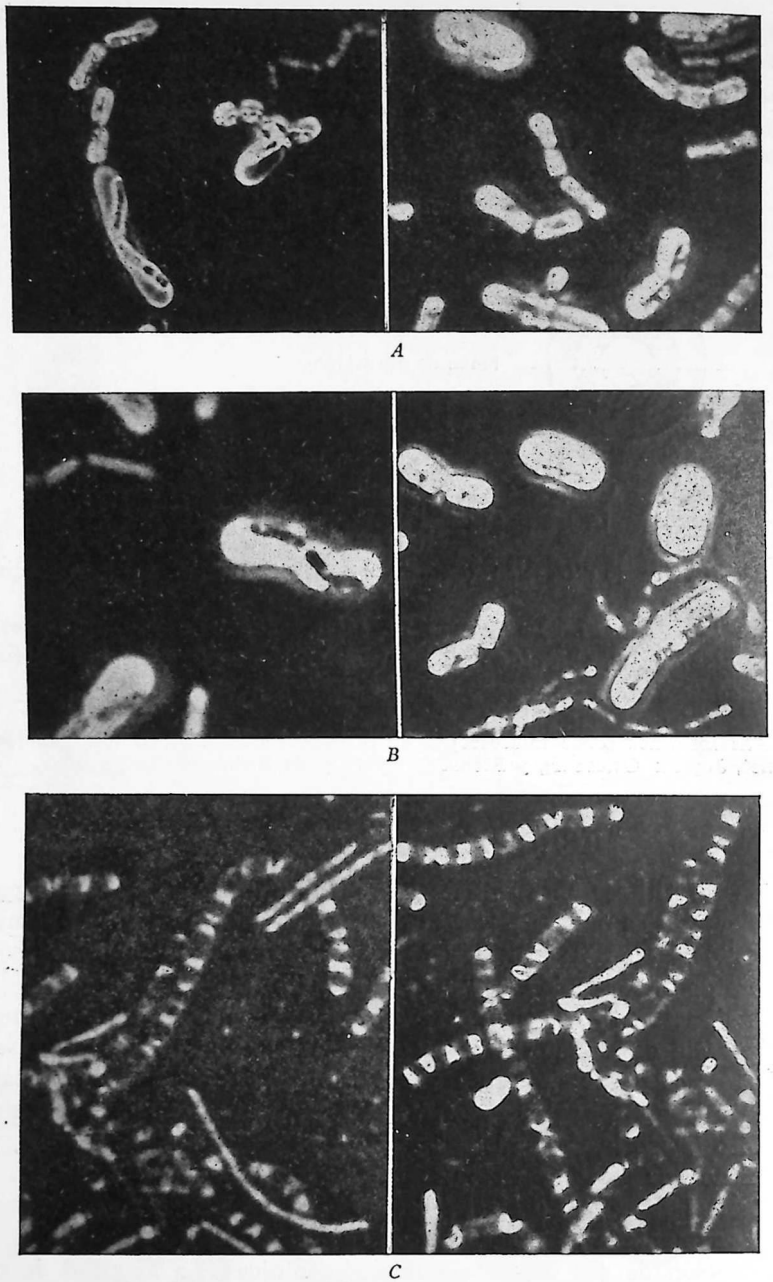
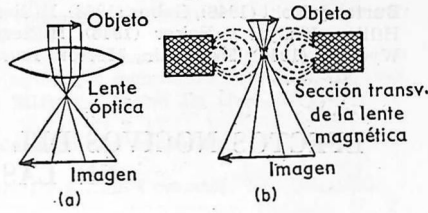


Fig. 21. — Micrografías de fase de *Azotobacter agile*, después de teñir ligeramente el fondo con nigrosina. *A*, *B*, bastoncillos jóvenes grandes, con diferenciación interna; *C*, posiblemente concentraciones de material en polos y a lo largo de líneas divisorias, más bien que «cuerpos cromatínicos». (Según Eisenstark, McMahon y Eisenstark.)

función de su velocidad. Para velocidades comprendidas entre 30.000 y 100.000 voltios, tal longitud de onda es sólo 1/100.000 de la luz visible. Las veloces ondas electrónicas son demasiado cortas para poderlas «ver», pero con ellas los microorganismos y las partículas diminutas observadas proyectan imágenes sobre una pantalla fluorescente, en la que se hacen perceptibles y se pueden fotografiar.



Un buen microscopio de lente

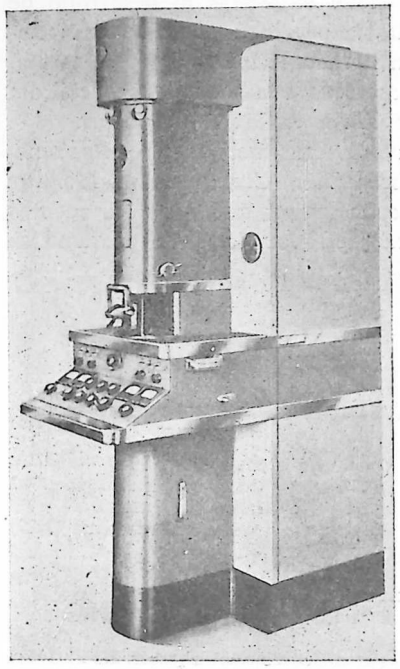


Fig. 22. — Microscopio electrónico RCA, con su generador de energía. (De *R C A Electron Microscope*, con licencia de la Radio Corporation of América.)

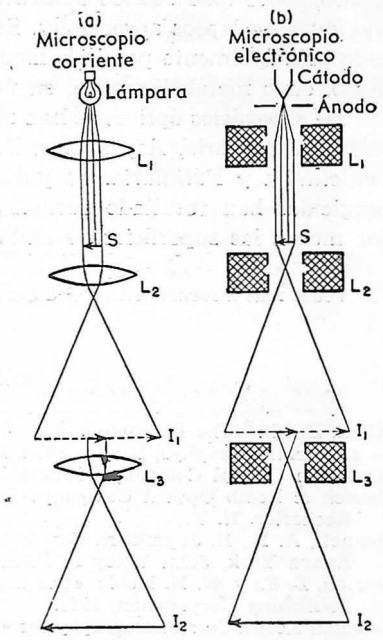


Fig. 23. — Esquema de un microscopio ordinario (*a*) y de otro electrónico (b) (De *R C A Electron Microscope*, con licencia de la Radio Corporation of América.)

óptica da aumentos de 2000 diámetros, y con luz ultravioleta se llega a unos 3000 diámetros. El microscopio electrónico permite aumentos directos de 10.000 a 30.000 diámetros, con tal riqueza de detalles, que es posible obtener microfotografías en tamaño 100.000 y hasta 200.000 veces mayor que el natural. El poder de resolución de este microscopio supera tanto al del instrumento óptico ordinario, que proporciona imágenes de

moléculas de proteínas, cristales de virus, bacteriófagos, flagelos sin teñir, estructuras internas de bacterias, etc.

Contienen más pormenores sobre el microscopio electrónico los trabajos de Burton y Kohl (1946), Gabor (1948), Hillier (1946, 1949, 1950), Hillier y Baker (1946), Hillier, Knaysi y Baker (1948), Hillier, Mudd y Smith (1949), Williams (1947), Wyckoff (1949), Zworykin, Morton, Ramberg, Hillier y Vance (1945).

EFECTOS NOCIVOS DEL DESARROLLO DE MOHOS EN LAS LENTES

Las superficies del vidrio óptico están expuestas al desarrollo de mohos, sobre todo cuando aumentan la temperatura y la humedad relativa durante lapsos apreciables. Según Richards (1949), el vidrio es atacado principalmente por la humedad asociada a la acción superficial del moho, cuyo metabolismo da, en último término, ácidos orgánicos.

De superficies ópticas se han aislado diversos mohos, entre ellos especies de *Alternaria, Aspergillus, Bassisosporium, Cladosporium, Monilia, Penicillium* y *Pullularia*. La pulcritud, la poca humedad y los agentes fungicidas han resultado eficaces para preservar de daños ocasionados por mohos las superficies de lentes.

Véase más información en Ezekiel (1950).

REFERENCIAS

Allen, R. M.: «The Microscope», Londres, Chapman & Hall, Ltd., 1940.

— «Photomicrography», Nueva York, D. Van Nostrand Company, Inc., 1941.

American Optical Company: «Phase Microscopes», Buffalo, N. Y., 1948.

Bausch & Lomb Optical Company: Dark field optical systems, Catalogue D-22, Rochester, N. Y.

Bennett, A. H., H. Jupnik, H. Osterberg, y O. W. Richards: «Phase Microscopy», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1951.

Burton, E. F., y W. H. Kohl: «The Electron Microscope», Nueva York, Reinhold Publishing Corporation, 1946.

Eastman Kodak Co.: Photography through your microscope, Rochester, N. Y., 1952.

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

—, — y R. Eisenstark: A cytological study of a pleomorphic strain of *Azotobacter* wiht he electron and phase microscopes and the Robinow nuclear-straining technique, *J. Bact.*, **59**: 75, 1950.

Ezekiel, W. N.: Mycological problems in deterioration of military equipment, *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **12**: 224, 1950.

Gabor, D.: «The Electron Microscope», Brooklyn, Chemical Publishing Company, Inc., 1948.

Gage, S. H.: «The Microscope», Ithaca, N. Y., Comstock Publishing Company, Inc., 1941.

Hall, C. E.: «Introduction to Electron Microscopy», Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1953.

Hillier, J.: Electron microscopy, *Am. Ceramic. Soc. Bull.*, **25**: 438, 1946.

Hillier, J.: Some remarks on the image contrast in electron microscopy and the twocomponent objective, *J. Bact.*, **57**: 313, 1949.

—: Electron microscopy, *Ann. Rev. Microbiol.*, **4**: 1, 1950.

— y R. F. Baker: The mounting of bacteria for electron microscope examination, *J. Bact.*, **52**: 411, 1946.

—, G. Knaysi, y R. F. Baker: New preparation techniques for the electron microscopy of bacteria, *ibid.*, **56**: 569, 1948.

—, S. Mudd, y A. G. Smith: Internal structure and nuclei in cells of *Escherichia coli* as shown by improved electron microscopic techniques, *ibid.*, **57**: 319, 1949.

Muñoz, F. D., y H. A. Charipper: «The Microscope and Its Use», Nueva York, Clay-Adams Co., Inc., 1943.

Pijper, A.: Slides and cover-glasses for dark-ground microscopy, *J. Roy. Microscop. Soc.*, **71**: 176, 1951.

Richards, O. W.: Phase microscopy, *Wallerstein Lab. Commun.*, **15**: 155, 1952.

—: «The Effective Use and Proper Care of the Microscope», Buffalo, N. Y., Spencer Lens Company, 1941.

—: Phase microscopy in bacteriology, *Stain Technol.*, **23**: 55, 1948.

Shillaber, C. P.: «Photomicrography», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1944.

Williams, R. C.: The electron microscope in biology, *Growth Symposium*, **11**: 205, 1947.

Wredden, J. H.: «The Microscope», Nueva York, Grune & Stratton, Inc., 1948.

Wyckoff, R. W. G.: «Electron Microscopy», Nueva Yorck, Interscience Publishers Inc., 1949.

Zworykin, V. K., G. A. Morton, E. G. Ramberg, J. Hillier, y A. W. Vance: «Electron Optics and the Electron Microscope», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1945.

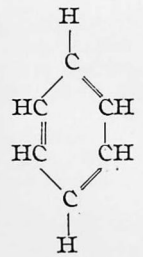
CAPÍTULO III

COLORANTES BIOLÓGICOS

Las bacterias son casi incoloras, por lo cual resulta difícil verlas en el microscopio; hay que teñirlas para distinguir los pormenores de sus estructuras externa e interna, que sirven de base para su identificación y clasificación.

En los primeros años de la Bacteriología predominaban las substancias tintóreas naturales, de las que actualmente se emplean sólo unas pocas. Gradualmente las han reemplazado los colorantes artificiales o sintéticos. Como los primeros tintes de esta clase se obtuvieron a partir de la anilina, es corriente llamarlos tintes o colorantes de anilina, a pesar de que muchos de ellos no proceden de este compuesto ni tienen con él relación; sería mejor denominarlos «colorantes de alquitrán», ya que proceden en su totalidad de una o más substancias contenidas en el mismo.

Los colorantes de alquitrán se pueden considerar derivados del compuesto cíclico benceno o benzol:



La fórmula empírica es C_6H_6, y la estructural suele escribirse omitiendo los dobles enlaces y los átomos de hidrógeno, con lo que se reduce a un simple hexágono, en el cual cada vértice representa un átomo de carbono y uno de hidrógeno:

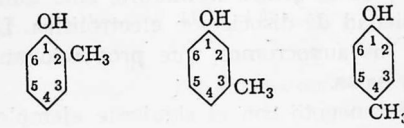


Este hexágono se conoce por anillo o núcleo bencénico.

Algunos elementos o radicales pueden substituir uno o más átomos de hidrógeno. Por ejemplo, reemplazando un átomo de hidrógeno por un grupo hidroxilo (OH), se produce el compuesto fenol o ácido fénico:



Si se reemplaza otro átomo de hidrógeno por un grupo metilo (CH_3), se obtiene el compuesto conocido por cresol. Según el átomo de hidrógeno substituído, son posibles tres cresoles distintos, a saber:



Los radicales substitutivos están en las posiciones 1-2 (orto), 1-3 (meta) ó 1-4 (para), y los compuestos respectivos se denominan ortocresol, metacresol y paracresol. Los prefijos se representan generalmente abreviados por las letras *o*-, *m*- y *p*-.

Las quinonas son compuestos producidos por eliminación de dos átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo de un compuesto aromático dihidroxilado. La quinona más sencilla es la benzoquinona, llamada también simplemente quinona:

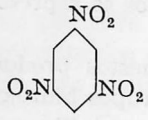


El anillo bencénico de las quinonas posee dos dobles enlaces, en lugar de los tres que tiene un cresol. La fórmula de la benzoquinona indica que no es un verdadero derivado del benceno, sino la dicetona de un *p*-hidrobenceno. Las substancias que contienen el anillo de la quinona se denominan compuestos quinónicos; los dobles enlaces de estos cuerpos se suponen fijos, y no móviles como los del benceno. Son numerosos los colorantes que contienen el anillo de la quinona.

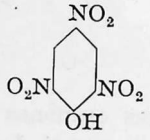
COLORANTES

Definición de un colorante o tinte. Puede definirse un tinte como una substancia o compuesto orgánico que tiene los grupos cromóforo y auxocromo ligados al núcleo bencénico. Un grupo cromóforo comunica al cuerpo la propiedad del color. Los compuestos de benceno que tienen radicales cromóforos se denominan cromógenos. Estos compuestos, aunque poseen color, no son tintes, pues carecen de afinidad o capacidad para unirse a fibras o tejidos; el color puede eliminarse fácilmente por medios mecánicos. Para que sean tintes es necesario que contengan, no sólo el grupo cromóforo, sino también otro que les comunique la propiedad de disociación electrolítica. Los grupos de esta segunda clase son los auxocromos, que proporcionan al compuesto la cualidad de formar sales.

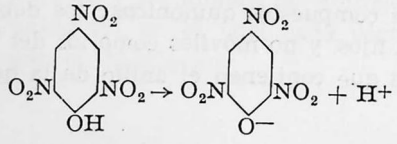
Aclaremos este concepto con el siguiente ejemplo: El grupo nitro (NO_2) se puede considerar como un cromóforo. Cuando en la molécula de benceno se substituyen tres átomos de hidrógeno por tres grupos nitro, se origina el trinitrobenceno:



Esta substancia, de color amarillo, es un cromógeno, pero no un tinte; no se disocia por electrólisis, y es por ello incapaz de dar sales con ácidos ni con bases. Pero si se cambia otro átomo de hidrógeno por un grupo auxocromo, tal como (OH), se forma el compuesto denominado ácido pícrico:



Este cuerpo es también de color amarillo, y capaz de disociarse como sigue:

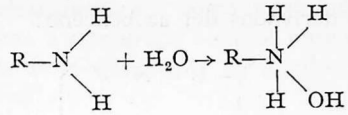


La porción colorante de la molécula tiene carga eléctrica negativa; es, por tanto, un tinte ácido, que forma sales con las bases. El color del

ácido pícrico proviene de los grupos cromóforos (NO_2), y sus propiedades tintóreas, del grupo hidroxilo (OH) auxocromo, que hace al compuesto capaz de disociación electrolítica.

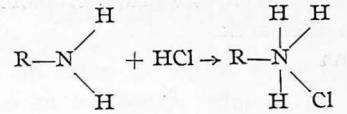
Colorantes ácidos y básicos. Los grupos auxocromos son ácidos (OH) o básicos (NH_2). Los tintes ácidos se ionizan y dan a la porción colorante de la molécula un anión o carga eléctrica negativa; los tintes básicos, al ionizarse, ceden a esa porción de la molécula un catión o carga eléctrica positiva.

El grupo amino es básico porque su átomo de nitrógeno (N) pasa a pentavalente por adición de agua.



Amina — Base amónica orgánica

o de un ácido:



Amina — Clorhidrato de amina

El grupo hidroxilo es débilmente ácido porque proporciona hidrogeniones por disociación. El grupo amino (NH_2) es más fuerte como base que el grupo (OH) como ácido. Cuanto mayor sea el número de uno de estos grupos en un compuesto, más fuerte será el ácido o la base que formen. Si ambos radicales se hallan en la molécula, predomina el carácter básico del radical amínico.

Algunos colorantes llevan unido al anillo bencénico el grupo sulfónico (SO_2OH), fuertemente ácido, que posee la propiedad de formar sales. Este radical, débilmente auxocromo, sirve para dos fines muy principales en la molécula de colorante: 1.º, hace solubles en agua los tintes, y 2.º, transforma un tinte básico en uno de carácter ácido al introducirse en el núcleo bencénico. Como la auxocromía del radical es sólo débil, un cuerpo que contenga un cromóforo y el grupo sulfónico no será colorante mientras no presente además un grupo auxocromo.

Los tintes del comercio no son ácidos ni bases en su verdadera acepción. Los colorantes básicos están constituidos por sales de bases de color, generalmente cloruros, sulfatos o acetatos; los colorantes ácidos son sales de ácidos coloreados, generalmente sódicas, y a veces potásicas, cálcicas o amónicas.

En bacteriología se emplean colorantes básicos y ácidos. Estos últimos sirven sobre todo para teñir el citoplasma; los básicos tiñen más intensamente los componentes ácidos de la substancia nuclear.

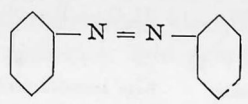
Cromóforos. Para que un compuesto sea un tinte, es necesario que tenga, por lo menos, un grupo cromóforo que le comunique la propiedad del color. Algunos de estos grupos dan reacción básica, y otros la dan ácida.

Cromóforos básicos. Los cromóforos básicos comprenden los grupos azo, acina e indamina.

1. El grupo azo

$$-N=N-$$

se halla en todos los colorantes azoicos, en los que a cada átomo de hidrógeno está ligado un núcleo de benceno. Los tintes de este grupo pueden considerarse derivados del azobenceno:



Ejemplos de colorantes con este grupo cromóforo son el anaranjado de metilo y el pardo Bismarck.

2. El grupo acina

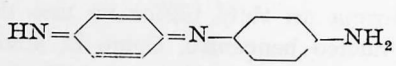


está contenido en las fenacinas. El rojo neutro y las safraninas son ejemplos de este tipo de colorantes.

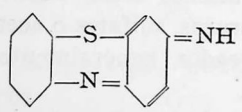
3. El grupo indamínico

$$-N=$$

se halla en las indaminas, tiacinas y otras substancias. Muchos de estos colorantes tienen dos anillos bencénicos unidos al átomo de nitrógeno; uno de los grupos muestra estructura quinónica:



En las tiacinas, los anillos bencénicos están unidos además por un átomo de azufre. El núcleo de tiacina más sencillo tendrá la siguiente constitución:



Un colorante muy conocido con esta base tiacínica es el azul de metileno.

Cromóforos ácidos. Los cromóforos ácidos comprenden el grupo nitro y el anillo quinónico.

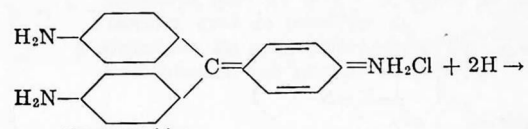
1. El grupo nitro (NO_2) se halla en muchos compuestos; un ejemplo de ellos es el ácido pícrico.
2. El núcleo quinónico



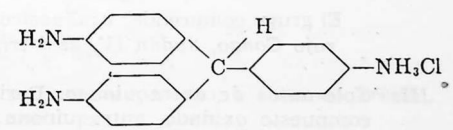
se encuentra en muchos colorantes, como indaminas, xantenos, di y trifenilmetanos. Pertenecen a este grupo algunos muy conocidos: ácido rosólico, fucsina, violetas de metilo, verde de metilo, violeta cristal, *p*-rosanilina, etc.

LEUCODERIVADOS

Los cromóforos no están saturados y se reducen fácilmente por adición de hidrógeno en los dobles enlaces; así, es posible reducir el grupo nitro a radical amino, y romper el enlace entre los átomos de nitrógeno del grupo acina, para substituirlos por dos átomos de hidrógeno, o romper los dobles enlaces del anillo quinónico, tomando cada valencia libre un átomo de hidrógeno. La reducción del grupo cromóforo acarrea una pérdida de color, y entonces reciben el nombre de leucoderivados o leucobases estos tintes decolorados. Los colorantes se pueden emplear como indicadores en oxidaciones y reducciones. La decoloración de la *p*-rosanilina puede representarse por la siguiente ecuación:



Pararrosanilina



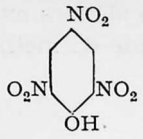
Leucopararrosanilina

CLASIFICACIÓN DE LOS TINTES BIOLÓGICOS

En la tabla 2 se indican los principales tintes empleados en bacteriología; algunos son ácidos, y otros básicos. Por razones ya apuntadas, los tintes básicos son los de más importancia para el bacteriólogo. Los colorantes se clasifican, en lo posible, de acuerdo con los grupos cromóforos que contienen:

TABLA 2. — CLASIFICACIÓN DE LOS TINTES BIOLÓGICOS

I. *Colorantes nitro.* El cromóforo es $-NO_2$, y todos son ácidos:

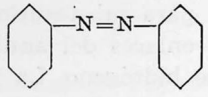


Ácido pícrico

El grupo comprende: *ácido pícrico, aurancia, amarillo de Martius.*

II. *Colorantes azoicos.* Pueden dividirse en dos subgrupos: *a*, monoazoicos, y *b*, dis y poliazoicos.

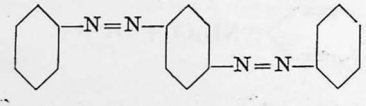
a) *Colorantes monoazoicos.* El cromóforo $-N=N-$ une anillos de benceno o de naftaleno; y en estos colorantes no se repite:



Generalmente, en la posición para respecto al grupo azo hay un grupo hidroxilo o amino en uno de los núcleos bencénicos.

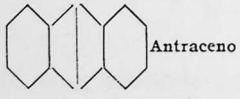
El grupo comprende: *rojo Burdeos, amarillo brillante S, crisoidina Y, verde Jano B, anaranjado de metilo, rojo de metilo, anaranjado G, Sudán R.*

b) *Colorantes dis y poliazoicos.* A veces se halla más de un cromóforo en la molécula:

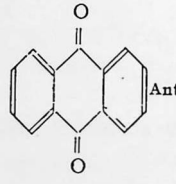


El grupo comprende: *azul azoico, escarlata Biebrich, pardo Bismark Y, rojo Congo, Sudán IV, azul tripano, negro Sudán B.*

III. *Colorantes de antraquinona.* Derivan del antraceno, pasando por el compuesto oxidado, antraquinona:



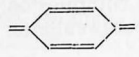
Antraceno



Antraquinona

El anillo quinónico es el cromóforo, y la antraquinona, el cromógeno. El grupo comprende: *alizarina, rojo de alizarina, purpurina.*

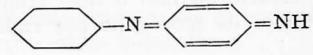
IV. *Colorantes de quinonimina.* Contiene dos cromóforos: el grupo de la indamina $-N=$ y el anillo quinónico.



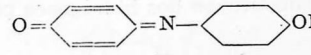
Derivan del compuesto teórico paraquinondiimina:



En una fórmula típica, uno de los átomos de hidrógeno del radical imina está substituido por un grupo fenilo:

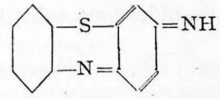


1. *Indaminas.* Son aminoderivados metilados de la indamina, y carecen de importancia biológica.
2. *Indofenoles.* Están íntimamente relacionados con las indaminas; el más sencillo es el indofenol:



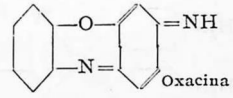
El grupo comprende: *azul de indofenol.*

3. *Tiacinas.* Tienen un átomo de azufre ligado a los radicales fenilo y quinona, para formar un tercer anillo cerrado:



Este grupo, en el que figuran algunos de los colorantes biológicos más importantes, comprende: *azul celeste A y B, azul celeste de metileno, azul de metileno, verde de metileno, violeta de metileno, tionina, azul de toluidina O.*

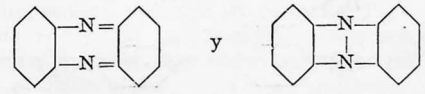
4. *Oxacinas.* En estos colorantes el átomo de azufre de las tiacinas está reemplazado por uno de oxígeno:



Oxacina

El grupo comprende: *azul brillante de cresilo, violeta de cresilo, sulfato de azul Nilo, resazurina.*

5. *Acinas.* Son derivados de la fenacina, compuesto que consta de dos núcleos bencénicos, unidos por dos átomos de nitrógeno, para formar un tercer anillo. Tienen dos fórmulas posibles:



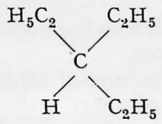
En la primera fórmula, el cromóforo es el anillo quinónico; en la segunda, lo es el grupo acina —N = N—.

a) *Aminoacinas.* Resultan de introducir uno o más grupos amino en la molécula de fenacina; son útiles sobre todo como indicadores.
El grupo comprende: *rojo neutro, violeta neutro.*

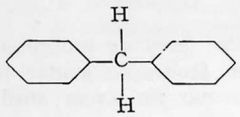
b) *Safraninas.* En estos compuestos, uno de los átomos de nitrógeno del grupo acina es pentavalente, y lleva ligado otro anillo bencénico.
El grupo comprende: *violeta amatista, azocarmín G, safranina O.*

c) *Indulinas.* Son aminoderivados intensamente metilados de las safraninas.
El grupo comprende: *indulina* y *nigrosina* hidrosolubles.

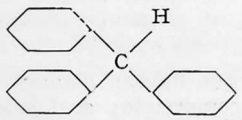
V. *Colorantes de fenilmetano.* En este grupo figuran los colorantes de mayor importancia en bacteriología. Los compuestos son metanos substituidos, y pueden estarlo en uno o más átomos de hidrógeno. Si se substituyen tres átomos de hidrógeno por radicales etílicos, se forma el trietilmetano:



Si en el metano se substituyen dos hidrógenos por dos fenilos, tenemos el difenilmetano:

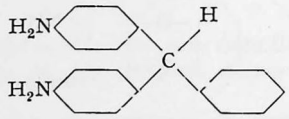


Si son tres los átomos de hidrógeno substituídos, se produce el trifenilmetano:



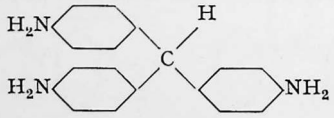
La introducción de grupos amino y otros, o aminosubstituidos, proporciona un gran número de compuestos posibles.

1. *Colorantes de diaminotrifenilmetano.* Con excepción de los derivados sulfonados, son colorantes fuertemente básicos.



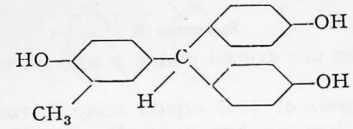
El grupo comprende: *Verde brillante, verde claro amarillento SF, verde de malaquita.*

2. *Colorantes de triaminotrifenilmetano.* Son fuertemente básicos, salvo los derivados sulfonados, que son ácidos.



El grupo comprende: *fucsina ácida, fucsina básica, violeta cristal, verde de etilo, violeta de etilo, violeta de Hofmann, verde de yodo, azul de metilo, verde de metilo, violeta de metilo, neofucsina, pararosanilina, rosanilina, azul espíritu, azul Victoria 4R.*

3. *Colorantes de hidroxitrifenilmetano.* Son derivados del trifenilmetano, en los que los grupos amínicos de las rosanilinas se han substituído por hidroxilos, trocando en ácidas sus propiedades básicas.

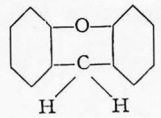


Ácido leucorrosólico

Los miembros de este grupo, que comprende el *ácido rosólico,* se emplean sobre todo como indicadores.

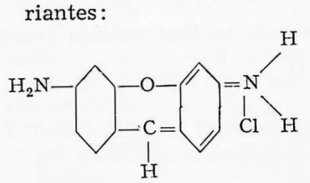
4. *Colorantes de difenilnaftilmetano.* Son naftilderivados de los colorantes de difenilmetano.
El grupo comprende: *azul Victoria B, verde de lana.*

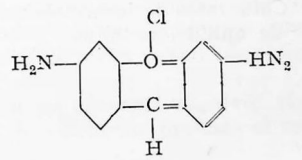
VI. *Colorantes de xanteno.* Derivan del compuesto xanteno:

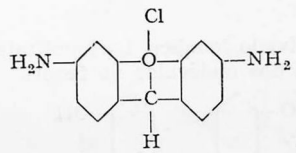


Los hay ácidos y básicos, y en el grupo figuran los indicadores más útiles empleados en bacteriología.

1. *Colorantes de pironina.* Son derivados diaminometilados del xanteno. Están estrechamente relacionados con los difenilmetanos; su fórmula es similar a la de las oxacinas, pero el átomo de hidrógeno del anillo central está substituido por un radical (CH). Son posibles tres variantes:



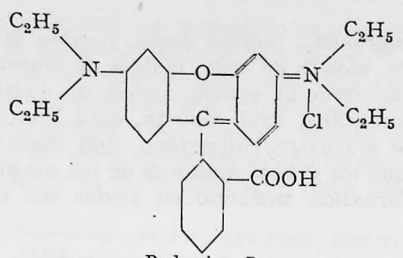




El grupo comprende: *pironina B, pironina Y.*

2. *Colorantes de rodamina.* Las rodaminas son semejantes a las pironinas, salvo que poseen otro anillo bencénico con una función carboxílica en posición orto:

BIBLIOTECA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
VALPARAISO

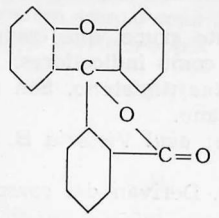


Rodamina *B*

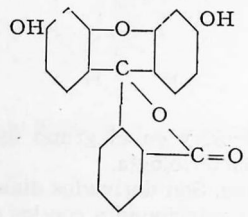
Como contienen dos grupos amino y sólo un carboxilo, su carácter es básico.

El grupo comprende: *azul rápido ácido R, rodamina B.*

3. *Colorantes de fluorano.* Son derivados del compuesto fluorano, que no es colorante:

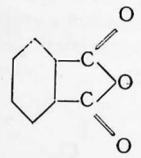


A veces se consideran derivados de la fluoresceína, sal de dihidroxifluorano:

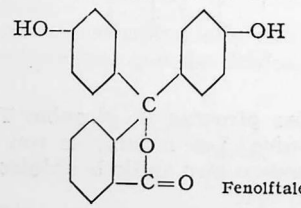


El grupo comprende: *eosina B, eosina Y, eritrosina azulada, eritrosina amarillenta, etileosina, mercurocromo 220, metileosina, floxina B, rosa de Bengala.*

4. *Colorantes de fenolftaleína y sulfonftaleína.* Una ftaleína se compone de anhídrido ftálico,

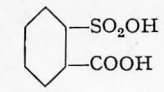


y un fenol o derivado fenólico. La fenolftaleína es un compuesto de ácido ftálico con dos moléculas de fenol:

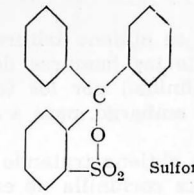


Fenolftaleína

Una sulfonftaleína es un compuesto de ácido ortosulfonbenzoico:



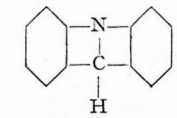
con un fenol o derivado fenólico:



Sulfonftaleína

El grupo comprende: *azul de bromoclorofenol, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, azul de bromofenol, rojo de bromofenol, azul de bromotimol, verde de clorocresol, rojo de clorofenol, cresolftaleína, rojo de cresol, púrpura de metacresol, fenolftaleína, rojo de fenol, azul de timol.*

5. *Colorantes de acridina.* Son derivados de la acridina:

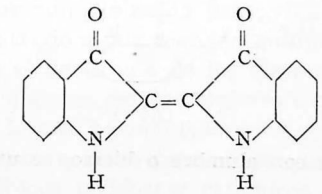


compuesto muy afín al xanteno. Los colorantes de este grupo se emplean sobre todo como desinfectantes contra bacterias y protozoos, más bien que para teñir.

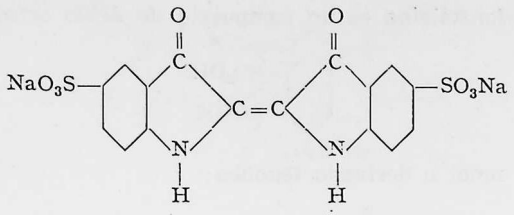
El grupo comprende: *acriflavina, atabrina, acriflavina neutra, fosfina, rivanol.*

VII. *Tintes o colorantes naturales.* Predominaron en los primeros tiempos de la biología, pero han sido ampliamente substituídos por los colorantes sintéticos. El grupo de tintes naturales en uso todavía comprende los no sintetizados hasta ahora; sólo unos pocos tienen importancia en bacteriología.

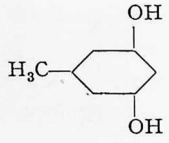
1. *Índigo.* Varias especies de plantas del género *Indigofera* contienen un glucósido, el indicán, que por fermentación produce el colorante índigo:



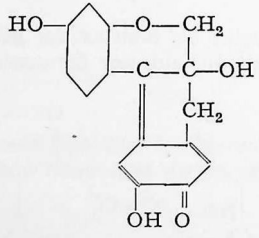
2. *Carmín de índigo.* Es la sal sódica del ácido indigodisulfónico; colorante azul, de propiedades ácidas:



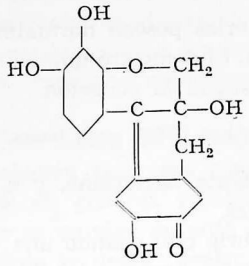
3. *Cochinilla.* Este principio se obtiene triturando y extractando con agua los cuerpos secos de las hembras del insecto *Coccus cacti.* La cochinilla no tiene afinidad por los tejidos, y empleada sola posee limitado valor; sin embargo, pasa a ser un tinte útil cuando se transforma en carmín.
4. *Carmín.* Este colorante se obtiene tratando cochinilla con alumbre u otras sales metálicas. La cochinilla no es un tinte, pero convertida en carmín, es muy útil para teñir núcleos. No se conoce la fórmula exacta del carmín.
5. *Orceína.* Se obtiene de los líquenes *Lecanora tinctoria* y *Rocella tinctoria.* Las plantas contienen ciertos compuestos fenólicos cristalinos incoloros, que toman color azul o violeta por adición de amoníaco y oxígeno (aire). Uno de tales compuestos incoloros es la orcina:



que, tratada con amoníaco y agua, se convierte en orceína, cuerpo de color violeta, colorante algo ácido, cuya fórmula se desconoce.
6. *Tornasol.* Se obtiene de los mismos líquenes que la orceína, tratándolos primero con cal y carbonato sódico, y luego con amoníaco y aire. Se supone que el tornasol contiene más de un compuesto coloreado, pero el principio primario de este carácter se conoce por azolitmina. No se sabe la fórmula exacta.
7. *Brasilina.* Se obtiene de la corteza del palo brasil. Es incolora, pero expuesta al aire se oxida y transforma en brasileína, colorante rojo:



En combinación con alumbre o hierro, se utiliza como tinte para núcleos.
8. *Hematoxilina.* Se obtiene, por extracción, del palo campeche, leguminosa de Sudamérica y otros países tropicales. El leño se extracta con agua, y se evapora a sequedad; el residuo se extracta con éter, y el extracto etéreo se evapora hasta dejarlo seco. Este residuo se disuelve en agua, se filtra, y se deja cristalizar del extracto acuoso. Como la brasilina, la hematoxilina no es un colorante, pero en el aire se oxida y pasa a hemateína, de composición semejante a la brasilina, con la fórmula presunta que sigue:



TEORÍAS DE LA TINCIÓN

Muchas teorías se han propuesto para explicar el fenómeno de la tinción, y todas ellas pretenden explicar el proceso apoyándose en bases físicas y químicas.

Teoría física. Puede decirse que un fenómeno o proceso físico es una reacción entre dos substancias sin formación de un nuevo compuesto. Los partidarios de la teoría física exponen que todas las reacciones de tinción pueden explicarse como fenómenos de capilaridad, osmosis, adsorción y absorción. No hay unanimidad respecto al aumento de peso que correspondería a cada agente, aunque todos convienen en que éstos participan en el proceso de tinción.

Teoría química. En una reacción química se forma un compuesto nuevo, con propiedades físicas y químicas distintas de las que muestran las substancias originales reaccionantes. Además, resulta imposible reconstituir estas últimas mediante simples solventes. Al teñir las bacterias, nada indica que el colorante cambie químicamente y forme una nueva substancia, ya que, por lo general, es posible recuperar todo o casi todo el colorante de las células bacterianas por medio de una inmersión suficientemente larga en agua, alcohol u otros solventes. El protoplasma de las bacterias nunca elimina por completo el colorante de la solución, lo cual es contrario a una reacción química, que tiende siempre a continuar hasta que se agota uno de los componentes de la reacción.

Está probado que algunas partes celulares tienen reacción ácida, y otras la dan alcalina, lo que ha inducido a los químicos a explicar los fenómenos de tinción sobre bases puramente químicas. Los colorantes de alquitrán son aniónicos (ácidos) o catiónicos (básicos); esto es, la parte colorante de la molécula es el ion negativo o el positivo. Los partidarios de esta teoría mantienen que los componentes ácidos de la

célula (núcleos, cromatina) se unen o reaccionan con los colorantes básicos, y que, recíprocamente, las porciones de reacción alcalina (citoplasma) reaccionan con los colorantes ácidos. Sin embargo, el proceso no es tan simple como parece, y probablemente no explica por completo el fenómeno.

Se sabe que las bacterias poseen normalmente una carga eléctrica negativa. McCalla (1940 *a, b*) demostró que las bacterias atraen los iones cargados positivamente, según la ecuación

$$(n \text{ bases}^{+}) + (B^{n-}) \rightleftharpoons (n \text{ bases}^{+})\ (B^{n-})$$

donde *B* representa la célula bacteriana, y *n*, un número desconocido de cargas iónicas negativas.

McCalla (1941) descubrió que cuando una bacteria con carga negativa se trata con magnesio, la base es absorbida por la célula hasta que se origina un sistema neutro. Dicho de otro modo, los iones magnesio cargados positivamente son atraídos por las valencias negativas de la célula bacteriana. Si a una bacteria saturada de magnesio se añade un colorante, por ejemplo, azul de metileno, éste substituye al metal, de acuerdo con la ecuación

$$(^1/_2 n\text{Mg}^{++})\ (B^{n-}) + nS^{+}\text{Cl}^{-} \rightleftharpoons (nS^{+}B^{n-}) + {}^1/_2 n\text{MgCl}_2$$

en donde *S* representa el colorante (ion azul de metileno). El magnesio es desalojado por el azul de metileno en proporciones estequiométricas.

En otra comunicación posterior, McCalla y Clark (1941) exponen que los colorantes básicos son adsorbidos a valores pH por encima del punto isoeléctrico, y los colorantes ácidos, a valores pH por debajo de ese punto. En condiciones normales, las bacterias poseen cargas negativas, y por ello atraen partículas cargadas positivamente, según ya hemos visto; y como las bacterias contenidas en una solución de pH inferior al punto isoeléctrico se cargan en sentido positivo, se vuelven capaces de atraer colorantes de carga negativa, como la fucsina ácida.

Según McCalla, la reacción de los colorantes con las bacterias es un proceso de intercambio por adsorción que alcanza proporciones estequiométricas. Por el lado básico del punto isoeléctrico, los colorantes básicos actúan como cationes que reemplazan iones con carga análoga en el sistema bacteriano; por el lado ácido, los colorantes ácidos se conducen como aniones que desalojan de igual modo iones con carga similar de tal sistema. Los tintes parecen reaccionar con las células bacterianas a semejanza de los cationes y aniones inorgánicos.

En resumen, puede decirse que actualmente parece contarse con elementos de juicio suficientes para señalar que la tinción no es un proceso completamente físico ni químico, sino que participa de ambos aspectos.

Más información se encontrará en Harris (1951).

SOLUCIONES COLORANTES

Los preparados que se emplean para teñir bacterias son soluciones acuosas. En muchos casos se disuelve primero el colorante en alcohol, y se preparan las soluciones tintóreas diluyendo las alcohólicas en agua destilada. Puesto que el alcohol extrae las materias colorantes de las células teñidas, no deben emplearse soluciones alcohólicas puras para teñir.

Las soluciones colorantes suelen ser de baja concentración, rara vez superior al 1 %. Una solución colorante muy diluída que actúe con relativa persistencia dará, en general, resultados mucho mejores que otra más concentrada que se emplee durante menos tiempo. Éste es el método que se sigue cuando se desea revelar la estructura interna de las bacterias; sin embargo, en la práctica se usan las soluciones colorantes más concentradas, para economizar tiempo. Cuando éste no sea factor de importancia, deben emplearse las soluciones más diluidas.

Mordiente. Puede definirse como mordiente cualquier substancia que forme compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias.

Los mordientes se aplican, por lo general, primero a los frotis o extensiones bacterianos, y a continuación se añade la solución de colorante. En algunos casos se agrega el mordiente a la solución tintórea, y ambos se aplican a la vez.

Entre los compuestos empleados como mordientes se cuentan el sulfato de anilina, el oxalato amónico, el fenol, el ácido tánico, y sales de aluminio, hierro, estaño, zinc, cobre y cromo.

Ejemplos de procedimientos de tinción que emplean mordientes son la coloración de Gram, la de gérmenes ácidorresistentes, y diversas para flagelos.

Colorantes simples. En los diversos métodos bacteriológicos se emplean muchas clases diferentes de soluciones para teñir; algunas son de uso general, y otras se destinan a fines específicos. Una solución colorante simple es aquella que contiene un colorante único disuelto en el disolvente; se aplica a las bacterias en una sola operación. Las soluciones simples que probablemente se emplean más para tinciones usuales son las diluídas de fucsina fenicada, violeta cristal y azul de metileno.

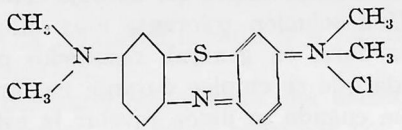
Colorante de fucsina fenicada. Este colorante se prepara disolviendo 0,3 % de fucsina básica (del grupo de triaminotrifenilmetano) en una solución de fenol al 5 %. Para usarlo como colorante simple, se recomienda generalmente diluir la solución unas diez veces con agua destilada.

Véase en la página 59 la composición de varias fucsinas comerciales.

Colorante de violeta cristal. El violeta cristal es también un miembro del grupo de triaminotrifenilmetano. Químicamente es hexametil-*p*-rosanilina (pág. 53).

Se conoce también por los nombres de violeta de metilo 10 B, violeta de genciana, violeta hexametilo, etc. Produce el matiz más intenso de las *p*-rosanilinas, y, entre todos los compuestos violeta, está considerado como el colorante simple más satisfactorio para usos generales.

Colorante de azul de metileno. El azul de metileno es tetrametiltionina, colorante básico que tiene la siguiente fórmula:



El azul de metileno del comercio suele ser una sal doble de colorante y cloruro de zinc; como este metal es tóxico, no debe usarse tal producto para fines medicinales.

Es acaso el colorante más usado en trabajos biológicos. Por su condición fuertemente básica, tiñe con mucha intensidad núcleos y gránulos de ácido nucleico. Es muy útil para apreciar con rapidez la población bacteriana de la leche (pág. 589). Para el diagnóstico de la difteria, se prefiere teñir los frotis con este colorante. En combinación con eosina, se emplea como colorante de extensiones de sangre. Incorporado con eosina a una base de agar lactosa, sirve para distinguir *Escherichia coli* de los también típicos *Aerobacter aerogenes* (pág. 564). Éstas son tan sólo unas pocas de las numerosas aplicaciones del azul de metileno en bacteriología.

Colorantes diferenciales. Los colorantes diferenciales se componen de más de una substancia tintórea. En algunas técnicas de coloración, los colorantes se aplican por separado, y juntos en otras, formando parte de una sola solución. Las dos coloraciones diferenciales más importantes que se emplean en bacteriología son la de Gram y la de gérmenes ácidorresistentes.

Coloración de Gram. Es éste tal vez el método de coloración diferencial más importante que emplea el bacteriólogo.

Christian Gram (1848) descubrió que, al teñir cortes histológicos con aceite de anilina y violeta de genciana por el método de Ehrlich (1882) y tratarlos luego con una solución acuosa de yodo, era fácil eliminar con alcohol el colorante de los cortes de tejidos, pero no el de las bacterias contenidas en ellos. Gram buscaba un nuevo método para teñir bacterias en los tejidos y descubrió una nueva coloración diferencial.

En este método de tinción, la extensión bacteriana se cubre con solución de uno de los colorantes de violeta de metilo, que se deja actuar

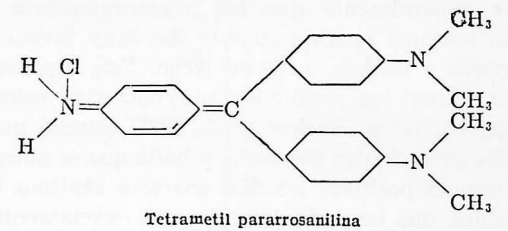
durante un lapso determinado. Se escurre luego el exceso de violeta de metilo y se añade una solución de yodo, que se deja durante el mismo tiempo que la anterior; después se lava el portaobjetos con alcohol hasta que éste no arrastre más colorante. Sigue a tal tratamiento una coloración de contraste, con safranina, fucsina fenicada diluída, pardo Bismarck o pironina *B*.

Algunos microbios retienen así el colorante violeta, y otros se decoloran pronto con el alcohol y fijan el segundo colorante. Los primeros, esto es, los que fijan el violeta, se califican de grampositivos, y los que pierden la primera coloración y retienen la segunda, de gramnegativos. Basándonos, pues, en la reacción de Gram podemos clasificar estos microorganismos en uno de los dos grupos.

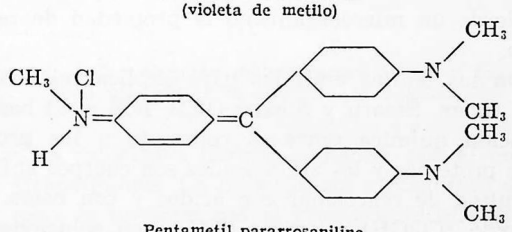
Los colorantes de *p*-rosanilina son los que mejores resultados dan en la coloración de Gram. Los representantes más usados de este grupo son violeta de metilo y violeta cristal o de genciana.

En realidad, violeta de metilo es el nombre atribuído al compuesto tetrametil-*p*-rosanilina. En el comercio suele darse este nombre a varias mezclas de tetra, penta y hexametil-*p*-rosanilinas.

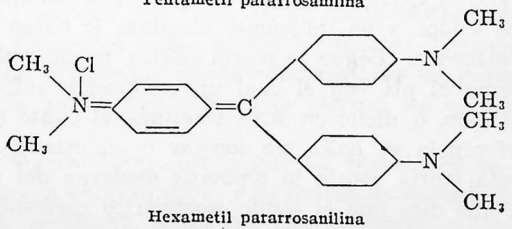
Sus fórmulas estructurales son las siguientes:



Tetrametil pararrosanilina
(violeta de metilo)



Pentametil pararrosanilina



Hexametil pararrosanilina
(violeta cristal)

El matiz de color de la *p*-rosanilina se intensifica al aumentar el número de grupos metilo en la molécula; por consiguiente, de los tres cuerpos, el de tono más obscuro es la hexametil-*p*-rosanilina (violeta cristal), y el de tinte más ligero, la tetrametil-*p*-rosanilina. Los nombres violeta de metilo 3*R*, 2*R*, *R*, *B*, 2*B*, 3*B*, etc., se refieren al número de grupos metilo contenidos. La letra *R* indica matices rojos, y la letra *B*, tonos azules. La hexametil-*p*-rosanilina (violeta cristal) contiene seis grupos metilo, y se considera como el colorante primario mejor para teñir por el método de Gram.

La facultad de las células para tomar la coloración de Gram no es propia de toda substancia viviente, sino que se limita casi en absoluto a fermentos y bacterias. Así vemos que las células de plantas y animales superiores no conservan la primera coloración; los mohos se tiñen con cierta irregularidad; los gránulos de micelios propenden a retener el colorante. La reacción de Gram no es infalible ni constante; puede variar con el tiempo de cultivo y el pH del medio, y quizá por otras causas. Bartholomew y Mittwer (1952*a*) comprobaron que la luz ultravioleta de 2537 Å hacía gramnegativos los microorganismos grampositivos; esto parecía suceder también con gérmenes grampositivos muertos.

Se supone generalmente que los microorganismos grampositivos reaccionan con máxima energía cuando son muy jóvenes, y tienden a volverse negativos a medida que envejecen. Esta hipótesis parece confirmarse al examinar los resultados con bacterias esféricas, pero no siempre con las bacilares. Hucker (1923, 1927) estudió un gran número de estas últimas, procedentes del suelo, y halló que se obtenía un número mayor de reacciones positivas los días cuarto y séptimo. Los resultados eran tan variables, que no pudo determinarse exactamente en qué plazo adquiere o pierde un microorganismo la propiedad de retener la coloración violeta.

Varias son las teorías emitidas para explicar el mecanismo de la coloración de Gram. Stearn y Stearn (1923, 1924 *a*, *b*) basan la suya en una combinación química entre el colorante y las proteínas de las bacterias. Las proteínas y los aminoácidos son cuerpos anfóteros, esto es, tienen la facultad de reaccionar con ácidos y con bases, gracias a sus grupos carboxilo (COOH) y amino (NH_2); en soluciones ácidas reaccionan con los ácidos, y en soluciones alcalinas lo hacen con las bases.

Punto isoeléctrico. Según la teoría clásica, puede definirse el punto isoeléctrico como el pH con el cual un compuesto anfótero ofrece la mínima disociación, o, dicho en otros términos, el punto (pH) en que el cuerpo de referencia se halla sin ionizar o en estado molecular. En oposición a esta teoría, existe la hipótesis moderna del «ion ambiguo» (*zwitter ion*), que dice que el punto isoeléctrico corresponde al pH en que los grupos ácidos y básicos del cuerpo anfótero se hallan totalmente

disociados o ionizados. En el lado ácido del punto isoeléctrico, el compuesto reacciona como una base, y en el lado básico procede como si fuera un ácido.

Los colorantes ácidos y básicos se combinan también con las proteínas; los de carácter básico reaccionan en la zona básica de los puntos

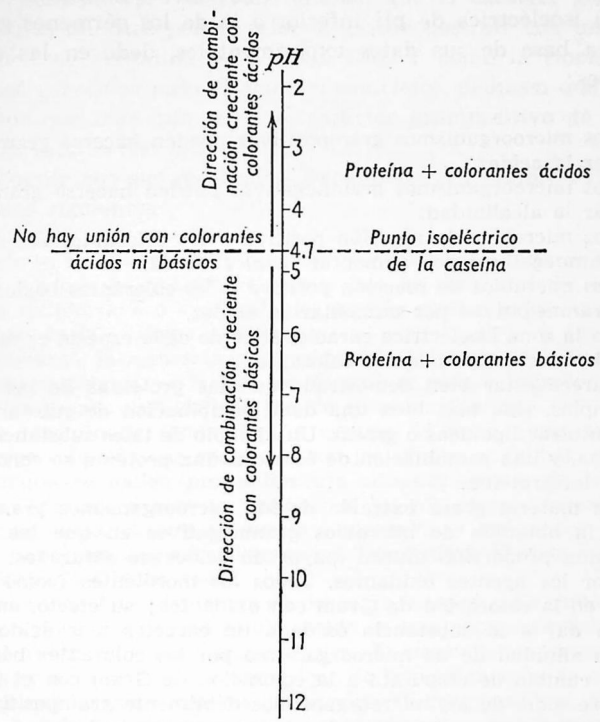


Fig. 24. — Combinación de colorantes ácidos y básicos con una sustancia anfótera, la caseína.

isoeléctricos, y los colorantes básicos lo hacen, por el contrario, en el lado ácido de dichos puntos. La importancia y magnitud de la combinación, en cada caso, es proporcional al grado de alcalinidad o acidez de las soluciones; así, las proteínas, en el punto isoeléctrico, no se combinan con los colorantes ácidos ni con los básicos. Tomando como ejemplo de proteína la caseína, puede representarse en esquema, como en la figura 24, la acción que sobre ella ejercen los colorantes ácidos y básicos.

Stearn y Stearn comprobaron que las reacciones de tinción de las bacterias obedecen en gran parte a su contenido proteínico; estos microorganismos se conducen como cuerpos anfóteros, al combinarse con

colorantes ácidos en soluciones ácidas y con los básicos en medio alcalino. La combinación con uno u otro colorante no se produce en el «punto isoeléctrico», pues como los microbios contienen más de una proteína, ese punto no tiene un valor preciso y definido, sino que constituye más bien una gama o escala que comprende dos o tres unidades de pH. Según Stearn y Stearn, los gérmenes grampositivos tienen una escala isoeléctrica de pH inferior a la de los gérmenes gramnegativos; y, a base de sus datos experimentales, deducen las siguientes conclusiones:

1.ª Los microorganismos grampositivos pueden hacerse gramnegativos al aumentar la acidez.

2.ª Los microorganismos gramnegativos pueden hacerse grampositivos al aumentar la alcalinidad.

3.ª Los microbios de reacción positiva a los colorantes ácidos pueden hacerse gramnegativos por aumentar la alcalinidad.

4.ª Los microbios de reacción positiva a los colorantes básicos pueden volverse gramnegativos por aumentar la acidez.

5.ª En la zona isoeléctrica característica de cada especie es muy escasa la tendencia a retener cualquier colorante.

6.ª Parece estar bien demostrado que las proteínas de las bacterias no son simples, sino más bien una débil combinación de substancias proteínicas con otras lipoideas o grasas. Un ejemplo de tales substancias grasas es la lecitina, y una combinación de ésta con una proteína se conoce por el nombre de leciproteína.

7.ª La materia grasa extraída de los microorganismos grampositivos difiere de la obtenida de microbios gramnegativos en que las primeras contienen una proporción mucho mayor de ácidos no saturados, con gran afinidad por los agentes oxidantes. Todos los mordientes (como el yodo) empleados en la coloración de Gram son oxidantes; su efecto, en general, consiste en dar a la substancia oxidada un carácter más ácido, lo cual aumenta la afinidad de un microorganismo por los colorantes básicos.

8.ª El cambio de respuesta a la coloración de Gram con el tiempo es propio, sobre todo, de los microorganismos débilmente grampositivos cultivados en medios que contengan substancias capaces de fermentar, y cuya reacción se vuelve ácida en el curso del desarrollo.

Véase más información en Harden y Harris (1953).

Otra explicación de la reacción de Gram puede ser la posible existencia de una capa exterior que rodea un núcleo gramnegativo.

Henry y Stacey (1943) tratan microorganismos grampositivos muertos por el calor con una solución de bilis al 2 %, con la que consiguen eliminar por disolución una capa superficial exterior. Los gérmenes grampositivos así tratados se convierten en gramnegativos. La substancia extraída se compone de polisacáridos, proteína y la sal magnésica del ácido ribonucleico. Este extracto se puede «reaplicar» sobre los «esqueletos» gramnegativos, restableciendo su reacción de Gram, siempre que el esqueleto se mantenga en un estado de reducción conveniente

por la presencia de formol. Ni el esqueleto ni el material extraído son grampositivos, excepto en combinación, y no es posible recombinarlos, a menos de reducir el primero mediante adición de formol.

Bartholomew y Umbreit (1944) emplean una solución al 2 % de colato sódico, o de sales biliares, en lugar de bilis integral, y obtienen resultados semejantes. Observan también que el carácter grampositivo de las células muertas por el calor se puede destruir con una solución de ribonucleasa cristalina pura (pág. 320). Y como la ribonucleasa es una enzima específica para el ácido ribonucleico, deducen que este ácido es el factor que más influye en el carácter grampositivo de los microorganismos estudiados.

De acuerdo con sus resultados, Bartholomew y Umbreit llegan a las conclusiones siguientes:

Cuando se elimina el ácido nucleico mediante sales biliares no se mantendrá ya unido a la proteína celular si ésta ha sido oxidada por el aire; los grupos sulfhidrilo son autooxidables cuando quedan expuestos al aire en la superficie de la proteína.

Sin embargo, la recombinación es posible, a pesar de la exposición al aire, si los «esqueletos» se tratan con formol, el cual, a baja concentración, se une a los grupos sulfhidrilo e impide su autooxidación.

En la reacción de Gram resulta esencial el yodo, pues se trata del único cuerpo conocido que reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, aunque se hallen profundamente situados dentro de la molécula proteínica. Además, si bien se desconocen las relaciones (de existir éstas) entre hidroquinona, cloruro estannoso o pirogalol, y los grupos sulfhidrilo, el cloruro mercúrico, que parcialmente puede substituir al yodo, no reacciona con el sulfhidrilo (Fildes, 1940).

Considerando todos los datos en conjunto, apenas cabe duda de que el carácter grampositivo de una célula reside en una capa superficial de substancia que rodea un núcleo gramnegativo. El producto importante de esta capa exterior es ribonucleato magnésico; de la combinación de esta sal con la proteína celular dependen las características grampositivas, y el violeta cristal y el yodo reaccionan químicamente con esta combinación.

Lamanna y Mallette (1950) aportaron pruebas de que el substrato celular causante de la reacción de Gram está alojado parte en las paredes y parte en el interior de las células vegetativas. Tratándose de esporas de bacterias y levaduras, la pared celular está libre de colorante de Gram, aunque el interior de aquéllas tome la coloración.

Baker y Bloom han descubierto (1948) que era posible convertir en grampositivas *Escherichia coli*, normalmente gramnegativas, añadiendo un ácido desoxirribonucleico muy viscoso. Esa grampositividad desaparece lavando las células en observación con agua destilada, pero no con solución de cloruro sódico al 0,85 %. El ácido desoxirribonucleico es soluble en agua destilada, y no en solución salina.

En conclusión, cabe decir que tanto el ácido ribonucleico como el ácido desoxirribonucleico pueden hacer grampositivas bacterias gram-

negativas, y que ambos tipos se encuentran a veces en la cubierta de bacterias grampositivas (pág. 690). En cambio, ninguno de los dos ácidos se ha encontrado en la envoltura exterior de bacterias gramnegativas.

En la tabla 3 se exponen algunas características de las bacterias grampositivas y gramnegativas.

TABLA 3

BACTERIAS GRAMPOSITIVAS	BACTERIAS GRAMNEGATIVAS
Contienen ribonucleato magnésico.	No contienen ribonucleato magnésico.
Son muy sensibles a los colorantes de trifenilmetano.	Son menos sensibles a los colorantes de trifenilmetano.
Son sensibles a la penicilina.	Son sensibles a la estreptomicina.
Resisten a los álcalis; la KOH al 1 % no las disuelve.	Sensibles a los álcalis; la KOH al 1 % las disuelve.
Zona isoeléctrica pH 2,5-4.	Zona isoeléctrica, pH 4,5-5,5.
Generalmente micrococos o bacilos esporógenos (menos *Lactobacillus, Corynebacterium*).	Generalmente bacilos no esporógenos (menos *Neisseria*, que son micrococos).
Pueden ser acidorresistentes.	Probablemente ninguna resiste a los ácidos.

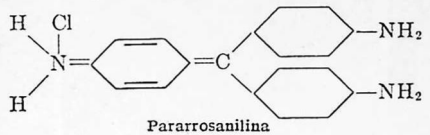
Para más información, véanse Bartholomew y Mittwer (1951, 1952b), Fischer y Larose (1952), Hoffman (1951), Jones, Stacey y Webb (1949), Stacey y Webb (1948), y Welsch (1948).

Coloración acidorresistente. La inmensa mayoría de las bacterias se tiñen sin dificultad con los colorantes biológicos usuales, pero existen algunas excepciones dignas de mención. Se dice que algunas bacterias están rodeadas de una cubierta constituida por substancias céreas y grasas; en estos microbios no penetran los colorantes con facilidad, mas una vez teñidos retienen el color, incluso al lavarlos con alcohol acidulado. Por no decolorarse con este alcohol, reciben tales microorganismos el calificativo de «acidorresistentes». Los dos miembros mejor conocidos del grupo son los gérmenes de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y de la lepra (*M. leprae*).

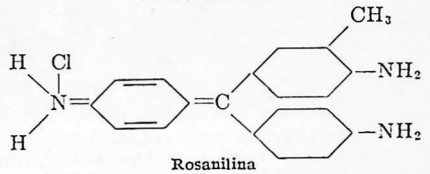
El primero que dió a conocer el método para la coloración del microbio acidorresistente de la tuberculosis fue Ehrlich (1882). Preparó una solución saturada de aceite de anilina en agua y le añadió un volumen conocido de solución alcohólica de violeta de metilo; con el líquido resultante tiñó frotis y los dejó en reposo para que el colorante penetrase en la cubierta cérea de los bacilos tuberculosos. Ehrlich observó que éstos no se decoloraban al tratarlos con soluciones concentradas de ácido nítrico, pero sí lo hacían los tejidos y otras bacterias. Como coloración de contraste frente a la inicial empleó vesuvina; así, los microorganismos acidorresistentes aparecían de color púrpura, y pardo el resto

del material contenido en el portaobjetos. Más tarde, Ziehl (1882) mejoró la estabilidad de la coloración substituyendo el aceite de anilina por fenol; Neelsen (1883) empleó fucsina fenicada, en lugar de violeta de metilo en aceite de anilina, y decoloró las preparaciones con ácido sulfúrico en vez de nítrico. Esta modificación, con ligeras variaciones, es lo que hoy se conoce por método de Ziehl-Neelsen, pero, en lo esencial, es el mismo procedimiento recomendado por Ehrlich.

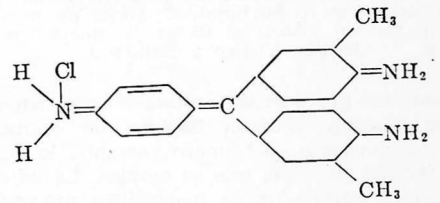
La fucsina básica del comercio es, por lo general, una mezcla de *p*-rosanilina, rosanilina y magenta II. Se puede adquirir también otro compuesto, la neofucsina pura, utilizada con frecuencia para teñir gérmenes acidorresistentes. Las fórmulas de estos compuestos son:



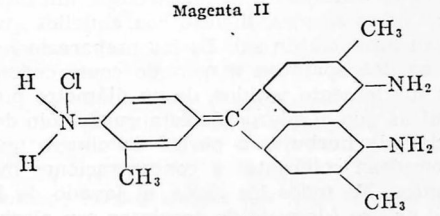
Pararrosanilina



Rosanilina



Magenta II



Neofucsina

Cuantos más grupos metilo contiene la molécula, mayor es la intensidad del matiz rojo. De los productos citados, la neofucsina (tres grupos metilo) es la de matiz más intenso, y la *p*-rosanilina (sin grupos metilo), la de matiz más débil. Al teñir microorganismos acidorresistentes, cuanto más intenso sea el tono del colorante empleado, mejor será el grado de diferenciación o contraste que se consiga.

Yegian y Baisden (1942) han logrado teñir el bacilo tuberculoso en forma compacta o perlada variando la técnica de la coloración (fig. 25). De ellos citamos el siguiente párrafo:

La presencia de burbujas o perlas en los bacilos tuberculosos teñidos según la técnica de Ziehl-Neelsen proviene, no sólo de la presencia de estructuras en la célula bacteriana, sino también, en gran manera, de las condiciones en que se ha llevado a cabo la reacción de coloración. Las prepara-

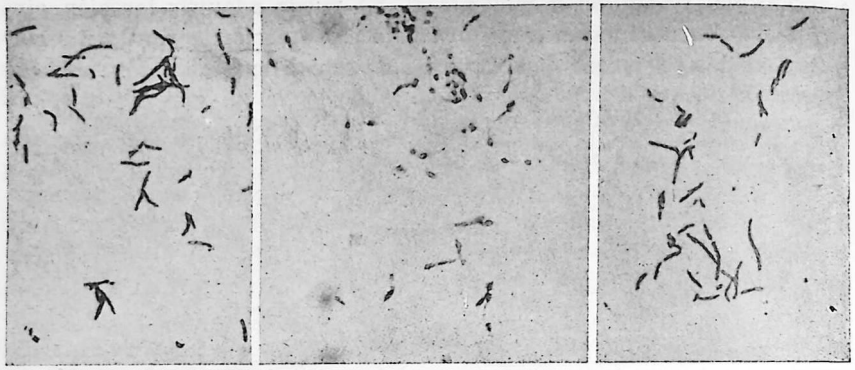


Fig. 25. — *A*, frotis de *Mycobacterium tuberculosis* teñido con fucsina fenicada. Solución colorante sin electrólito; bacilos teñidos uniformemente. *B*. frotis de *M. tuberculosis* teñido con fucsina fenicada, pero agregando electrólito; bacilos teñidos con numerosas perlas o burbujas. *C*, frotis de bacilos perlados como en *B* y lavados con alcohol etílico al 95 %; la tinción se vuelve compacta. (Según Yegian y Baisden.)

ciones hechas con bacilos procedentes de una misma suspensión, teñidas en iguales condiciones, pueden contener bacilos con coloración uniforme y compacta, o bien con burbujas en número variable, lo cual depende de la elaboración de la fucsina fenicada que se emplee. La adición a la solución colorante de pequeñas cantidades de electrólitos aumenta el número de burbujas con todos los colorantes, incluso con aquellos que no dan coloraciones irregulares en ausencia de sal. En las preparaciones teñidas en presencia de sal, los bacilos aparecen a menudo como cadenas o rosarios de cuerpos purpúreos fuertemente teñidos, de un diámetro mayor que el de la propia célula, mientras que el cuerpo de ésta queda sólo de un color rosado pálido. La formación de burbujas o perlas disminuye mucho, incluso habiendo sal, si se emplean colorantes a concentraciones más bajas que las usuales en la práctica. En todos los casos, el lavado de las preparaciones teñidas con alcohol neutro (después de decolorar con alcohol ácido) elimina prácticamente todas las burbujas y deja la mayoría de los bacilos con un tinte rosado uniforme.

En una comunicación posterior, Yegian y Budd (1943) informan que la composición del colorante influye mucho en el aspecto del bacilo tuberculoso (fig. 26). Frotis tratados con acetato de rosanilina o *p*-rosanilina muestran de un 50 a un 100 % de microorganismos perlados. Por el contrario, los frotis teñidos con cloruro de rosanilina o *p*-rosanilina ofre-

cen, sin excepción, formas teñidas por igual. Para obtener los mejores resultados, estos autores recomiendan emplear los cloruros en el método de Ziehl-Neelsen.

En opinión de Lamanna (1946), las perlas o burbujas provenían de

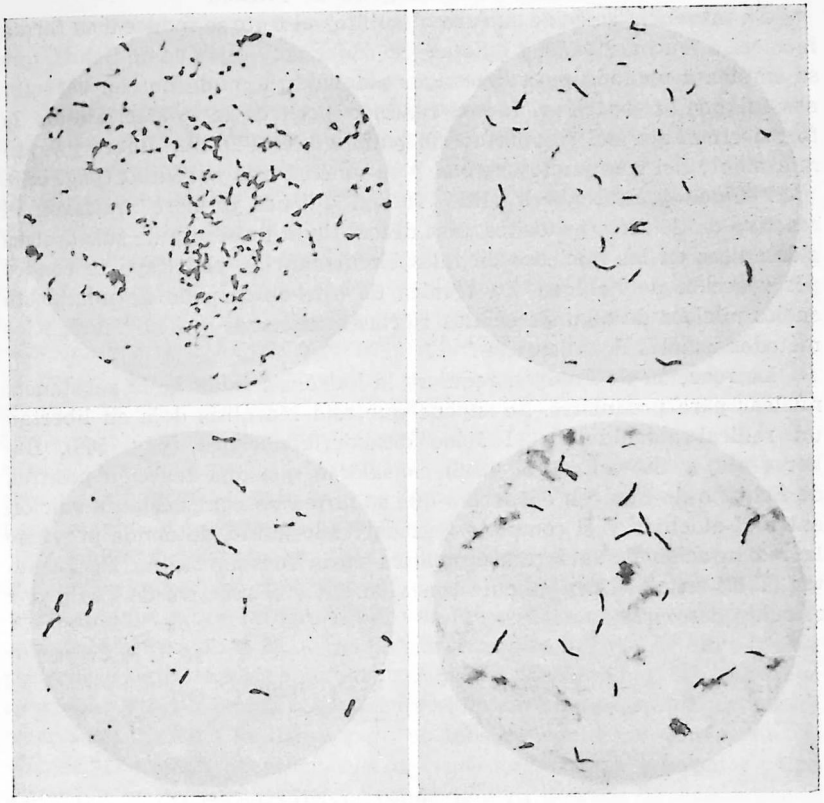


Fig. 26. — *Izquierda, arriba:* Cultivo virulento de *Mycobacterium tuberculosis*, teñido con acetato de rosanilina; bacilos perlados. *Derecha, arriba:* Cultivo virulento de *M. tuberculosis*, teñido con cloruro de rosanilina; coloración compacta. *Izquierda, abajo: M. tuberculosis* en esputo teñido con acetato de rosanilina; bacilos perlados. *Derecha abajo: M. tuberculosis* en esputo teñido con cloruro de rosanilina; bacilos teñidos por igual. (Según Yegian y Budd.)

la separación de fenol y colorante en una fase líquida, al penetrar agua en la célula. Esta explicación presupone que el uso de fucsina fenicada, en la que el fenol se encuentra en grado de saturación respecto al agua, permite que el fenol se acumule en la célula bacteriana en un estado similar. La presencia de lípidos celulares insolubles en agua, y en los cuales es soluble el fenol, o de sales insolubles en ácido fénico, acentuarían la merma de solubilidad del fenol en agua. La base de la acido-

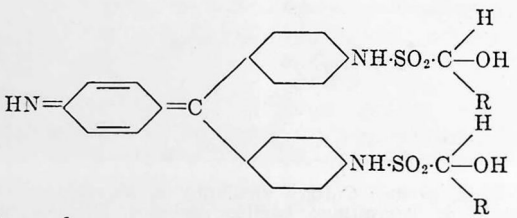
rresistencia está en que el fenol y el colorante se disuelven más en los componentes celulares que en el decolorante.

Coloración de Feulgen. La fucsina básica es un enérgico colorante nuclear y lleva usándose bastante tiempo, en su forma cromática, en numerosos procedimientos bacteriológicos de tinción.

En presencia de ácido sulfuroso (sulfito), el tinte se reduce a su forma incolora o leucoderivado, y entonces se conoce por reactivo de Schiff, que se emplea a menudo para investigar aldehidos, aunque no con carácter absolutamente específico. Indica reacción positiva la reaparición de la forma cromática del colorante; sin embargo, esta forma difiere ya químicamente del compuesto original y su tono es más purpúreo (pág. 566).

Feulgen y Rossenbeck (1924) fueron quienes primero aplicaron el reactivo de Schiff a histocitos para descubrir la presencia de substancias aldehídicas en los núcleos; en tales circunstancias, el ensayo se conoce por reacción de Feulgen. La técnica de este autor pone de manifiesto en los núcleos de algunas células ciertas estructuras que no revelan los métodos usuales de coloración.

La reacción de Feulgen requiere la hidrólisis ácida de la substancia nuclear para producirse. Se supone que esta hidrólisis deja en libertad un radical aldehido en el ácido desoxirribonucleico (pág. 566). Baker (1942) y Stowell (1945, 1946) consideran que una reacción positiva de Schiff o de Feulgen obedece a que se forma un compuesto de adición entre el aldehido y el complejo leucoderivado-sulfito, de donde proviene la restauración de la forma cromática de la fucsina básica. De Lamater (1948) señalaba la siguiente conexión entre el reactivo de Feulgen y el ácido desoxirribonucleico:



donde R designa el componente ácido nucleico.

Se han recomendado diversas modificaciones de la técnica original de Feulgen, entre ellas la siguiente:

1. Se prepara una extensión y se fijan las células en un fijador apropiado, como la solución de Schaudinn (cloruro mercúrico disuelto en una solución del alcohol en agua destilada).
2. Se hidrolizan las células en ácido clorhídrico normal, durante cinco minutos, a temperatura ordinaria, cinco minutos a 60° C, y cinco minutos más a temperatura ordinaria.
3. Se lavan las células en agua destilada.
4. Se someten las células a la acción de una solución de formol al 2 %, durante cuatro minutos.

5. Se lavan las células en agua destilada.
6. Se aplica fucsina básica al 0,5 %, decolorada con 0,5 g de sulfito sódico, más 10 ml de ácido clorhídrico normal.
7. Se lavan en agua destilada y se examinan.

La substancia nuclear se tiñe de un intenso color rojo.

COLORACIÓN DE BACTERIAS

Preparación de frotis. Un frotis de bacterias se prepara tomando una porción del líquido de cultivo contenido en un tubo, con el asa de platino esterilizada, y extendiéndola sobre unos 3 cm^2 de superficie de un portaobjetos. Si se emplea un cultivo sólido, se emulsiona primero una pequeña cantidad de éste en una gota de agua destilada que previamente se habrá colocado en el centro del porta, y se extiende luego como en el caso anterior. Se seca el frotis calentando cuidadosamente el porta sobre una pequeña llama de gas, para evitar que despida humos o vapores; una vez seco, se fija pasándolo rápidamente cinco o seis veces por la porción superior de la llama en un bunsen. Esto impide que se arrastre la extensión por lavado durante el proceso de coloración. El frotis seco y fijado se cubre entonces de solución colorante y se deja reposar por un espacio determinado de tiempo, que variará según la solución empleada. Finalmente se lava el porta con agua, se seca con papel secante y se examina al microscopio.

Viabilidad de organismos fijados y teñidos. Se afirma generalmente que las bacterias, en frotis secos, fijados y teñidos, no pueden vivir mucho tiempo y que no hay peligro de infecciones con microorganismos patógenos así tratados. Thurn (1914) informó que cultivos de *Micrococcus pyogenes* var, *aureus, Salmonella typhosa, Escherichia coli, Bacillus anthracis, Vibrio comma, Corynebacterium diphteriae* y *Saccharomyces cerevisiae,* fijados a la llama, pero no teñidos, contenían aún gérmenes viables. Dieciocho preparaciones de microorganismos patógenos y no patógenos no mostraron ninguno capaz de vivir después de teñidos según la técnica de Gram; en cambio, el *B. anthracis* sobrevivió un minuto, y tres minutos el *B. mesentericus,* al tratamiento con fucsina fenicada, y ambos bacilos resistieron cinco minutos a la acción del azul de metileno. Morton (1939) ha demostrado que ciertos organismos pueden resistir el tratamiento con fucsina básica, violeta cristal de Hucker, safranina acuosa y azul de metileno.

Debe tenerse gran cuidado al manipular en el laboratorio las preparaciones teñidas, sobre todo si intervienen gérmenes patógenos, ya que el proceso de coloración no garantiza que se hayan destruído los microorganismos.

El lector hallará más detalles sobre el particular en Committee on Bacteriological Technic (1946) y Conn (1933, 1953).

REFERENCIAS

Baker, H., y W. L. Bloom: Further studies on the Gram stain, *J. Bact.*, **56**: 387, 1948.

Baker, J. R.: Some aspects of cytological technique. De «Cytology and Cell Physiology», por G. Bourne, Nueva York, Oxford University Press, 1942.

Bartholomew, J. W., y T. Mittwer: Cell structure in relation to the Gram reaction as show during lysis of *Bacillus subtilis*, *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 39, 1951.

— y —: Effect of ultraviolet irradiation on Gram positiveness, *J. Bact.*, **63**: 779, 1952*a*.

— y —: The Gram stain, *Bact. Rev.*, **16**: 1, 1952*b*.

— y W. W. Umbreit: Ribonucleic acid and the Gram stain, *J. Bact.*, **48**: 567, 1944.

Comité de Técnica Bacteriológica: «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Geneva, N. Y., Society of American Bacteriologits, 1946.

Conn, H. J.: «The History of Staining», Geneva, N. Y., Commission on Standardization of Biological Stains, 1933.

—, «Biological Stains», Geneva, N. Y., Commission on Standardization of Biological Stains, 1953.

De Lamater, E. D.: Basic fuchsin as a nuclear stain, *Stain Technol.*, **23**: 161, 1948.

Ehrlich, P.: Nota sin título, *Deut. Med. Wochschr.*, **8**: 269, 1882.

Feulgen, R., y H. Rossenbeck: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsaure vom Typus der Thymonucleinsaure und die darauf beruhende elektive Farbung vom Typus der Thymonucleinsaure und die darauf beruhende elektive Farbung vom Zellkernen in mikroskopischen Präparaten, *Z. phys. chem .*, **135**: 203, 1924.

Fildes, P.: The mechanism of the antibacterial action of mercury, *Brit. J. Exp. Path.*, **21**: 67, 1940.

Fischer, R., y P. Larose: Mechanism of Gram stain reversal, *J. Bact.*, **64**: 435, 1952.

Gram, C.: Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten, *Fortschr. Med.*, **2**: 185, 1884.

Harden, V. P., y J. O. Harris: The isoelectric point of bacterial cells, *J. Bact.*, **65**: 198, 1953.

Harris, J. O.: A study of the relationship between the surface charge and the adsorption of acid dyes by bacterial cells, *J. Bact.*, **61**: 649, 1951.

Henry, H., y M. Stacey: Histochemistry of the Gram-staining reaction for microorganisms, *Nature*, **151**: 671, 1943.

Hoffman, H.: Localization of bacterial nucleic acids, and mechanism of the Gram reaction, *Nature*, **168**: 464, 1951.

Hucker, G. J.: Methods of Gram staining. *N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 93, 1923.

—: Further studies on the methods of Gram staining, *ibíd.*, 128, 1927.

Jones, A. S., M. Stacey, y M. Webb: Studies on the autolytic systems of Gram-positive microorganisms. I. The lytic system of staphylococci, *Biochim. et Biophys. Acta*, **3**: 383, 1949.

Lamanna, C.: The nature of the acid-fast stain, *J. Bact.*, **52**: 99, 1946.

— y M. F. Mallete: The relation of the Gram stain to the cell wall and the ribonucleic acid content of the cell, *ibíd.*, **60**: 499, 1950.

McCalla, T. M.: Cation adsorption by bacteria, *J. Bact.*, **40**: 23, 1940*a*.

—: Physico-chemical behavior of soil bacteria in relation to the soil colloid, *ibíd.*, **40**: 33, 1940*b*.

—: The reaction of certain stains with bacteria, *Stain Technol.*, **16**: 27, 1941.

— and F. E. Clark: Dye adsorption by bacteria at varying H-ion concentrations, *ibíd.*, **16**: 95, 1941.

Morton, H. E.: The survival of microorganisms in fixed and stained preparations, *Am. J. Clin. Path.*, **9**: 68, 1939.

Neelsen, F.: Ein kasuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose, *Centr. Med. Wiss.*, **21**: 47, 1883.

Stacey, M., y M. Webb: Some components of the lytic system of Gram-positive microorganisms, *Nature*, **162**: 11, 1948.

Stearn, E. W., y A. E. Stearn: The mechanical behavior of dyes, especially gentian violet, in bacteriological media, *J. Bact.*, **8**: 567, 1923.

— y —: The chemical mechanism of bacterial behavior. I. Behavior toward dyes-factors controlling the Gram reaction, *ibíd.*, **9**: 463, 1924*a*; II. A new theory of the Gram reaction, *ibíd.*, **9**: 479, 1924*b*.

Stowell, R. E.: Feulgen reaction or thymonucleic acid. *Stain Technol.*, **20**: 45, 1945.

—: —: The specificity of the Feulgen reaction for thymonucleic acid, *ibíd.*, **21**: 137, 1946.

Thurn, O.: Über die Lebensfähigkeit an Objektträgern angetrockneter ungefarbter und gefarbter Bakterien, *Centr. Bakteriol.*, Abt. I. Orig., **74**: 81, 1914.

Welsch, M.: La réaction de Gram, son mécanisme, sa signification, *Rev. méd. de Liége*, **3**: 257, 1948.

Yegian, Diran, y Louis Baisden: Factors affecting the beading of the tubercle bacillus stained by the Ziehl-Neelsen technique, *J. Bact.*, **44**: 667, 1942.

— y Vera Budd: Ziehl-Neelsen technique, *Am. Rev. Tuberc.*, **48**: 1, 1943.

Ziehl, F.: Zur Färbung des Tuberkelbacillus, *Deut. med. Wochschr.*, **8**: 451, 1882.

CAPÍTULO IV

MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias pertenecen a la gran clase de microorganismos conocidos por esquizomicetos (de *schizo,* división, escisión, y *mycetes,* hongos), nombre que se aplica a los seres agrupados en esta clase por su reproducción típica mediante división transversal o binaria (pág. 5).

La clase *Esquizomicetos* se divide en cinco órdenes; uno de ellos, el de las *Eubacteriales,* comprende todas las bacterias comunes o genuinas. Los otros cuatro abarcan todos los microorganismos de características intermedias entre las de bacterias verdaderas y las de otras plantas o animales. Además, se reconocen otros dos órdenes, que incluyen los microorganismos menores clasificados con las rickettsias y los virus.

Las bacterias son típicas plantas de una sola célula, por lo general muy pequeña y a veces ultramicroscópica. Carecen del núcleo de organización definida, propio de las células de plantas y animales superiores; pero en algunos casos se comprueba la presencia de cuerpos que contienen cromatina, los cuales representan tal vez núcleos sencillos. Las células pueden ser esféricas, bacilares o espirales y presentarse en masas regulares o irregulares, e incluso en quistes. Cuando permanecen unidas entre sí, después de la división, forman a veces cadenas, y también verdaderos filamentos; los últimos pueden mostrar cierta diferenciación en células de sostén y células reproductivas móviles o fijas (conidios); algunas crecen como filamentos micélicos ramificados, de un diámetro no mayor que el de células bacterianas ordinarias, o sea de 1 μ, aproximadamente. Ciertas especies, como las genuinas bacterias purpúreas o verdes, poseen pigmentos parecidos o afines a la auténtica clorofila de las plantas superiores; estos pigmentos tienen propiedades fotosintéticas. Las bacterias pueden tener movilidad gracias a unas formaciones alargadas o flagelos. La multiplicación típica es por división celular; algunas especies de *Eubacteriales* forman endosporas; en las *Mixobacteriales* se encuentran esporocistos. Las bacterias viven libres, saprófitas o parásitas, y pueden ser patógenas para plantas o animales.

Configuración de las bacterias. Las células bacterianas presentan tres formas fundamentales: esférica, bacilar y espiral. Todas las bacterias, en condiciones normales o anormales, exhiben, en mayor o menor grado, pleomorfismo; pero una especie bacteriana suele asociarse siempre a una forma celular definida, cuando se desarrolla en medio y condiciones determinados.

Algunas bacterias de forma redonda o cocos parecen esferas perfectas; otras son ligeramente alargadas o elipsoidales. Las células esféricas que se desarrollan normalmente en grupos de dos (diplococos), de cuatro (tetradas) o en cadenas (estreptococos) tienen comúnmente algo aplanadas sus caras contiguas. La configuración de un par de estos microorganismos se compara a la de un grano de café.

Los bastoncitos o bacilos también ofrecen variaciones considerables. Se considera generalmente un bacilo como un cilindro con los extremos más o menos redondeados, y algunos son francamente elipsoidales. Los extremos del cuerpo cilíndrico pueden mostrar también notables diferencias, pues en algunas especies son marcadamente redondeados, y en otras tienen caras planas perpendiculares a los lados; entre estas dos formas se ven otras intermedias.

Los bacilos presentan asimismo gran diversidad de relaciones entre longitud y anchura. Algunos son desproporcionadamente largos, y otros tan cortos, que pueden confundirse con los cocos.

La forma de un microorganismo puede también variar de acuerdo con ciertos factores del ambiente, tales como temperatura de incubación, tiempo de cultivo, concentración del substrato y composición del medio. Las bacterias tienen su morfología característica en cultivos recientes y medios favorables para su desarrollo. Henrici (1928) distingue tres formas de bacterias: embrionarias, adultas o maduras y seniles o senescentes. La forma embrionaria corresponde a la fase de desarrollo y se caracteriza por la presencia de células largas, finas y uniformes; las formas maduras pertenecen a la fase siguiente y están representadas por células pequeñas, de menos longitud y configuración más variable; la forma senil se adscribe a la etapa de la muerte y ofrece gran variedad de contornos y tamaños.

Las formas que se apartan considerablemente del tipo morfológico normal cuando cambian uno o más factores externos, han recibido el nombre de formas de evolución o de degeneración. Henrici denominaba senescentes estas variedades degeneradas, por opinar que tales microorganismos se alteran morfológicamente con la edad, como lo hace un ser multicelular a medida que envejece. Algunos morfólogos consideran tales formas como fases definidas del ordenado ciclo vital de un microorganismo.

Las células jóvenes suelen ser mayores que las viejas de la misma especie. A medida que envejece un cultivo, las células se van agrandando progresivamente, hasta alcanzar dimensiones máximas, después de lo cual se produce el fenómeno inverso. Las variaciones bacterianas resul-

tantes de la edad y de otros factores del ambiente son sólo temporales; las formas primitivas reaparecen al sembrar los gérmenes en nuevos medios de cultivo.

Tamaño de las bacterias. El tamaño varía mucho según las especies; algunas son tan diminutas, que incluso con el microscopio más potente resulta difícil distinguirlas, y tan grandes otras, que casi se perciben a simple vista. Sin embargo, las dimensiones de la mayoría son intermedias entre estos dos extremos.

Una bacteria esférica o coco se mide por la magnitud de su diámetro; una forma bacilar o espiral, por su longitud y anchura. Calculando por este método la longitud de una bacteria espiral, se obtiene la aparente, no la real, que puede determinarse midiendo cada espira. Para efectuar tales cálculos se han formulado expresiones matemáticas.

El método que se emplee para fijar y teñir bacterias puede ser también causa de diferencias de tamaño. Las células de las bacterias se contraen considerablemente mientras se secan y fijan, y tal contracción varía según el medio de cultivo; por término medio, supone un tercio de la longitud de la célula, comparada con una preparación sin teñir en gota pendiente. Knaysi (1938, 1941) hizo notar una contracción de 15 a 25 por 100 al pasar unas células jóvenes de *Bacillus megatherium* de un caldo nutritivo a otro medio semejante que contenía cloruro sódico en concentración 2 *M*. Los medios de cultivo corrientes de laboratorio tienen una concentración aproximada 0,1 *M* de cloruro sódico.

Las mediciones ofrecerán algunas discrepancias, que dependen de la solución colorante y del modo de aplicación. En frotis secos y fijados, la pared celular y la capa mucosa no se tiñen con colorantes débiles, como azul de metileno, pero sí lo hacen con los enérgicos, como *p*-rosanilina, neofucsina, violeta cristal y violeta de metilo. Las paredes celulares y las capas mucosas se incluyen en las preparaciones que se tiñen negativamente, pero los microorganismos se ven más largos de lo que en realidad son, porque la película coloidal del colorante se contrae al secarse. En condiciones de vida, estas partes de la célula no pueden verse, y la medición de tales gérmenes afecta sólo al citoplasma.

La gran mayoría de las bacterias estudiadas y clasificadas se han medido en preparaciones fijadas y teñidas. Algunas veces se emplearon frotis secos con coloración negativa, y en otros casos se hizo uso de material vivo. De esto se deduce que al indicar el tamaño de las bacterias debe especificarse el método seguido para su determinación; de lo contrario, tales datos serán de escasa utilidad.

Knaysi (1945 *a*) hizo un estudio comparativo del diámetro de células de *Bacillus cereus* y *B. mycoides*. Las mediciones de células vivas en el medio en que se desarrollaron concuerdan con las de células teñidas por un método que ponga de manifiesto la membrana celular, pues cuando no se aprecian estas membranas después de teñir, las células parecen

mucho menores de lo que son en realidad, y representan las masas contraídas de protoplasma (fig. 27).

La unidad de medida para bacterias es la micra, representada por el símbolo μ; equivale a 0,001 mm o 0,0001 cm. Una milimicra es 0,001 μ o 0,000001 mm, y se expresa por el símbolo mμ.

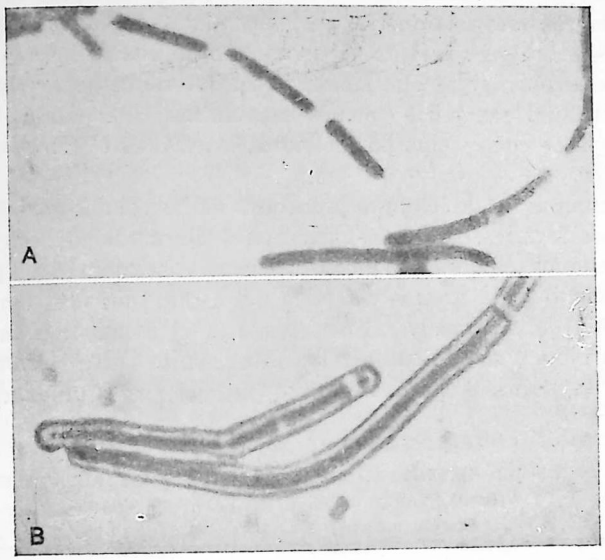


Fig. 27. — *Bacillus cereus*. *A*, células de un cultivo de seis horas en agar inclinado, incubado a 33° C y teñido con azul de metileno; *B*, células del mismo cultivo anterior, pero teñidas por un procedimiento diferente, para revelar las membranas. (Con licencia del Dr Knaysi.)

Algunas bacterias miden hasta 80 μ, y otras no pasan de 0,2 μ. Las formas mayores pertenecen al grupo de bacterias sulfurosas y ferruginosas, que poseen unas características intermedias entre las de auténticas bacterias y las de plantas superiores. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos corrientes, incluídas las bacterias patógenas, miden aproximadamente 0,5 μ de diámetro los cocos, y 0,5 por 2 a 3 μ las formas bacilares. Los gérmenes esporógenos son mayores, por regla general, que los incapaces de reproducirse por esporulación. Algunas de las bacterias corrientes dan en preparaciones desecadas y fijadas las siguientes dimensiones: *Escherichia coli*, 0,5 por 1 a 2 μ; *Proteus vulgaris*, 0,5 a 1 por 1 a 3 μ; *Salmonella typhosa*, 0,6 a 0,7 por 2 a 3 μ; *Streptococcus lactis*, 0,5 a 1 μ de diámetro; *S. pyogenes*, 0,6 a 1 μ de diámetro; *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, 0,8 a 1 μ de diámetro; *Lactobacillus acidophilus*, 0,6 a 0,9 por 1,5 a 6 μ; *Staphylococcus aureus*, 0,8 a 1 μ de diámetro; *Bacillus subtilis*, 0,5 a 0,8 por 1,6 a 4 μ; *B. megatherium*, 1 a 1,5 por 3 a 6 μ, y *B. anthracis*, 1 a 1,5 por 5 a 10 micras.

El método que más corrientemente se sigue para medir bacterias se vale de un micrómetro de ocular. También se puede utilizar una cámara clara con oculares de dibujo, o proyectar sobre una pantalla la imagen real y tomar las medidas.

Los mismos agentes que hacen variar la forma de las bacterias alteran también su tamaño. Con una o dos excepciones, las células jóvenes son mucho mayores que las viejas o maduras. Knaysi (1938) indica que las células de *B. subtilis* de un cultivo de cuatro horas eran cinco a siete veces más largas que las de un cultivo de 24 horas; las diferencias de anchura son mucho menos manifiestas. Una notable excepción a esta regla de contracción por efecto de la edad es el *Corynebacterium diphtheriae*.

La disminución de longitud y anchura de las células parece provenir de diversos factores. Las transformaciones del ambiente, con acumulación de residuos tóxicos en el medio, se consideran como causa principal; un incremento de la presión osmótica del medio motivará también una disminución de tamaño, y tal vez sea éste el factor más importante.

En la tabla 4 se expone la relación existente entre las dimensiones de bacterias, virus, moléculas, átomos, radiaciones y unidades básicas.

TABLA 4. — RELACIÓN ENTRE LOS TAMAÑOS DE BACTERIAS, VIRUS, MOLÉCULAS, ÁTOMOS, RADIACIONES Y UNIDADES BÁSICAS

0,0001 a 0,000001 mμ (unidades básicas)	0,001 mμ (radiaciones)	0,1 a 0,01 mμ (átomos)	0,01μ a 0,1 mμ (moléculas)	1 a 0,01 μ (virus)	Hasta 1 μ (bacterias)
Neutrón	Rayos γ del radio	Diámetro del átomo de H, 0,1 mμ	Proteínas, 4 a 9 mμ	Psitacosis, 0,25 μ	Micrococo, 1 μ
Electrón		Rayos X	Partículas coloidales pequeñas	Viruela, 0,2 μ	
Rayos cósmicos				Herpes, 0,12 μ	
Rayos α				Poliomielitis, 0,01 μ	
Protón					
Soluciones verdaderas, < 1 mμ		Soluciones coloidales, 1 a 200 mμ		Emulsiones y suspensiones, 200 mμ a 1 000 μ (1 mm)	

CÉLULA BACTERIANA

Las bacterias, consideradas como grupo, no son todas semejantes en su aspecto morfológico, ya que existen entre las diversas especies diferencias estructurales. Se admite generalmente que una célula bacteriana consiste en una membrana compuesta que encierra un citoplasma, substancia nuclear y, a menudo, diversos gránulos, glóbulos de grasa y una o varias vacuolas. La palabra protoplasma se usa comúnmente para indicar el conjunto de citoplasma y núcleo. Además de esto, ciertas especies contienen cuerpos resistentes, conocidos por esporas, y algunas poseen órganos de locomoción o flagelos.

Membranas celulares. Según afirma Knaysi (1946 *a*, 1951), las células bacterianas se hallan envueltas por tres membranas: membrana citoplasmática, pared o membrana celular y capa mucosa.

En las bacterias jóvenes aparece primero la membrana citoplasmática como una película fluida interficial, que va tornándose más espesa y densa a medida que se acumula substancia superficialmente activa, para transformarse finalmente en una estructura firme, formada en ocasiones por varias capas; Knaysi la supone constituida por lipoides, lipoproteínas y otras substancias, en combinación química muy estable. A esta membrana se deben principalmente las reacciones de Gram y las de acidorresistencia. Si una célula se plasmoliza por inmersión en una solución hipertónica, la membrana queda fláccida y se contrae, y con ella la substancia citoplasmática. El espesor de la membrana citoplasmática varía incluso en una misma célula; en las jóvenes de *Bacillus cereus* suele ser de 0,21 a 0,35 μ.

La membrana o pared celular es una estructura más rígida y determina la forma de la bacteria. Se conduce como una membrana semipermeable y, al parecer, desempeña un papel fundamental en las actividades vitales de la célula. Tiene muy poca afinidad por los colorantes, lo que significa que probablemente no se tiñe por los procedimientos normales de coloración de frotis bacterianos. Químicamente aparece compuesta de un carbohidrato complejo de naturaleza desconocida, usualmente considerado como una hemicelulosa, y que se supone impregnado de otras substancias, algunas de las cuales contienen nitrógeno. Se ha citado como componente de la pared celular de las bacterias una glucosamina acetilada y polimerizada, la quitina, compuesto resueltamente identificado en las membranas celulares de los mohos.

Salton y Horne (1951 *a*, *b*) aislaron paredes celulares de varias especies de bacterias e informaron que mostraban las siguientes propiedades: las preparaciones desecadas por congelación daban una substancia blanca estable, de aspecto medular, insoluble en muchos disolventes orgánicos; su composición era compleja y sólo contenía indicios de ácido nucleico.

Se considera la capa mucosa como una envoltura externa modificada de la membrana celular, ya que estas dos estructuras dan, en muchas ocasiones, las mismas reacciones microquímicas. Los carbohidratos solubles elaborados por muchas bacterias tienen su origen en esta capa mucosa, que, a semejanza de la pared celular, muestra también poca afinidad por los colorantes. Cuando la capa mucosa es grande y permanece fija alrededor de la célula, se denomina cápsula.

Véase más información en Bisset (1953), Murray y Robinow (1952), Robinow y Murray (1953).

Cápsulas de bacterias. Muchas bacterias, en particular las que producen cultivos mucoides, forman una substancia extracelular de naturaleza mucosa o gelatinosa, la cual puede mantenerse firmemente adherida como una capa envolvente discreta en cada célula, o separarse libremente de ella. En el primer caso se denomina cápsula; en el segundo, mucosidad libre o goma.

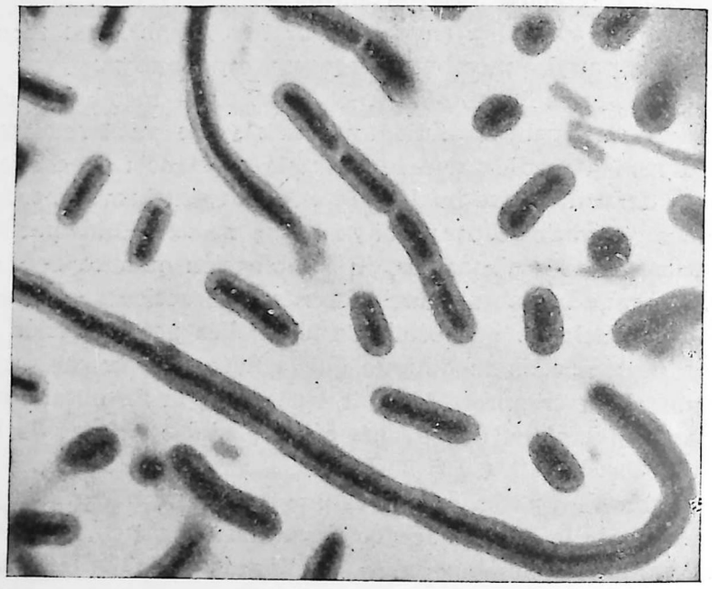


Fig. 28. — Cápsulas de *Klebsiella pneumoniae*. (Según Klieneberger-Nobel.)

Cápsulas y mucosidad parecen ser distintas por sus aspectos morfológico y bioquímico; la cápsula es parte de la célula, y la mucosidad, una secreción. Según Klieneberger-Nobel (1948), las cápsulas tienen figura definida y densidad más o menos concreta en su totalidad, así como contorno definido (fig. 28), mientras que las capas mucosas son amorfas y pueden dilatarse en estructuras múltiples, en su mayoría concentradas junto a las células bacterianas, con densidad decreciente a medida que se alejan de ellas.

Los cultivos en caldo de gérmenes productores de cápsulas suelen ser de contextura fibrosa, y las colonias en agar muestran una superficie muy húmeda y brillante, descrita como mucoide. La formación de cápsulas depende de la composición del medio de cultivo, pero especialmente de la fase de variación del microorganismo. Algunos gérmenes patógenos producen grandes cápsulas en medios de cultivo ricos en fluidos animales; otros las forman al incubar cultivos a baja temperatura (10° a 20° C).

Los análisis químicos de substancia capsular recuperada de cierto número de bacterias han demostrado que consiste en carbohidratos complejos, conocidos por polisacáridos y citados algunas veces como gomas.

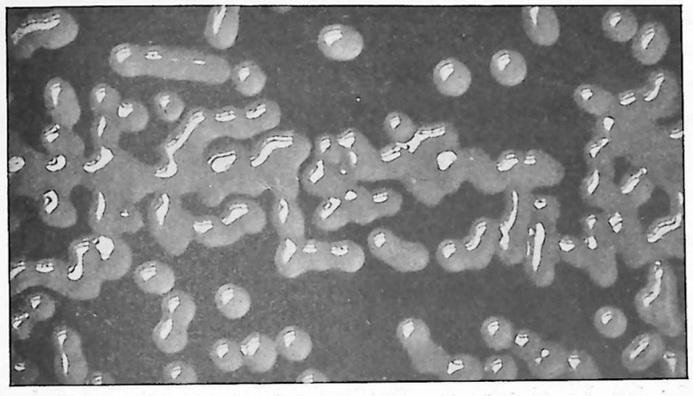


Fig. 29. — *Leuconostoc mesenteroides*, cultivo de tres días en agar con glucosa al 10 %, incubado a la temperatura ambiente. (Según McCleskey, Faville y Barnett.)

Los polisacáridos que se distinguen morfológicamente como cápsulas bien definidas son difíciles de diferenciar de las gomas que fluyen de las células a medida que se forman. Los organismos que producen tales substancias lo hacen sólo cuando se desarrollan en ciertas soluciones azucaradas; algunos dan gomas solamente en presencia de un azúcar específico, y otros, en la de cualquiera de varios azúcares; sin azúcar suele formarse poca goma, o ninguna. Los microorganismos productores de gomas de este tipo ocasionan considerables pérdidas en la industria azucarera. Al aumentar la viscosidad por efecto de las gomas, se complica la filtración de las soluciones azucaradas.

McCleskey, Faville y Barnett (1947) han informado que la especie comúnmente encontrada en el zumo de la caña de azúcar es el *Leuconostoc mesenteroides*. Las células aparecían rodeadas de un polisacárido incoloro espeso, gelatinoso, consistente en dextrana (polímero de glucosa); y los cultivos aislados de este microorganismo comprendían sobre todo cuatro tipos relativamente distintos de colonias en agar azucarado al 10 %, a 20-28° C (fig. 29).

En una serie de investigaciones, Hehre y otros (1946, 1948, 1949) demostraron que los carbohidratos sacarosa y dextrina se convertían en polisacáridos del grupo del almidón o del glucógeno por obra de ciertas especies de *Neisseria, Streptococcus* y *Acetobacter*. De la sacarosa derivaban cantidades de polisacáridos mayores que de ningún otro hidrato de carbono ensayado.

Forsyth y Webley (1949 *a, b*) aislaron numerosos microorganismos del suelo, e informan que 5 a 16 % de las especies eran capaces de sintetizar polisacáridos de sacarosa y monosacáridos. Los análisis químicos de los polisacáridos sintetizados permiten distinguir cinco tipos: levulana (polímero de la levulosa); glucosa y ácido urónico; glucosa, manosa y ácido urónico; glucosa, manosa, ramnosa y ácido urónico; glucosa, manosa, xilosa y ácido urónico. Los gérmenes que sintetizan estos polisacáridos están bien distribuidos en los diversos terrenos.

Para más informes, véanse Carlson, Rosano y Whiteside-Carlson (1953), Duguid (1951), Evans y Hibbert (1947), Giglio y McCleskey (1953), Jeanes, Wilham y Miers (1948), Scarr (1950), Strandskov (1948), Whiteside-Carlson y Carlson (1949 *a, b*).

Estructuras de polisacáridos. Se dice que las células bacterianas contienen polisacáridos, en forma de cápsulas o de gomas, alrededor de su superficie externa. Pennington (1949) descubrió la presencia de tales estructuras fijando preparaciones de bacterias sobre portas con metaperyodato sódico y tiñéndolas con fucsina básica, decolorada mediante sulfito (fig. 30). En el caso del *Bacillus cereus*, experimentos de plasmólisis indicaron que el polisacárido estaba concentrado tanto en la pared celular como en la membrana citoplasmática.

La tinción selectiva del polisacárido celular se supone dependiente del efecto oxidante del peryodato sobre cuerpos químicos, tales como glicoles α y β e hidroxicetonas α. Los polialdehidos que resultan de esta oxidación selectiva reaccionan con fucsina decolorada mediante sulfito; las zonas de polisacárido en la célula toman color rojo al teñirlas.

Véanse otros pormenores en Järvi y Levanto (1950), Lankford, Hoyo y Lutteringer (1951), y Spray (1948).

Núcleo bacteriano. La presencia de un núcleo bien definido en la célula bacteriana ha suscitado gran controversia desde los comienzos de la Bacteriología.

Algunos de los primeros citólogos mantenían que las bacterias son microorganismos muy primitivos, exentos de núcleos y consistentes sólo en citoplasma, gránulos y vacuolas; esta opinión se apoyaba en que no habían observado núcleo ninguno en las células bacterianas examinadas. Otros suponían que todo el cuerpo bacteriano debía considerarse como un «núcleo desnudo», a semejanza del de los organismos superiores; el núcleo desnudo se tiene por una forma primitiva de materia

viva. Y como las bacterias poseen los atributos estructurales y fisiológicos de verdaderas células, tal concepto no es aplicable a estos microorganismos.

La confusión nacía principalmente de ser inadecuados los métodos

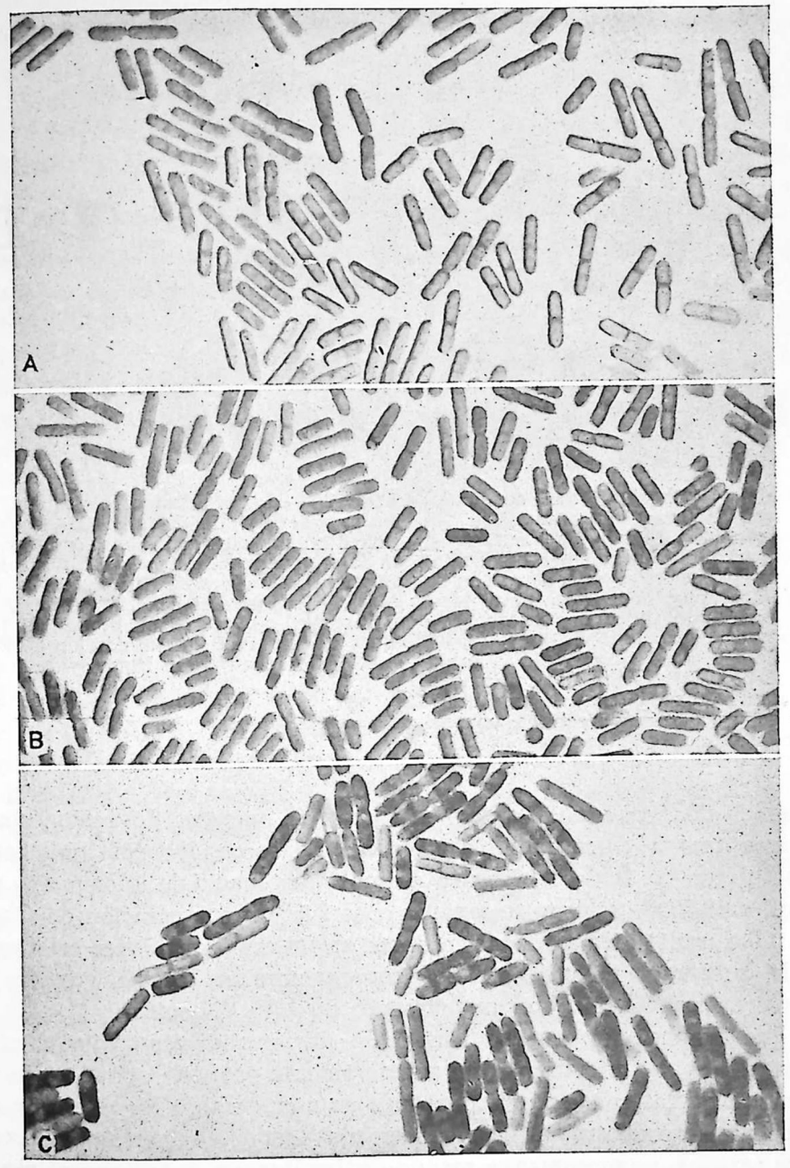


Fig. 30. — *Bacillus cereus* (procedentes de esporas) oxidados con metaperyodato sódico y teñidos con fucsina básica decolorada mediante sulfito. *A*, células de dos horas; *B*, células de seis horas; *C*, células de diez horas. Aumento: 1600 diámetros. (Según Pennington.)

de tinción para revelar las estructuras nucleares de las células bacterianas. La técnica de Piekarski, a base de la coloración de Giemsa con ácido clorhídrico, ha permitido dar a conocer numerosas observaciones que demuestran la presencia de cuerpos nucleares en las bacterias.

Robinow (1944) empleó el método de Piekarski y obtuvo pruebas considerables en favor de la hipótesis nuclear. Se prepararon extensiones

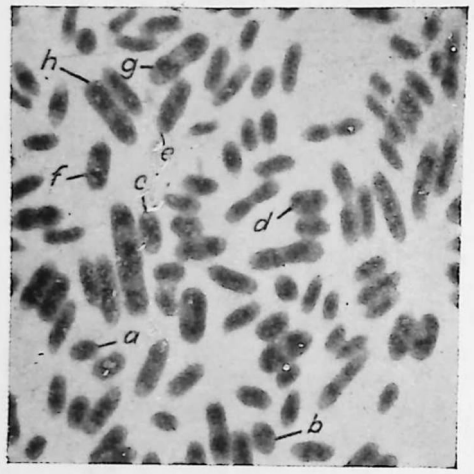


Fig. 31. — *Escherichia coli*, cultivado en agar inclinado durante 45 a 90 minutos, a 37° C. *a-h*, fases sucesivas del desarrollo de un elemento cocoide con un par central de cuerpos cromatínicos muy contiguos, para formar un bacilo típico con cuatro estructuras de cromatina. Obsérvese la fase de división en forma de *V* en *d*. El cuerpo halteriforme que constituye la rama izquierda de la *V* es mucho más grueso que el derecho, y parece lógico suponer que prepara la próxima división. (Según Robinow.)

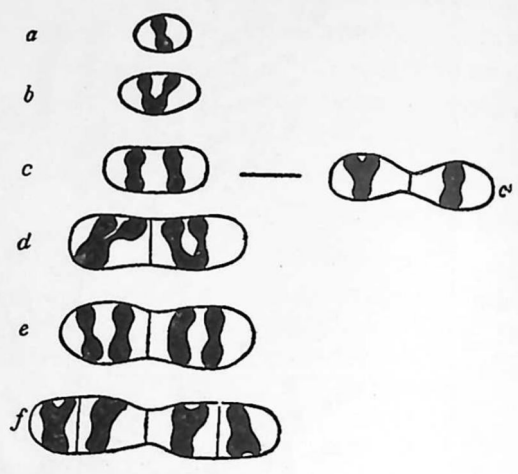


Fig. 32. — *Escherichia coli*. Esquema de fases sucesivas de división de los cuerpos cromatínicos desde el comienzo de la fase retardada, después del traslado a un nuevo medio nutritivo, hasta la primera división del microorganismo en desarrollo. *c-c'* y *c-f* son modos alternativos de desarrollo, más corriente el segundo. (Según Robinow.)

húmedas de *Escherichia coli* y se fijaron en vapores de ácido ósmico durante tres a cinco minutos; después de secos, los portaobjetos se sumergieron en ácido clorhídrico normal por espacio de unos nueve minutos, a 53-55°C, y luego se lavaron y se tiñeron con solución de Giemsa 1:20 durante diez a sesenta minutos, según las propiedades colorantes de la substancia estudiada. Las preparaciones se examinaron en un microscopio ordinario, con un aumento de 1350 diámetros.

Las formaciones cromatínicas de *E. coli* en cultivos viejos, aunque distinguibles del citoplasma, son excesivamente pequeñas, por lo general, para resolverlas con claridad. Después de una siembra en medio fresco, las estructuras de cromatina se hacen mayores y originan unos bastoncillos cortos o cromosomas, a menudo halteriformes, los cuales se multiplican por división longitudinal en un plano más o menos paralelo al eje corto de la célula (figs. 31 y 32). Una simple célula de *E. coli* contiene

un cuerpo cromatínico o uno o dos pares de estos productos representantes de las divisiones primaria y secundaria. En los cultivos jóvenes, muy pocas bacterias son células sencillas.

Las bacterias de cultivos recientes de *Bacillus magatherium* toman aspecto listado, como si cada bacteria constase de dos, tres o cuatro células independientes (fig. 33).

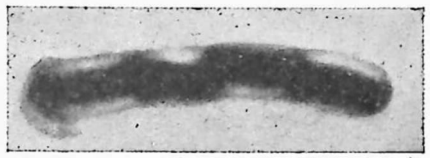


Fig. 33. — *Bacillus magatherium*. Los cuatro componentes celulares de un organismo joven se han apartado de la mebrana celular externa. La tercera célula, a partir de la izquierda, se ha retirado también del tabique transversal que la separa de la cuarta. El extremo izquierdo de la célula continúa aún en la cubierta de la espora.

Smith (1950) recomienda una técnica citológica simplificada y perfeccionada para revelar cuerpos cromatínicos en células bacterianas. Consiste en fijar extensiones con vapores de tetraóxido de osmio, tratarlas con ácido clorhídrico, atacarlas con formaldehido a baja concentración y teñirlas con fucsina básica acuosa. Se atribuyen a esta técnica ciertas ventajas en cuanto a selectividad, estabilidad y rapidez de preparación frente al método empleado por Robinow (fig. 34).

Para más detalles, véanse Bisset (1950, 1951), Califano (1949), Caselli (1947), Cassel (1950), Hoffman (1951), Knaysi (1946b), Knaysi y Baker (1947), Luria y Human (1950), Saleti, Cleverdon y Newcomer (1952).

Vacuolas. En bacterias jóvenes se ha comprobado la existentia de vacuolas, cavidades del protoplasma que contienen un líquido conocido por jugo celular. Al acercarse la madurez, algunas de las substancias alimenticias hidrosolubles de reserva que las células elaboran se disuelven en el contenido de las vacuolas, y los productos insolubles precipitan como inclusiones citoplasmáticas.

Gránulos metacromáticos. Las inclusiones celulares mejor conocidas de las bacterias reciben el nombre de volutina o gránulos metacromáticos (fig. 35). Se suponen originados en el citoplasma de bacterias jóvenes y localizados en las vacuolas al madurar las células; muestran gran afinidad para colorantes básicos, lo cual indica que tienen carácter ácido.

Generalmente se cree que los gránulos o corpúsculos metacromáticos constan de ácido nucleico combinado con proteínas básicas o bases orgánicas. Está bastante bien demostrado que contienen ácido ribonucleico, a diferencia del ácido desoxirribonucleico de núcleo (pág. 690). Químicamente, núcleos y gránulos metacromáticos son similares.

Se supone que los gránulos metacromáticos no constituyen partes vitales del citoplasma ni del núcleo, sino simplemente reservas nutritivas nitrogenadas. No es corriente verlos en células jóvenes, o sea en microorganismos en la fase activa de crecimiento, sino que aparecen en las

células adultas, una vez terminado el desarrollo. En general, las células jóvenes se tiñen del todo, mientras que las viejas presentan un aspecto muy granular.

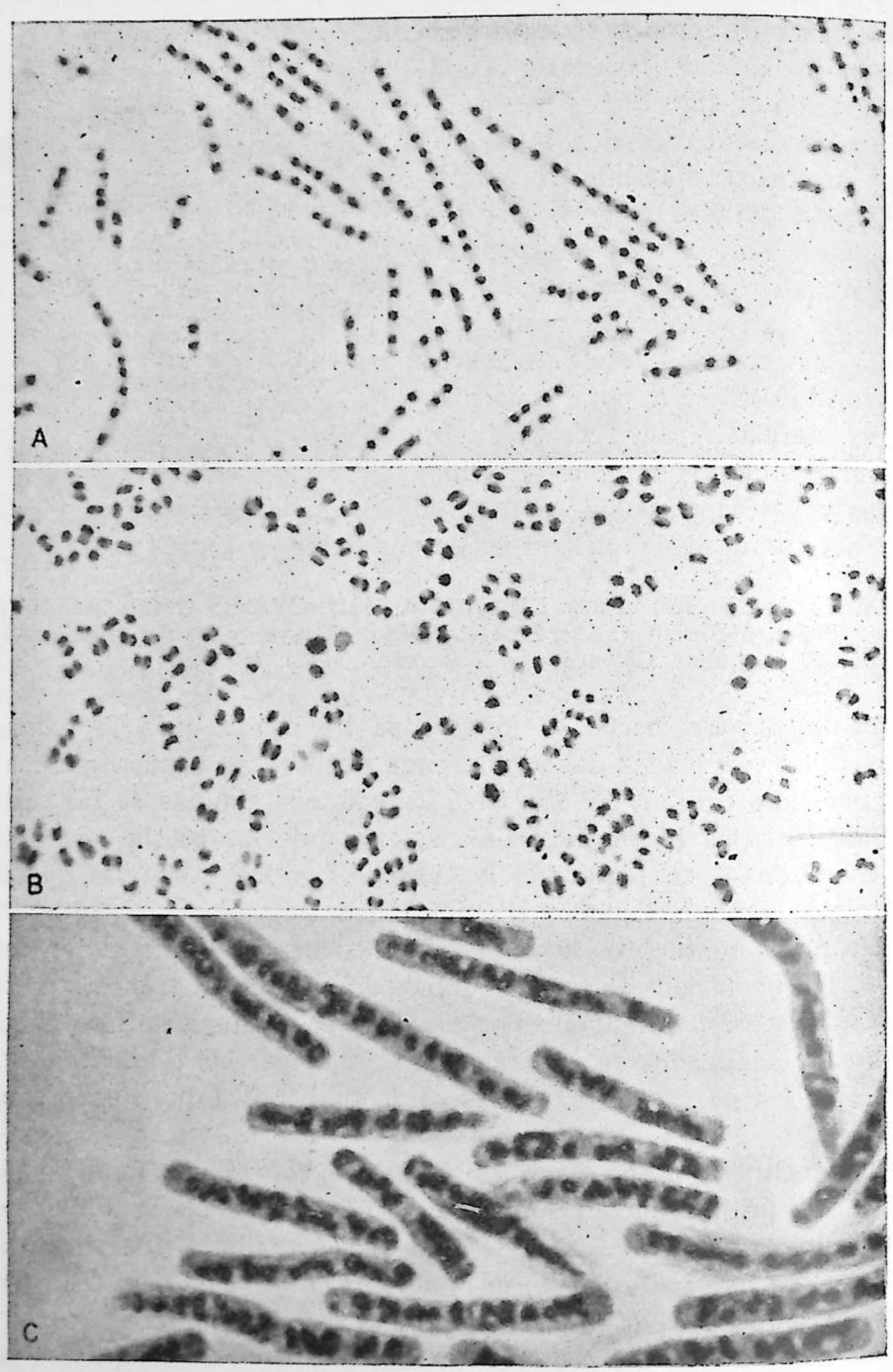


Fig. 34. — Formaciones cromatínicas en bacterias. *A, Escherichia coli,* 2400 diámetros; *B, Micrococcus pyogenes* var. *aureus,* 2400 diámetros; *C, Bacillus megatherium,* 3300 diámetros. (Según Smith.)

Glóbulos de grasa. Burdon, Stokes y Kimbrough (1942) indican que ciertos microorganismos del grupo de *Bacillus cereus* y el *B. megatherium,* cultivados en agar con glicerina o carbohidratos, pueden almacenar grasa en forma de glóbulos. La presencia de éstos se comprueba en 24 horas y alcanza generalmente su máximo a las 48 horas (fig. 36). En algunos tipos, la grasa forma glóbulos grandes; en otros, aparecen

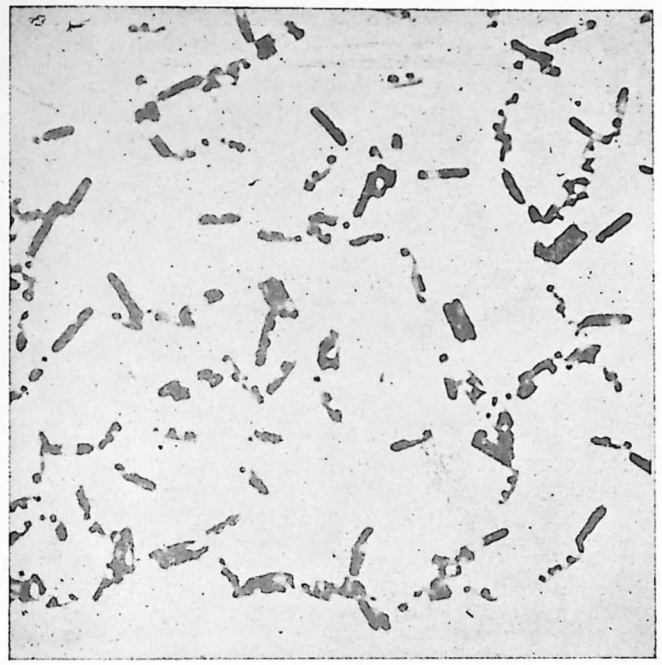


Fig. 35. — Gránulos metacromáticos en *Bacillus subtilis.* Cultivo de 18 horas, teñido con solución de violeta de genciana al 1:5000.

pequeños y dispersos. Los mencionados autores señalan que ciertas formaciones con aspecto de vacuolas, en frotis teñidos con azul de metileno, resultan ser en realidad glóbulos de grasa, cuando se tratan con negro Sudán *B,* colorante que tiñe las grasas.

Una información más amplia se encontrará en Burdon (1946).

Movilidad bacteriana. El movimiento de las bacterias se atribuye a la presencia de unos órganos de locomoción llamados flagelos, que por primera vez observó Cohn (1875) en especies teñidas. Constituyen excepciones algunas bacterias sulfurosas, que carecen de flagelos, pero presentan un lento movimiento de reptación derivado probablemente de contraerse su protoplasma. La presencia de flagelos no indica que los microorganismos sean siempre capaces de locomoción, pero denota una aptitud potencial de movimiento.

La movilidad autónoma bacteriana implica una verdadera traslación.

que no debe confundirse con el movimiento oscilatorio o trémulo observado en partículas muy pequeñas suspendidas en un líquido. Esta última clase de movimiento se califica de browniano, por haberlo descubierto Roberto Brown (1828, 1829, 1830); proviene de los impactos de las moléculas del líquido suspensor contra las partículas suspendidas.

Los flagelos son órganos sumamente delicados y que con facilidad se destruyen al preparar frotis por los métodos usuales. Una vez teñidos, aparecen largos, tenues y ondulados, con los extremos romos en algunos



Fig. 36. — *Bacillus cereus* con glóbulos de grasa; de un cultivo de 48 horas en agar con glicerina, teñido con negro Sudán *B* y safranina. Los glóbulos aparecen de color negro azulado, y el citoplasma, de color rosado. (Según Burdon, Stokes y Kimbrough.)

casos y ligeramente engrosados en otros. Los flagelos se dirigen siempre en sentido contrario al del movimiento de la célula, con un ángulo aproximado de 45°; este sentido se invierte cuando los flagelos se desvían unos 90°. Los movimientos se hacen giratorios al avanzar los flagelos oscilando hacia un lado solamente e impulsar el microorganismo en dirección espiral o de sacacorchos.

La longitud de los flagelos ofrece considerables variaciones, según la edad y los cambios del medio ambiente. Entre la longitud de los flagelos y la de la célula parece existir cierta relación inversa.

Suponen algunos autores que los flagelos nacen de la membrana celular; otros, que tienen su origen en el citoplasma y salen por unos poros de la pared. Micrografías electrónicas obtenidas por Iterson (véase Boltjes, 1948) y otros muestran que los flagelos atraviesan las débiles zonas exteriores y se internan en el citoplasma (figs. 37 y 38). Si la zona exterior es la membrana, los flagelos se inician en el citoplasma celular.

El número y la situación de los flagelos difieren en las distintas

especies bacterianas, aunque para cada una de ellas suele ser constante; algunas tienen un solo flagelo, y otras poseen dos o más. También varía mucho su disposición en torno al cuerpo de los microorganismos.

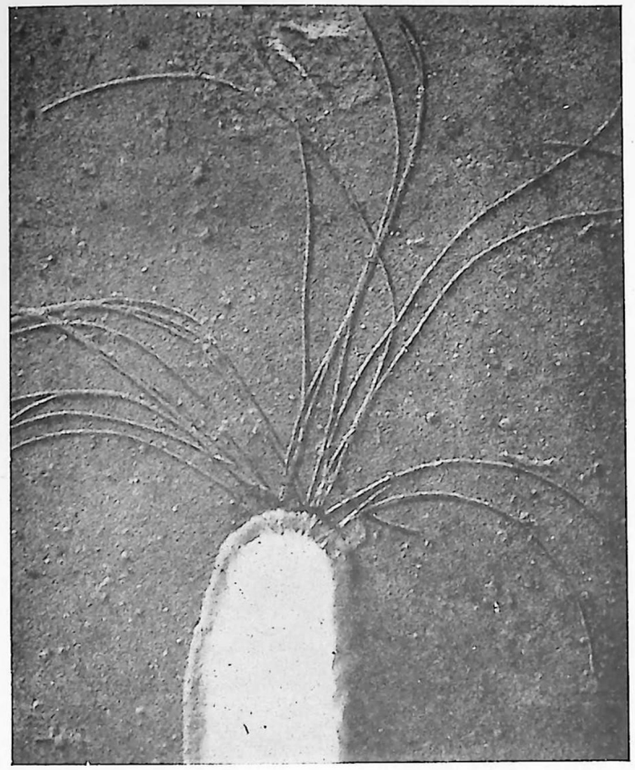


Fig. 37. — Micrografía electrónica de los flagelos de *Spirillum serpens*, 30.000 aumentos. Obsérvese el paso de los flagelos a través de la pared o membrana celular, al interior del citoplasma. (Con licencia de la señorita Van Interson.)

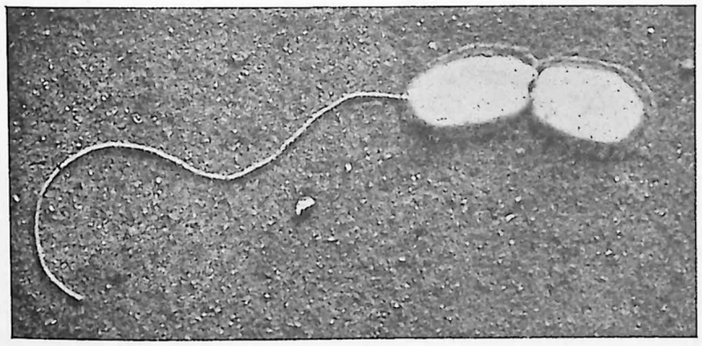


Fig. 38. — Micrografía electrónica de los flagelos de *Vibrio metschnikovii*, 20.000 aumentos. (Con licencia de la señorita Van Iterson, Delft. Holanda.)

Los microorganismos se pueden clasificar a base del número y la disposición de los flagelos, como sigue:

Monótricos: Un solo flagelo en un extremo de la célula.
Lofótricos: Dos o más flagelos en uno o ambos extremos de la célula.
Anfítricos: Un flagelo en cada extremo.
Perítricos: Varios flagelos alrededor de la célula.

Knaysi (1942) midió la anchura de flagelos de *Aerobacter cloacae* en una micrografía electrónica y la evalúa aproximadamente en 0,03 μ de diámetro. Hofer (1944) obtuvo resultados casi iguales con los flagelos de varias especies de *Azotobacter*. Esta medida viene a ser 1/10 de la longitud de onda de luz visible y, de ser cierta, explica sin duda por qué los flagelos no se pueden ver en preparaciones de gota pendiente o en frotis teñidos por los procedimientos sencillos de coloración corrientes (página 16); empleando métodos especiales, se deposita en los flagelos el colorante necesario para que sus dimensiones sean mayores que las de la luz visible, y es posible verlos en un microscopio ordinario.

En las figuras 39 y 40 se exponen fotomicrografías de Leifson (1951), que representan la distribución de los flagelos en algunas bacterias.

Más información sobre este punto se encuentra en Leifson y Hugh (1953).

Por otra parte, Pijper (1946, 1947 *a, b*; 1948, 1949 *a, b, c*) y Pijper y Nun (1949) discutieron la hipótesis de que la movilidad radique en los flagelos. Estos autores agregaron metilcelulosa a un cultivo de un microorganismo móvil, para aumentar la viscosidad del medio, y comprobaron que así disminuía notablemente el ritmo de movimientos de las células, que en tales condiciones presentaban un movimiento ondulante giratorio, como otros seres acuáticos. A juicio suyo, los flagelos no son órganos de locomoción, sino sólo accesorios —apéndices inútiles, remolinos de polisacáridos—, efecto y no causa de la movilidad bacteriana; es decir que

Las bacterias móviles presentan un movimiento ondulante giratorio, como se ha confirmado obteniendo una película cinemicrográfica de bacterias que nadan rápidamente en caldo, y también examinando las mismas bacterias a bajas temperaturas, que reducían su velocidad (fig. 41).

Este movimiento espirilar de las bacterias es suficiente para propulsarlas, sin necesidad de invocar órganos motores especiales, como los flagelos. Nada prueba que los apéndices flageliformes de las bacterias actúen como órganos locomotores; en realidad, todos los datos adquiridos, si se examinan con espíritu crítico, indican lo contrario.

El análisis de la constitución de las bacterias excluye la posibilidad de que los apéndices, «flagelos», o los delgados filamentos o cilios ondulantes sean órganos vivos, ni estén en comunicación directa con las partes vivas de la célula. Las micrografías electrónicas y las preparaciones teñidas no demuestran otra cosa.

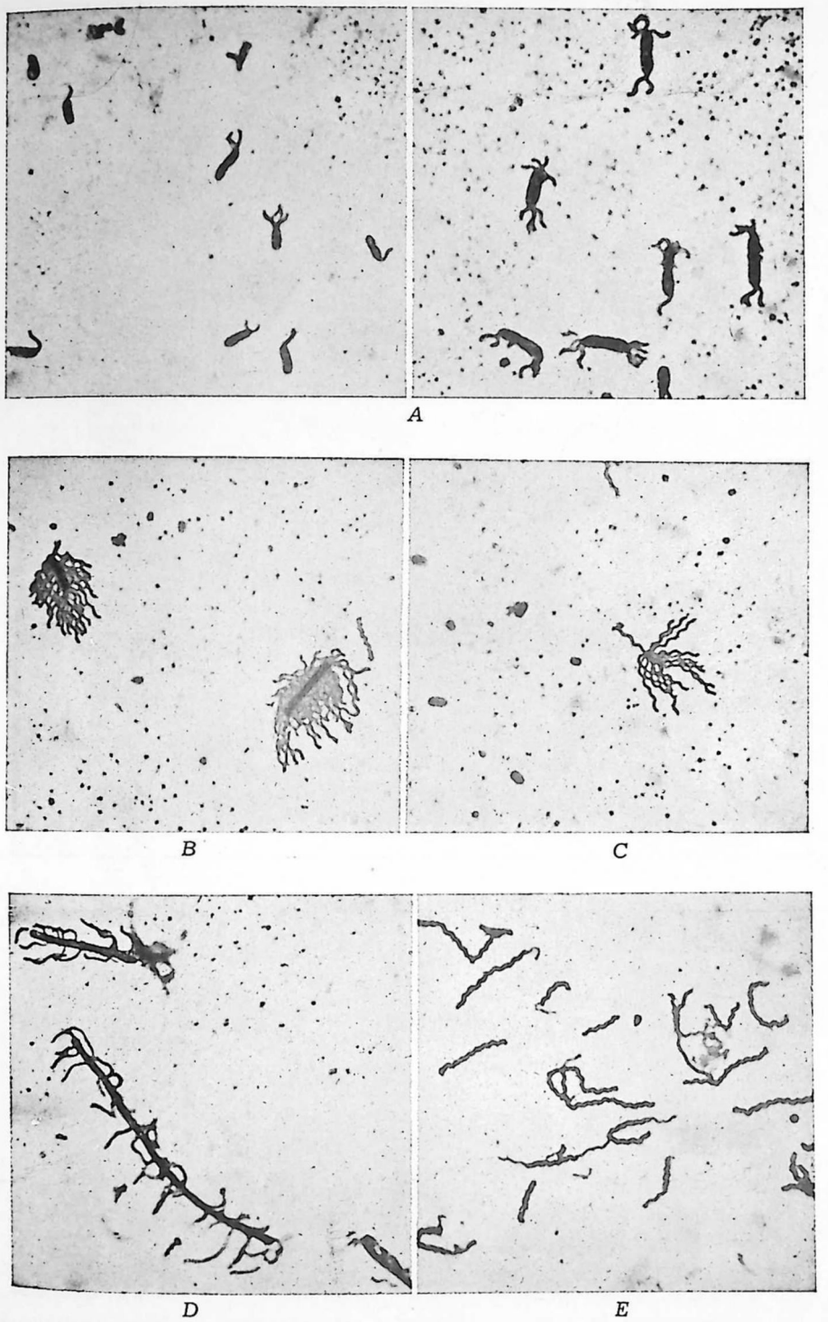


Fig. 39. — Forma y distribución de los flagelos bacterianos. *A*, especies de *Alcaligenes*; *B*, *Salmonella typhosa*; *C*, *Proteus vulgaris*; *D*, variedad de un microorganismo fijador de nitrógeno; *E*, *Treponema pallidum*. (Según Leifson.)

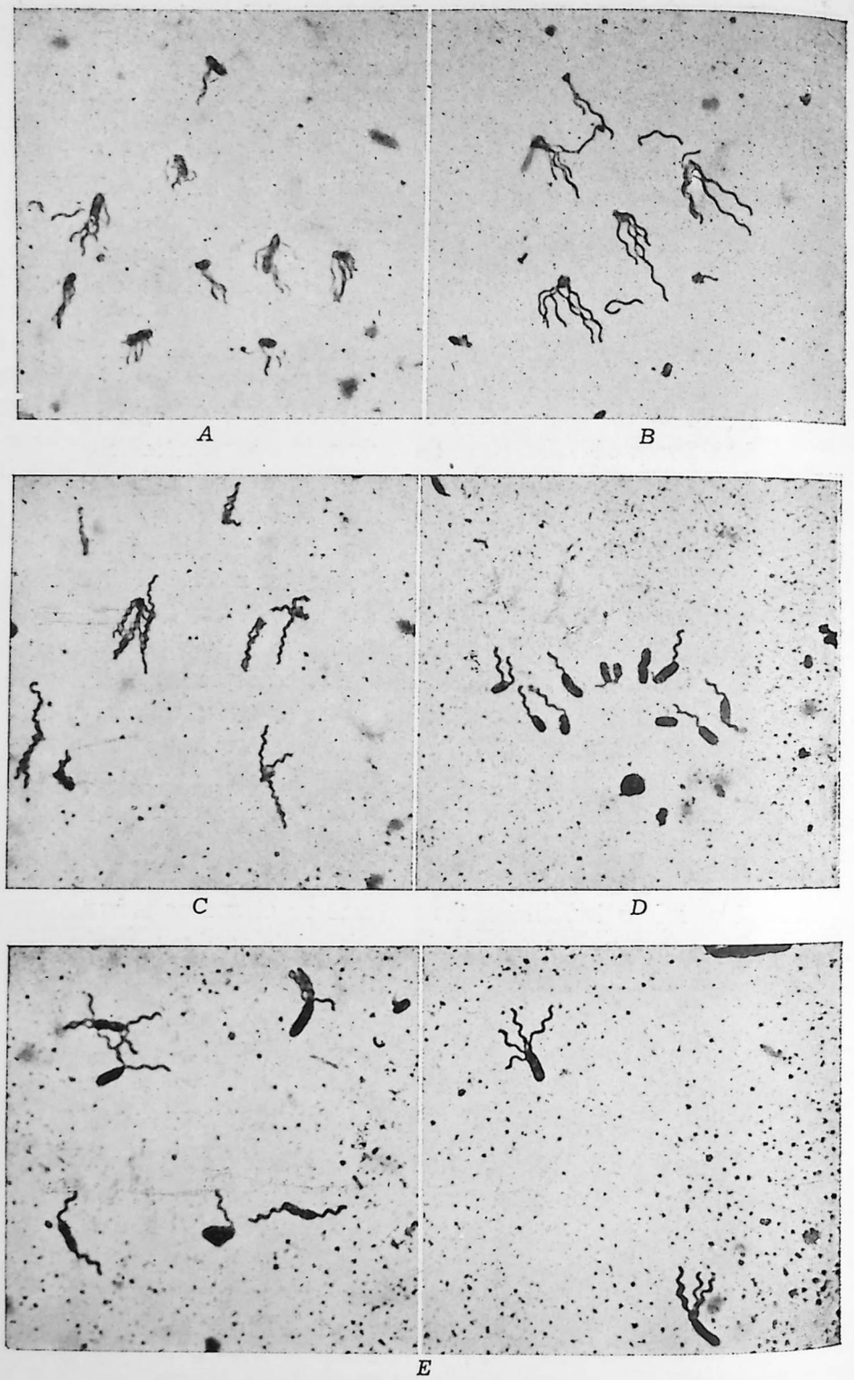


Fig. 40. — Forma y distribución de los flagelos bacterianos. *A*, *Brucella bronchiseptica*; *B*, *Salmonella wichita*; *C*, variedad del mismo germen; *D*, *Pseudomonas aeruginosa*; *E*, especies de *Pseudomonas*. (Según Leifson.)

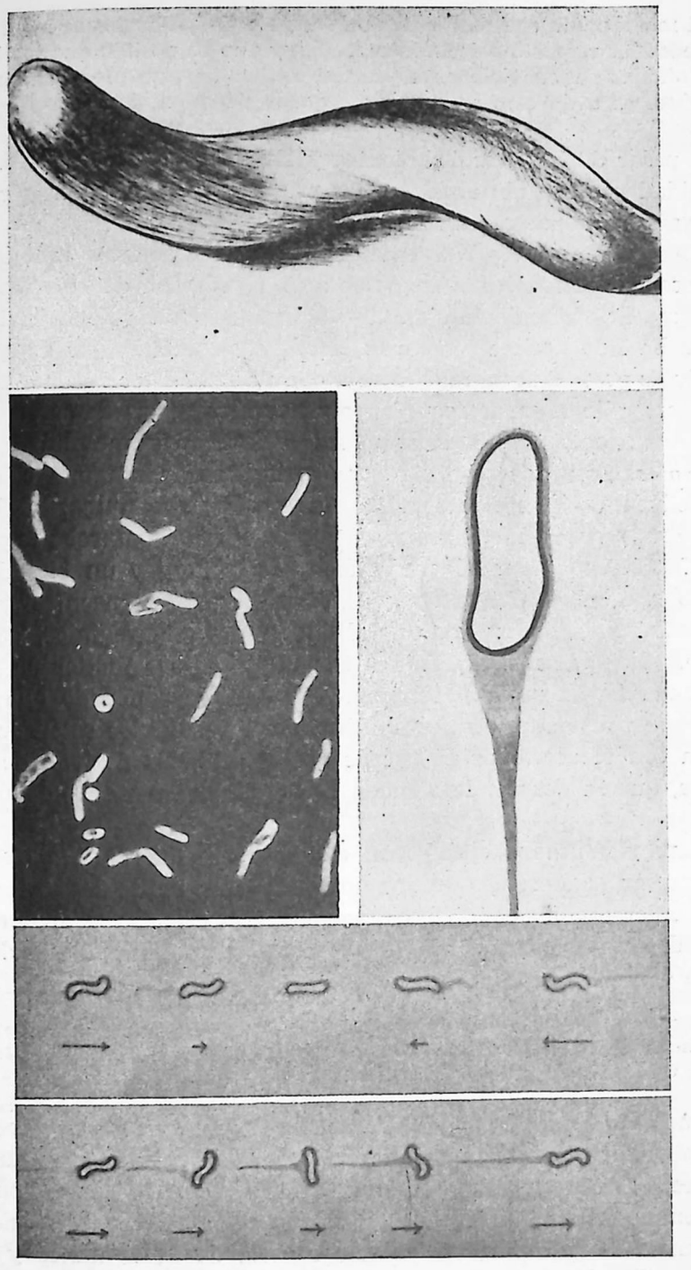


Fig. 41. — Forma y movilidad de las bacterias. *A*, dibujo en perspectiva de un modelo de bacteria móvil, de configuración espiral; *B*, bacilos tíficos en reposo, durante su división; formas espirales, apropiadas para el deslizamiento; *C*, esquema de bacteria móvil con apéndice: transición de capa mucosa a cola, que explica el punto oscuro entre ésta y el cuerpo; *D*, esquema de la reversión súbita de una bacteria móvil, con transición de apéndice a capa mucosa y, al contrario, por el extremo opuesto; *E*, esquema de una bacteria móvil que describe una media vuelta; la cola permanece en su sitio. (Según Pijper.)

El movimiento ondulante giratorio visible de las bacterias móviles satisface todos los requisitos de la locomoción, y aun es posible que las bacterias desarrolladas en condiciones especiales naden de este modo sin necesidad de apéndices o de otros presuntos órganos de movimiento.

A pesar de los descubrimientos y las conclusiones de Pijper, en la actualidad parecen abrumadoras las pruebas que atribuyen la condición de órganos locomotores a los flagelos.

Conn y Elrod (1947) estudiaron diversas bacterias móviles en el microscopio electrónico y llegaron a la conclusión de que los flagelos deben seguir teniendo la significación que se les ha dado hasta ahora.

No ha sido posible confirmar la afirmación de Pijper de que todas las células presentan un movimiento ondulante giratorio como otros seres acuáticos; sólo algunas parecían ser flexibles, y las demás, a menudo cortas y perfectamente rígidas, pero tan dotadas de movilidad como las ondulantes. Tampoco se observaron apéndices de ninguna clase.

Weibull (1948, 1949) aisló flagelos de *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis* muy puros. Mediante análisis químicos se comprobó la presencia de 15,7 a 16,1 % de nitrógeno, indicios de fósforo y un 1 % de carbohidrato (probablemente impurezas); asimismo se encontraron los siguientes aminoácidos: arginina, lisina, ácido asparagínico, ácido glutámico, glicina, serina, alanina, treonina, valina, metionina, leucina, isoleucina, fenilalanina y tirosina. Este autor deduce de ello que los flagelos son de naturaleza proteínica. Tales resultados están en contradicción con el aserto de Pijper de que los flajelos derivan de la capa mucosa, que se desprende a modo de varios filamentos ondulantes delgados.

Starr y Williams (1952), con ayuda de la micrografía electrónica, demostraron la presencia de una fina estructura helicoidal en los flagelos de un microorganismo difteroide móvil; tal estructura aparecía como hélice de triple paso hacia la izquierda, con un período axil de 50 mμ (figura 42).

Véase más información en Boltjes (1948), De Robertis y Franchi (1951), Houwink y Van Iterson (1950), Orskov (1947), Rinker y Koffler (1951), Thjotta y Kass (1946), y Weibull (1951).

Tinción de flagelos. Es difícil teñir flagelos, en particular para los principiantes; por eso se han propuesto muchos métodos. Sea cualquiera el procedimiento empleado, hay que tratar primero la extensión con un mordiente para que los flagelos tomen la coloración con intensidad. Los mordientes suelen consistir en una mezcla de ácido tánico y una sal metálica. En algunos métodos se aplican mordiente y colorante por separado; en otros se combinan en una sola solución.

Boltjes (1948) llegó a las siguientes conclusiones respecto a la coloración de flagelos bacterianos:

Son cuatro, por lo menos, los factores que influyen en los resultados de la tinción: la pericia del investigador, el microorganismo estudiado, el medio de cultivo en que se ha desarrollado éste y el método de coloración. De ellos, tal vez es el primero el más esencial, y el último el que menos interesa. La importancia de la habilidad queda demostrada por el hecho repetido de los estudiantes que no aciertan a teñir flagelos, mientras que su maestro no encuentra dificultad en demostrarlos al mismo tiempo y con la misma suspensión. Además, generalmente se consigue hacerlo con

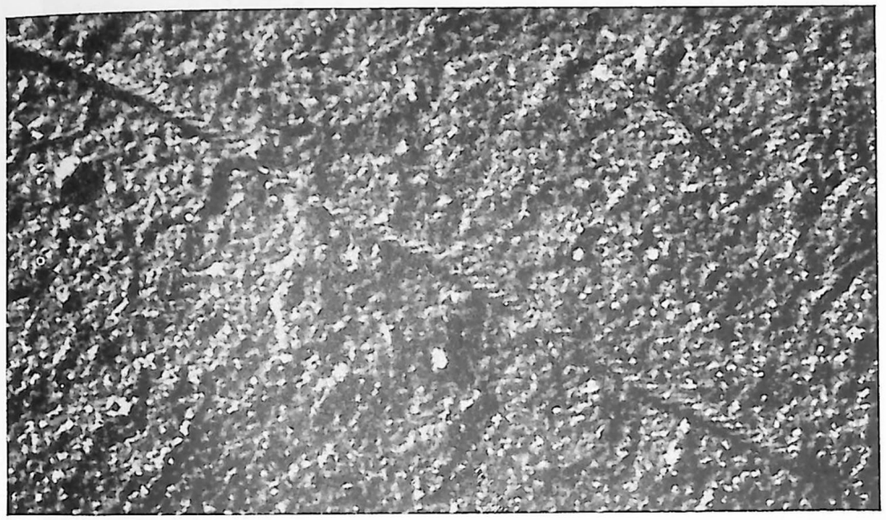


Fig. 42. — Micrografía electrónica que muestra la fina estructura helicoidal de un flagelo de germen difteroide, en forma de hélice de triple paso hacia la izquierda, con 19 mμ de diámetro y 50 mμ de periodicidad axil; 100.000 aumentos. (Según Starr y Williams.)

una nueva fórmula sólo tras varios ensayos; los primeros intentos de teñir una bacteria desconocida suelen resultar infructuosos. Por otra parte, lo usual es no distinguir claramente los flagelos sino en una parte más bien pequeña de la preparación. Los distintos colores de las bacterias teñidas indican sin duda que durante la tinción no son iguales las condiciones en todas partes, y como muchos flagelos se desprenden en el curso de la desecación, no es extraño que en la mayoría de los casos se tiñan bien solamente unas pocas bacterias. A pesar de todo, es cierto que, con alguna experiencia de la técnica de coloración, los resultados son tan consecuentes que nunca podrá haber confusión entre bacterias con auténticos flagelos polares, como las de *Pseudomonas fluorescens* o *Vibrio comma*, y las perítricas, de que son ejemplo las de *Proteus mirabilis* y *Salmonella typhosa*. Por eso creemos que la tinción de flagelos es un procedimiento digno de crédito.

Movimientos de las colonias. Muto (1904) describió un microorganismo, *Bacillus helixoides*, cuyas colonias se movían, cultivadas en un medio sólido. Smith y Clark (1938) y Shinn (1938) hicieron observaciones similares con un germen denominado *B. alvei*.

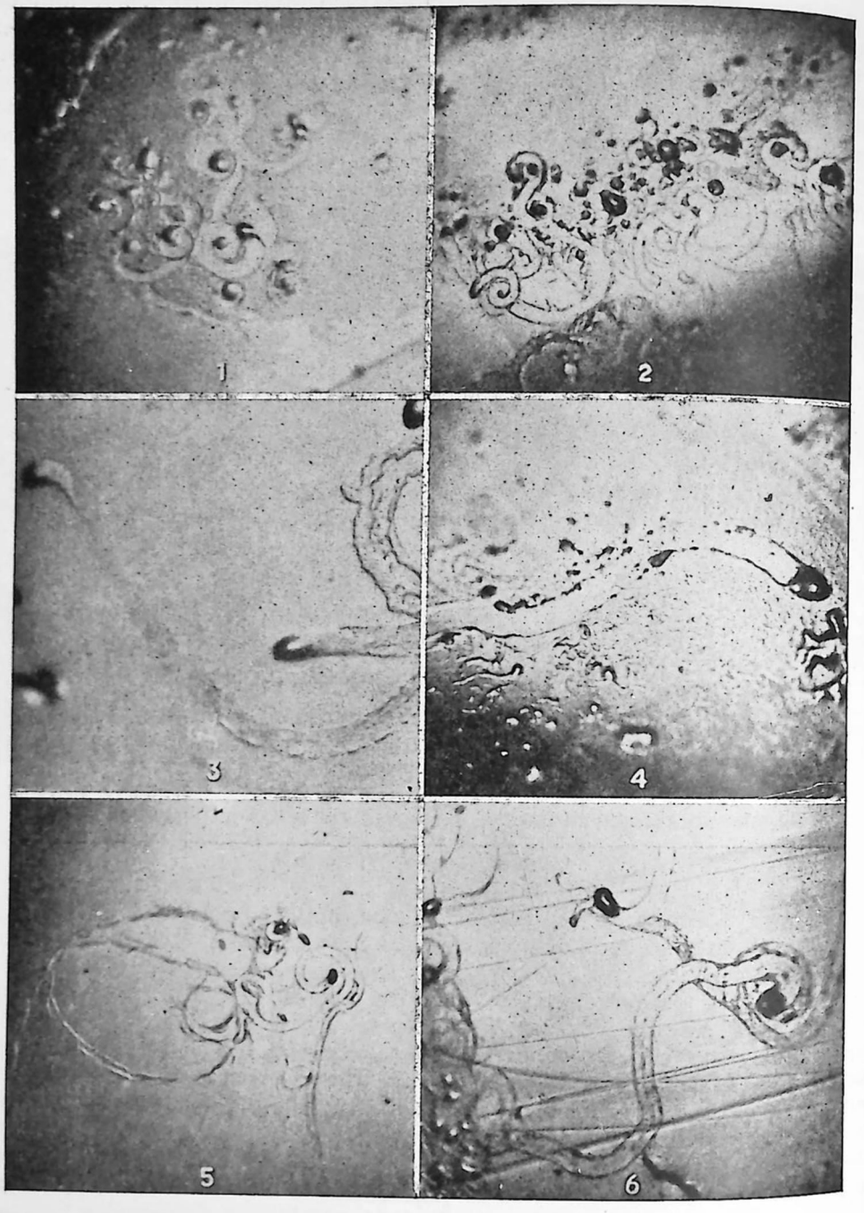


Fig. 43. — Colonias rotativas y migratorias de *Clostridium oedematiens*: 1, tipo B, de 24 horas, con numerosos grupos de células errantes que describen rastros curvos patentes en la nutrida extensión; 2, tipo B, de 24 horas, con numerosas colonias hijas errantes y rastros más bien cortos; 3, tipo A, de 24 horas, con rastros y colonias en movimiento; 4, tipo B, de 24 horas, con un numeroso grupo errante de células que se abre paso por la nutrida extensión; 5, tipo B, de 24 horas; los bacilos separados en ruta se han multiplicado considerablemente; 6, tipo B, de 72 horas, con colonias hijas extensas y rastros bien definidos. (Con licencia de Turner y Eales, Australian J. Exp. Biol. Med. Sci., 19: 167, 1941.)

Shinn preparó películas retardadas de las distintas colonias en placas de agar y logró medir sus velocidades. Informó que el movimiento lineal medio de colonias de 0,2 a 0,5 mm de diámetro era de unos 14 mm por hora; comparando esta cifra con la velocidad de las células sueltas de otras especies de bacterias móviles, obtuvo los siguientes resultados:

Salmonella typhosa	65 mm/hora
Bacillus megatherium	27 mm/hora
B. alvei (colonias)	14 mm/hora

El movimiento de las colonias no era sólo lineal, sino también giratorio lento. El sentido de rotación de las 200 a 300 colonias observadas era contrario al del reloj, salvo el de dos de ellas, que giraban a la inversa.

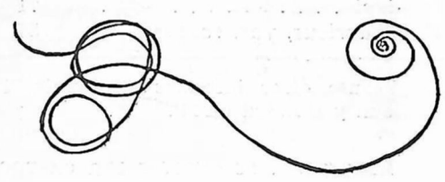


Fig. 44. — Croquis de un rastro enredado de una colonia errante, con dos espirales orientadas según el reloj y otra final en sentido contrario. El tamaño de la colonia ha aumentado considerablemente al quedar ésta en reposo, con marcas radiales curvas que indican la rotación; el rastro mide alrededor de 2 cm de longitud. (Según Turner y Eales.)

Turner y Eales (1941 *a, b*) han descrito la movilidad rotativa y migratoria de diversas especies de gérmenes aerobios y anaerobios. La rotación de uno de los primeros se producía al principio del crecimiento (figura 43); las células se segregaban en pequeños grupos y se alineaban concéntricamente en torno a un centro común, para formar placas discoides de una o pocas bacterias de espesor. Al proseguir la multiplicación, se constituían capas sucesivas a modo de terrazas y aumentaba la altura de la colonia.

Luego, las colonias iniciaban su migración, dejando un rastro curioso en la superficie del agar. Pocas células quedaban rezagadas, la mayoría en los bordes del rastro, que formaban dos líneas separadas por la anchura de la colonia en movimiento.

Las colonias migratorias típicas, especialmente las pequeñas y activas, seguían trayectos curvos o espirales, a veces muy complicados y de longitud relativamente grande, hasta de 2 a 3 cm (fig. 44). El sentido de rotación era el del reloj o el inverso. Después de recorrer una distancia variable, una colonia se aproximaba al centro de su curso espiral, disminuyendo rápidamente el radio, cesaba de migrar, comenzaba a girar alrededor de su centro, perdía su forma alargada y alcanzaba un tamaño de varias veces la anchura del rastro a cuyo término se constituía.

Murray y Elder (1949) comprobaron que agregados pululantes de *Bacillus circulans, B. alvei* y *B. sphaericus* var. *rotans* no se movían a la ventura, sino que la mayoría de las colonias giraban en sentido inverso al de avance del reloj, a razón de 2:1 (tabla 5). Estos autores creían que

la pululación traducía movilidad en circunstancias especiales de restricción. Si esto es cierto, la tendencia a moverse en curvas regulares puede ser una propiedad inherente a los microorganismos, no advertida al estudiar la movilidad de células sueltas.

TABLA 5. — DIRECCIÓN DE ROTACIÓN DE LAS COLONIAS

Microorganismo	Según el reloj		Contra el reloj	
	Número observado	%	Número observado	%
B. circulans.	278	33,3	559	66,7
B. alvei	71	32,0	156	68,0
B. sphaericus, var. *rotans* . . .	57	34,5	108	65,5

Véanse otros informes en Lominski y Lendrum (1947), Stuart, Wheeler, McGann y Howard (1946).

Esporas. Las esporas son cuerpos resistentes, producidos dentro de las células de un considerable número de especies bacterianas.

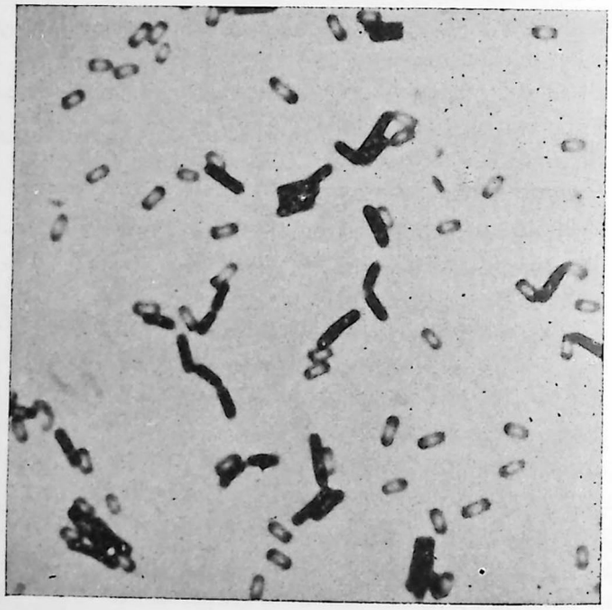


Fig. 45. — Células vegetativas y esporas de *Bacillus subtilis.* Cultivo de 48 horas.

La formación de esporas se limita casi en absoluto a dos géneros de bacterias bacilares, a saber, *Bacillus* (aerobio) y *Clostridium* (anaerobio). Ninguna de las bacterias esféricas comunes muestran esporulación; es posible privar a algunas especies esporíparas de su propiedad de producir esporas (asporógenas). Una vez perdida esta facultad, rara vez la

recobran. La esporulación no significa aumento del número de bacterias, pues sólo excepcionalmente una célula engendra más de una espora.

Las esporas son más resistentes a las condiciones adversas del medio — calor, frío, desecación, osmosis y agentes químicos — que las células vegetativas que las producen. Por eso sirven para mantener viva una especie, incluso durante muchos años.

A pesar de que las esporas bacterianas han sido objeto de investigación casi desde el principio de la Bacteriología, aun no son unánimes los pareceres respecto a sus funciones o a los factores que intervienen en su formación. No pocas veces se han hecho con una gran variedad de especies dos observaciones que autorizan a generalizar: 1.ª, las condiciones óptimas para que se produzca esporulación son similares a las de desarrollo de las células vegetativas; 2.ª, la esporulación comienza después de la fase logarítmica o período de desarrollo vegetativo más rápido. Estos hechos son contrarios a la extendida idea de que las esporas se producen cuando el ambiente se vuelve demasiado desfavorable para la existencia de las formas vegetativas.

Al parecer, el primer signo que precede a la aparición de una espora es el cese de la reproducción. El citoplasma de la célula se llena de vacuolas y gránulos; éstos se agrandan gradualmente y se hacen más refringentes. A medida que se desarrolla la espora, la refringencia aumenta, y disminuye, en cambio, la permeabilidad de la membrana esporular a los colorantes. La membrana de una espora plenamente desarrollada se tiñe débilmente por los métodos usuales de coloración (fig. 45).

Klieneberger-Nobel (1945) estudiaron las alteraciones de la estructura nuclear de bacterias durante la formación de esporas, utilizando la técnica de Feulgen. Los cambios nucleares en los microorganismos esporíferos *Bacillus mycoides, Clostridium perfringens, Cl. septicum* y *Cl. oedematiens* var. *gigas* se reproducen bosquejadas en la figura 46. Los cuerpos biloculares dispersos en células jóvenes (1) se alinean en el eje mayor de la célula (2), donde eventualmente se funden para formar un cilindro nuclear axial (3, 4). Estas células se disocian en otras de fusión, aproximadamente de igual longitud (5). El desarrollo de la fase cromosomática (1) hasta la célula de fusión (5) constituye el primer

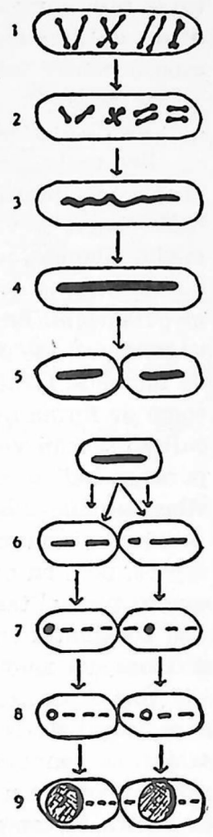


Fig. 46. — Bosquejo de los cambios de la estructura nuclear de *Bacillus mucoides, Clostridium perfringens, Cl. septicum* y *Cl. oedematiens* var. *gigas,* durante la formación de esporas. (Según Klieneberger-Nobel.)

paso en el proceso de esporulación; más tarde, la célula de fusión o espora madre se divide dos veces (6, 7), segregándose en cuatro estructuras que a menudo adoptan una configuración bilocular o de palanqueta de gimnasia. Por consiguiente, el cilindro de cromatina de cada espora madre parece ser equivalente a cuatro elementos nucleares, uno de los cuales funciona como cromosoma o núcleo de las esporas, en tanto que los otros tres se disgregan (8, 9).

Por regla general, cada especie de bacilo esporíparo tiene su espora propia, de dimensiones, forma y posición características; pero esto se halla sujeto a variaciones considerables en diferentes condiciones del medio. Bayne-Jones y Petrilli (1933), y otros autores, han dado cifras que indican el grado de variación de tamaño de las esporas de *Bacillus megatherium*. En párrafos anteriores hemos indicado ya que las células vegetativas que producen esporas pueden ofrecer también gran variedad de tamaños. Generalmente se describen las esporas del *B. megatherium* como de forma ovoide, con los extremos escuadrados, pero en un mismo cultivo se han visto igualmente formas esféricas y arriñonadas. Las esporas se hallan en el centro de las células o en los extremos, o cerca de ellas, aunque sobre esto puede haber también diferencias en el cultivo de una misma bacteria. Cada célula produce normalmente una sola espora, pero en ocasiones se presentan dos. En conclusión podemos decir que, si bien el tamaño, la forma, la posición y el número de esporas son casi constantes en una bacteria, se producen cambios al variar las condiciones del medio.

Una espora completamente desarrollada alcanza a veces un diámetro superior al de la célula vegetativa. Las formas resistentes, si son centrales, se conocen por clostridios, y por plectridios si son terminales; estas esporas son corrientes entre las bacterias anaerobias. Al alcanzar la espora su completa madurez, el esporangio degenera gradualmente y desaparece por último, dejando la espora desnuda.

Se sabe muy poco acerca de la composición de las esporas. En general se admite que su gran resistencia proviene de que contienen poca agua; la temperatura necesaria para coagular el protoplasma aumenta, como es notorio, a medida que disminuye la hidratación. Henry y Friedman (1937), y Friedman y Henry (1938), señalaron que la humedad de las esporas viene a ser la misma de las células vegetativas de donde proceden; pero que las esporas fijan el agua bastante más que tales células. Estos autores enunciaban la teoría de que la termorresistencia mayor de las esporas bacterianas deriva, al menos en parte, de su proporción relativamente elevada de agua combinada. Las esporas contienen lipoides en abundancia, y esto es probablemente lo que más aumenta su impermeabilidad a los colorantes y otras substancias.

Véase más información en Davis y Williams (1952).

Formación de esporas. Knaysi (1945 *b*, *c*) ha estudiado en una raza de *B. mycoides* diversos factores de ambiente que influyen en la producción de esporas, e informa así:

1. La acumulación de los subproductos ácidos del metabolismo de la glucosa tiende a inhibir la esporulación. Podría necesitarse oxígeno para la formación de esporas, pero su principal efecto es aumentar la rapidez del metabolismo y el grado de consumo de substancias nutritivas. Como los productos finales estaban más oxidados, disminuyó la acumulación de subproductos y se intensificó al mismo tiempo la esporulación.
2. Aunque se forman esporas dentro de una escala de pH relativamente amplia, el punto óptimo resultó hallarse entre 6,6 y 6,8.
3. La vitamina B_1 estimula la esporulación en agar glucosa inclinado, pero no produce efecto sobre el agar nutritivo sin azúcar. Esta vitamina aumenta el ritmo de descarboxilación de los subproductos ácidos.
4. La desecación gradual no influye en la esporulación, a menos de alterar el crecimiento y la disponibilidad de substancias nutrivas; en general, con la sequedad disminuye la esporulación.
5. Suspendiendo células vegetativas en agua destilada aumenta la esporulación de las que están intactas.

Knaysi deduce de sus investigaciones que las esporas de esta raza de *B. mycoides* se forman con facilidad máxima por células sanas amenazadas de inanición en presencia de oxígeno.

Roberts y Baldwin (1942) informan que el *B. subtilis* esporula con más profusión en peptona cuando se añade al medio una pequeña cantidad de carbón vegetal activado. La proporción de células en estado de espora es independiente de la concentración de la solución de peptona en tratamiento. Estos autores sugieren que la formación de esporas en agua de peptona es inversamente proporcional a algún factor nutritivo particular, o a varios, o bien a un agente que inhiba de modo directo el proceso de esporulación. La proporción de células esporógenas puede aumentarse adsorbiendo el substrato en caolín, hidróxido férrico o hidróxido de aluminio; la adsorción más eficaz en carbón vegetal se desarrolla con pH de 3 a 5. Foster, Hardwick y Guirard (1950) comunican resultados análogos, y han comprobado que el tratamiento de varios medios orgánicos complejos en carbón vegetal activado o almidón soluble provoca aumentos notables de desarrollo y de esporulación, por eliminar substancias auxostáticas.

Foster y Heiligman (1949 *a*) inocularon *B. cereus* en un medio sintético que contenía glutamato y observaron que el microorganismo crecía bien, pero sin esporular apenas. La adición de glucosa al 0,1-0,2 % al medio acarreó una esporulación profusa, con escaso aumento del desarrollo; y la de 2 a 4 mg de *dl*-alanina por milímetro al substrato de glutamato glucosado detuvo la esporulación, sin alterar el crecimiento. Pequeñas cantidades de productos naturales complejos (extracto de levadura, agua de maíz, extracto hepático, infusión reciente de carne de

vaca, sangre, zumos vegetales, etc.) contienen una o varias substancias que invierten la inhibición por alanina y restablecen una esporulación intensa. Estos autores opinan que el proceso de esporulación consiste en una serie continuada de reacciones bioquímicas agregadas, indepen-

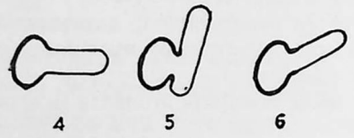


Fig. 47. — Germinación ecuatorial sin partición a lo largo del eje transversal. (Según Lamanna.)

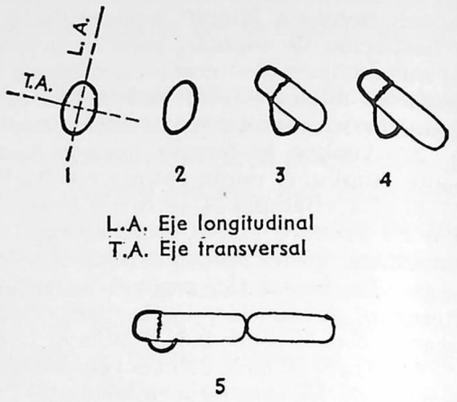


Fig. 48. — Germinación ecuatorial con partición a lo largo del eje transversal. (Según Lamanna.)

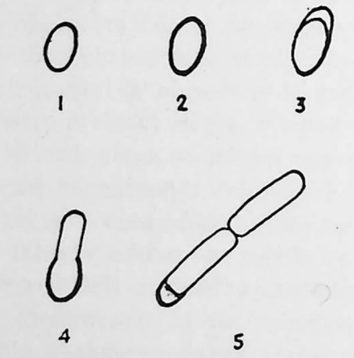


Fig. 49. — Germinación polar. (Según Lamanna.)

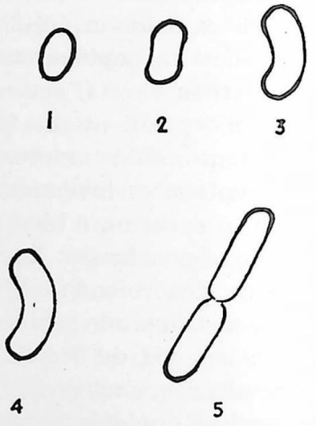


Fig. 50. — Germinación de una espora por crecimiento en forma de coma. (Según Lamanna.)

dientes del crecimiento vegetativo, y que pueden interrumpirse en ciertas etapas propicias. También parece comprobado que la esporogenia es independiente del desarrollo, y que éste puede ser amplio, suficiente o mísero, sin producción de esporas. En un informe posterior (1949 *b*) manifiestan que el ion potasio era el principal factor indispensable para la esporulación en medios asporogénicos; lo mismo puede aplicarse a otros iones, como los de magnesio y hierro.

Smith, Beck y Anderson (1949) observaron que un extracto etéreo de polen incorporado a un medio que contenía peptona, extracto de levadura, fosfato y extracto de zanahoria, estimulaba en 10 a 50 % la producción de esporas.

Hardwick, Guirard y Foster informan que fracciones de ácidos grasos obtenidas de una peptona del comercio detenían la esporulación de especies aerobias en un medio sintético. En este aspecto se distinguen varios conocidos ácidos grasos saturados puros, como el cáprico, el láurico y el mirístico.

Puede decirse, en resumen, que hace falta seguir estudiando a fin de determinar cuáles son las conducciones de ambiente necesarias para que se produzca esporulación.

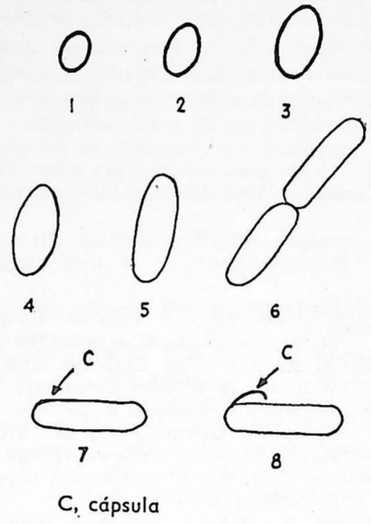


Fig. 51.—Germinación de una espora por absorción. (Según Lamanna.)

Germinación de esporas. Las esporas germinan de diversos modos, aunque algunas especies muestran una gran constancia en este sentido. Lamanna (1940) ha clasificado estas formas de germinación como sigue:

I. Germinación de esporas por desprendimiento de su cubierta. Las características de esta variante son:
   A) La espora no aumenta mucho de volumen antes de que la célula germinal rompa por completo la cubierta. El límite de esta dilatación de la espora puede considerarse el doble de su volumen original.
   B) La cubierta de la espora no pierde por completo su refringencia antes de la germinación.
   C) Después de la segunda división de la célula germinal, que produce una cadena de tres microorganismos, la primitiva cubierta de la espora, que permanece unida a las células, sigue siendo visible durante largo tiempo después de la germinación.
   1. Germinación ecuatorial (figs. 47 y 48).
   2. Germinación polar (fig. 49).
   3. Engrosamiento en forma de coma (fig. 50).

II. Germinación de esporas por absorción de su cubierta. Las características de esta variante son:
   A) La espora se dilata mucho durante la germinación, hasta triplicar, por lo menos, el volumen primitivo (fig. 51).
   B) Durante la germinación, la espora pierde su típica refringencia, por lo que es difícil determinar cuándo ha desaparecido la espora y aparece la célula germinativa.

C) Después de la segunda división de la célula, aunque persista al principio una delgada cápsula, desaparece todo vestigio de su cubierta.

Algunas razas que germinan por absorción, presentan regularmente una tenue cápsula remanente alrededor de uno de los extremos de la célula en desarrollo, lo cual semeja una germinación polar (fig. 51, 7); en otros casos se distinguen cápsulas ecuatoriales (fig. 51, 8). No obstante, se considera que la espora germina por absorción siempre que concurren las tres características de esta variante.

Véase más información sobre esporas en Curran (1952), Knaysi (1948, 1952), Lamanna (1952), Roth y Halvorson (1952) y Wynne (1952).

REFERENCIAS

Bayne-Jones, S., y A. Petrilli: Cytological changes during the formation of the endospore in *Bacillus megatherium*, *J. Bact.*, **25**: 261, 1933.

Bisset, K. A.: «The Cytology and Life History of Bacteria», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1950.

—: Genetic mechanisms in bacteria and bacterial viruses. II. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **16**: 373, 1951.

—: Bacterial cell envelopes, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 1953.

Boltjes, T. Y. K.: Function and arrangement of bacterial flagella, *J. Path. Bact.*, **60**: 275, 1948.

Brown, R.: A brief account of microscopical observations made in the months of June, July, and August, 1827, on the particles contained in pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies, *Phil. Mag. and Ann. of Philosophy, N. S.*, **4**: 161, 1828.

—: Additional remarks on active molecules, *ibíd.*, **6**: 161, 1829.

—: Brown's microscopical observations on the particles of bodies, *ibíd.*, **8**: 296, 1830.

Burdon, K. L.: Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations, *J. Bact.*, **52**: 665, 1946.

—, J. C. Stokes, y C. E. Kimbrough: Studies of the common aerobic sporeforming bacilli. I. Staining for fat with Sudan black B-safranine, *ibíd.*, **53**: 717, 1942.

Califano, L.: Nuclei ed acidi nucleinici nei bacteri, *Estratto delle publ. staz. zool. Napoli, supplemento*, **21**: 173, 1949.

Carlson, W. W., C. L. Rosano, y V. Whiteside-Carlson: Studies on the dextransucrase of *Leuconostoc dextranicum*, *J. Bact.*, **65**: 136, 1953.

Caselli, P.: Il comportamento del nucleo batterico nella lisi da lisozima, *Boll. soc. ital. di biol. sper.*, **23**: 1, 1947.

Cassel, W. A.: The use of perchloric acid in bacterial cytology, *J. Bact.*, **59**: 185, 1950.

Conn, F.: Untersuchungen über Bakterien, II. *Beitr. Biol. Pflanzen*, t. I, fasc. 3: 141, 1875.

Conn, H. J., y R. P. Elrod: Concerning flagellation and motility, *J. Bact.*, **54**: 681, 1947.

Curran, H. R.: Resistance in bacterial spores, *Bact. Rev.*, **16**: 111, 1952.

Davis, F. L. Jr., y O. B. Williams: Chromatographic analysis of the amino acid composition of bacterial spores, *J. Bact.*, **64**: 766, 1952.

De Robertis, E., y C. M. Franchi: Electron microscope observation on the fine structure of bacterial flagella, *Exp. Cell Research*, **2**: 295, 1951.

Duguid, J. P.: The demostration of bacterial capsules and slime, *J. Path. Bact.*, **63**: 673, 1951.

Evans, T. H., y H. Hibbert: Bacterial polysaccharides, *Report 6*, Nueva York, Sugar Research Foundation, Inc., 1947.

Forsyth, W. G. C., y D. M. Webley: The synthesis of polysaccharides by bacteria isolated from soil, *J. Gen. Microbiol.* **3**: 395, 1949*a*.

Forsyth, W. G. C., y D. M. Webley: Polysaccharides synthesized by aerobic mesophilic spore-forming bacteria, *Biochem. J.*, **44**: 455, 1949*b*.

Foster, J. W. W. A. Hardwick, y B. Guirard: Antisporulation factors in complex organic media. I., *J. Bact.*, **59**: 463, 1950.

— y F. Heiligman: Biochemical factors influencing sporulation in a strain of *Bacillus cereus*, *ibíd.*, **57**: 639, 1949*a*.

— y —: Mineral deficiencies in complex organic media as limiting factors in sporulation of aerobic bacilli, *ibíd.*, **57**: 613, 1949*b*.

Friedman, C. A., y B. S. Henry: Bound water content of vegetative and spore forms of bacteria, *J. Bact.*, **36**: 99, 1938.

Giglio, D. M., y C. S. McCleskey: The fermentation of sucrose by *Leuconostoc mesenteroides*, *J. Bact.*, **65**: 75, 1953.

Hardwick, W. A., B. Guirard, y J. W. Foster: Anti-sporulation factors in complex organic media, *J. Bact.*, **61**: 145, 1951.

Hehre, E. J.: Dextran-forming streptococci from the blood in subacute endocarditis and from the throats of healthy persons, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **24**: 543, 1948.

— y D. M. Hamilton: Bacterial synthesis of an amylopectin-like polysaccharide from sucrose, *J. Biol, Chem*, **166**: 777, 1946.

— y —: The conversion of sucrose to a polysaccharide of the starchglycogen class by *Neisseria* from the pharynx, *J. Bact.*, **55**: 197, 1948.

— y —: Bacterial conversion of dextrin into a polysaccharide with the serological properties of dextran, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**: 336, 1949.

— y J. M. Neill: Formation of serologically reactive dextrans by streptococci from subacute bacterial endocarditis, *J. Exp. Med.*, **83**: 147, 1946.

Henrici, A. T.: «Morphologic Variation and the Rate of Growth of Bacteria, «Springfield, Ill., Charles C. Thomas, Publisher, 1928.

Henry, B. S., y C. A. Friedman: The water content of bacterial spores, *J. Bact.*, **33**: 323, 1937.

Hofer, A. W.: Flagellation of *Azotobacter*, *J. Bact.*, **48**: 697, 1944.

Hoffman, H.: The cytochemistry of bacterial nuclear structures, *J. Bact.*, **62**: 561, 1951.

Houwink, A. L., y W. van Iterson: Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation, *Biochim et Biophys. Acta*, **5**: 10, 1950.

Järvi, O., y A. Levanto: On the structure of bacterial cells, as seen by the use of histochemical polysaccharide tests, *Acta Path.*, **27**: 473, 1950.

Jeanes, A., C. A. Wilham, y J. C. Miers: Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides*, *J. Biol. Chem.*, **176**: 603, 1948.

Klieneberger-Nobel, Emmy: Changes in the nuclear structure of bacteria, particularly during spore formation, *J. Hyg.* **44**: 99, 1945.

—: Capsules and mucoid envelopes of bacteria, *ibíd.*, **46**: 345, 1948.

Knaysi, G.: Cytology of bacteria, *Botan. Rev.*, **4**: 83, 1938.

—: Observations on the cell division of some yeasts and bacteria, *J. Bact.*, **41**: 141, 1941.

—: On the width and origin of bacterial flagella, *Science*, **95**: 406, 1942.

—: On the microscopic methods of measuring the dimensions of the bacterial cell, *J. Bact.*, **49**: 375, 1945*a*.

—: A study of some environmental factors which control endospore formation by a strain of *Bacillus mycoides*, *ibíd.*, **49**: 473, 1945*b*.

—: Investigation of the existence and nature of reserve material in the endospore of a strain of *Bacillus mycoides* by an indirect method, *ibíd.*, **49**: 617, 1945*c*.

—: On the existence, morphology, nature, and functions of the cytoplasmic membrane in the bacterial cell, *ibíd.*, **51**: 113, 1946*a*.

—: Further observations on the nuclear material of the bacterial cell, *ibíd.*, **51**: 177, 1946*b*.

—: The endospore of bacteria, *Bact. Rev.*, **12**: 19, 1948.

—: «Elements of Bacterial Cytology», Ithaca, N. Y., Comstock Publishing Company, Inc., 1951.

—: The cytology of sporulation, *Bact. Rev.*, **16**: 93, 1952.

Knaysi, G. y R. F. Baker: Demonstration, with the electron microscope, of a nucleus in *Bacillus mycoides* grown in a nitrogen-free medium, *J. Bact.*, **53**: 539, 1947.
Lamanna, C.: The taxonomy of the genus *Bacillus*. I. Modes of spore germination, *J. Bact.*, **40**: 347, 1940.
—: Biological role of spores, *Bact. Rev.*, **16**: 90, 1952.
Lankford, C. E., H. Hoyo, y J. F. Lutteringer: Intracellular polysaccharide of *Enterobacteriaceae*, *J. Bact.*, **62**: 621, 1951.
Lederberg, J.: Problems in microbial genetics, *Heredity*, **2**: 145, 1948.
Leifson, E.: Staining, shape, and arrangement of bacterial flagella, *J. Bact.*, **62**: 377, 1951.
— y R. Hugh: Variation in shape and arrangement of bacterial flagella, *J. Bact.*, **65**: 263, 1953.
Lewis, I. M.: The cytology of bacteria, *Bact. Rev.*, **5**: 181, 1941.
Lominski, I., y A. C. Lendrum: The mechanism of swarming of *Proteus*, *J. Path. Bact.*, **59**: 688, 1947.
Luria, S. E., y M. L. Human: Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection, *J. Bact.*, **59**: 551, 1950.
McCleskey, C. S., L. W. Faville y R. O. Barnett: Characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* from cane juici, *J. Bact.*, **54**: 697, 1947.
Murray, R. G. E., y R. H. Elder: The predominance of counterclockwise rotation during swarming of *Bacillus species*, *J. Bact.*, **58**: 351, 1949.
— y C. F. Robinow: A demonstration of the disposition of the cell wall of *Bacillus cereus*, *ibíd.*, **63**: 298, 1952.
Muto, T.: Ein eigentümlicher *Bacillus* welcher sich schneckenartig bewegend Kolonien bildet (*B. helixoides*), *Centr. Bakt.*, Orig., **37**: 321, 1904.
Orskov, J.: Method for the demostration of bacterial flagellum activity, *Acta Path.*, **24**: 181, 1947.
Pennington, D.: The use of periodate in microbiological staining, *J. Bact.*, **57**: 163, 1949.
Pijper, A.: Shape and motility of bacteria, *J. Path. Bact.*, **58**: 325, 1946.
—: A motion picure of models of motile bacteria, *J. Biol. Photo. Assoc.*, **16**: 3, 1947*a*.
—: Methylcellulose and bacterial motility, *J. Bact.*, **53**: 257, 1947*b*.
—: Bacterial flagella, *Photo, J.*, **88B**: 2, 1948.
—: The flagella of *Spirillum volutans*, *J. Bact.*, **57**: 111, 1949*a*.
—: Zur Frage der Bakteriengeisseln, *Schweiz. Path. u. Bakteriol.*, **12**: 681, 1949*b*.
—: Evidence that amputation of bacterial flagella does not affect motility, *Science*, **109**: 379, 1949*c*.
— y A. J. Nunn: Flagella and motility of *Vibrio metschnikovii*, *J. Roy. Microscop. Soc.*, **69**: 138, 1949.
—: Evidence that amputation of bacterial flagella does not affect motility, *Science*, **109**: 379, 1949*c*.
Roberts, J. L., y I. L. Baldwin: Spore formation by *Bacillus subtilis* in peptone solutions altered by treatment with activated charcoal, *J. Bact.*, **44**: 653, 1942.
Robinow, C. F.: Cytological observations on *Bact. coli*, *Proteus vulgaris*, and various aerobic spore-forming bacteria with special reference to the nuclear structures, *J. Hyg.*, **43**: 413, 1944.
— y R. G. E. Murray: The differentiation of cell wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of Gram positive bacteria by selective staining. *Exptl. Cell Research*, **4**: 390, 1953.
Roth, N. G., y H. O. Halvorson: The effect of oxidative rancidity in unsaturated fatty acids on the germination of bacterial spores, *J. Bact.*, **63**: 429, 1952.
Salton, M. R. J., y R. W. Horne: Studies of the bacterial cell wall. I. Electron microscopical observations on heated bacteria, *Biochim. et Biophys. Acta*, **7**: 19, 1951*a*; II. Methods of preparation and some properties of cell walls, *ibíd.*, **7**: 177, 1951*b*.
Scaletti, J. V., R. C. Cleverdon, y E. H. Newcomer: Orcein stain for bacterial chromatinic material, *J. Bact.*, **64**: 183, 1952.

Scarr, M. P.: Production of polysaccharides, *Intern. Sugar J.*, p. 300, September, 1950.
Shinn, L. E.: A cinematographic analysis of the motion of colonies of *B. alvei*, J. Bact., **36**: 419, 1938.
Smith, A. G.: Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei, *J. Bact.*, **59**: 575, 1950.
Smith, N. R., y F. E. Clark: Motile colonies of *Bacillus alvei* and other bacteria, *J. Bact.*, **35**: 59, 1938.
Smith, R. L., J. V. Beck y E. J. Anderson: The effect of pollen on the sporulation of *Bacillus larvae* (White), *J. Bact.*, **57**: 213, 1949.
Spray, R. S.: The granulose reaction of certain anaerobes of the «butyric» group, *J. Bact.*, **55**: 79, 1948.
Starr, M. P., y R. C. Williams: Helical fine structure of flagella of a motile diphtheroid, *J. Bact.*, **63**: 701, 1952.
Strandskov, F. B.: Slime-forming bacteria, *J. Am. Water Works Assoc.*, **40**: 1299, 1948.
Stuart, C. A., K. M. Wheeler, V. McGann, y I. Howard: Motiliy and swarming of some *Enterobacteriaceae*, *J. Bact.*, **52**: 519, 1946.
Thjotta, T., y E. Kass: Pseudo-flagella in bacteria, *Acta Path.*, **23**: 215, 1946.
Turner, A. W., y C. E. Eales: An aerobic, sporulating bacillus that forms rotating and migrating colonies, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **19**: 161, 1941*a*.
— y —: Motile daughter colonies in the *Cl. oedematiens* group and some other clostridia (*Cl. botulinum C*, *Cl. tetani*, *Cl. septicum*), *ibíd.*, **19**: 167, 1941*b*.
Van Iterson, W.: Some electron-microscopical observations on bacterial cytology, *Biochim. et Biophys. Acta*, **1**: 527, 1947.
Weibull, C.: Some chemical and physicochemical properties of the flagella of *Proteus vulgaris*, *Biochim. et Biophys. Acta*, **2**: 351, 1948.
—: Chemical and physicochemical properties of the flagella of *Proteus vulgaris* and *Bacillus subtilis*, a comparison, *ibíd.*, **3**: 378, 1949.
—: Movement of bacterial flagella, *Nature*, **167**: 511, 1951.
Whiteside-Carlson, V., y W. W. Carlson: Studies of the effect of para-aminobenzoic acid, folic acid, and sulfanilamide on dextran synthesis by *Leuconostoc*, *J. Bact.*, **58**: 143, 1949*a*.
— y —: The vitamin requirements of *Leuconostoc* for dextran synthesis, *ibíd.*, **58**: 135, 1949*b*.
Wynne, E. S.: Some physiological aspects of bacterial spore formation and spore germination, *Bact. Rev.*, **16**: 101, 1952.

CAPÍTULO V

LEVADURAS O FERMENTOS

Los fermentos o levaduras son hongos ascomicetos esféricos, ovoides o bacilares, y en ellos domina habitualmente la forma de desarrollo unicelular (fig. 52). Están muy difundidos en la Naturaleza y se encuentran en el suelo, el polvo, los frutos y las hojas de muchas plantas; son especialmente numerosos en el terreno de huertos y viñedos. Las levaduras se presentan en forma de espuma superficial o de sedimento espeso en zumos de frutas, mostos de cerveza y otros líquidos azucarados.

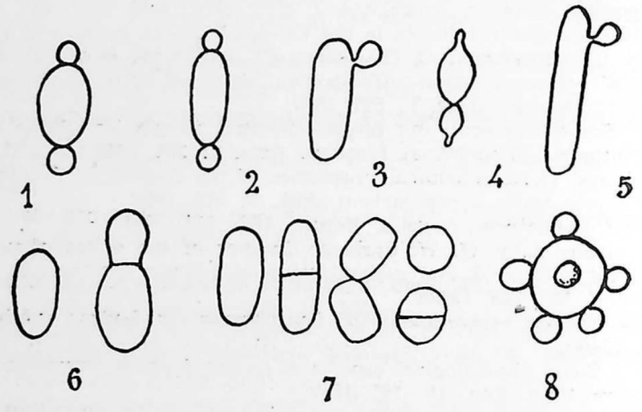


Fig. 52. — Tipos diversos de células de levaduras. 1. *Saccharomyces cerevisiae*; 2, *S. ellipsoideus*; 3, *S. pastorianus*; 4, *S. apicule*; 5, *Mycoderma*; 6, *Saccharomycodes*; 7, *Schizosaccharomyces*; 8, *Torula*. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la determination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

En determinadas condiciones, las levaduras se pueden reproducir por alargamiento de sus células, formando estructuras con aspecto de micelio, pero nunca parecidas a hongos verdaderos (fig. 66 *B*); en este sentido se diferencian de los mohos que desarrollan micelios. Por otra parte, numerosos mohos crecen temporalmente como simples células y toman la apariencia de fermentos; muchos del género *Mucor* evolucionan así y son capaces de germinar a tensiones reducidas de oxígeno. Los microorganismos productores de la esporotricosis, el granuloma coccidioides y la blastomicosis aparecen como células independientes en los tejidos del huésped, mientras que los micelios se encuentran en medios de cultivo artificiales. Algunas especies de *Monilia* crecen como simples células en medios artificiales, pero con bajas tensiones de oxígeno desarrollan micelios (condiciones parcialmente anaeróbicas).

El dimorfismo que ofrecen los mohos ha inducido a algunos investigadores a suponer que los fermentos eran en algún tiempo como los mohos y han perdido luego de modo permanente la facultad de producir micelios. Fuchs (1926) cultivó el moho *Aspergillus oryzae* a tensión reducida de oxígeno y observó que de los conidios sumergidos en el medio se desarrollaban células parecidas a levaduras, a la vez que se producía una débil fermentación y se formaba alcohol etílico. Las células no se restituían a la fase micélica, sino que continuaron desarrollándose como levaduras aun en condiciones aeróbicas.

CITOLOGÍA DE LAS LEVADURAS

El examen de los fermentos al microscopio revela la presencia de una membrana o pared celular, un núcleo relativamente grande con una o más vacuolas, y varios gránulos.

Membrana celular. Cada célula está limitada por una delicada membrana, relativamente delgada en las jóvenes y de espesor creciente en las más maduras. Esta membrana se compone, en su mayor parte, de un carbohidrato conocido por celulosa de levadura, distinta de la celulosa contenida en las membranas celulares de vegetales superiores.

La quitina es un compuesto nitrogenado muy afín a los polisacáridos. En las plantas ocupa con frecuencia, dentro de la estructura celular, una posición análoga a la de la celulosa; químicamente es una glucosamina acetilada y polimerizada.

Existe quitina en la membrana celular de mohos, en el caparazón de crustáceos y en los élitros de coleópteros. Roelofsen y Hoette (1951) informaron sobre la presencia de quitina en 29 de 30 especies de levaduras examinadas. Todavía no está asegurado que la contengan las membranas celulares de bacterias.

Métodos especiales de coloración revelan que la membrana celular envuelve otra membrana citoplasmática, cuya función es la misma que desempeña en las células bacterianas (pág. 71). Se supone que sirve de capa semipermeable selectiva y determina en consecuencia qué substancias pueden penetrar en la célula o salir de ella.

Cápsulas. Se ha demostrado que las paredes celulares de algunos fermentos se hallan rodeadas de un carbohidrato similar al de las cápsulas bacterianas. Mager (1947) aisló dos carbohidratos de levaduras encapsuladas, en particular de *Torulopsis rotundata* y *T. neoformans*;

uno de ellos resultó ser una cimohexosa, y la otra una pentosana. La hexosa de la cimohexosa era glucosa, y la pentosa de la pentosana, *d*-xilosa.

Núcleo. Las células de los fermentos difieren de las auténticas bacterias en que suelen ser mucho mayores y poseen núcleo bien definido. El núcleo es generalmente redondo, a veces arriñonado por la compresión que ejerce una vacuola contigua, y se halla próximo al centro de la célula; es difícil verlo en preparaciones de gota pendiente, pero puede observarse en frotis teñidos. Algunos autores atribuyen al núcleo la facultad de movimiento ameboideo a través del citoplasma, fenómeno apreciado durante el proceso de gemación; iniciada la formación de la yema, el núcleo emigra hacia ese lado de la célula y comienza a alargarse en forma de halterio, hasta introducir un extremo en la yema. Finalmente, esta porción se separa del núcleo primitivo, y así se forman dos, el de la célula madre y el de la yema. Algunas observaciones confirman el aserto de que en la gemación, como en la esporulación, el núcleo se divide por mitosis, igual que en organismos superiores.

Está perfectamente demostrado que el núcleo de las levaduras y de organismos más complicados contiene abundante núcleoproteína, compuesto de elevado peso molecular, que consiste en ácido nucleico en combinación con una proteína. Como el ácido nucleico tiene carácter ácido, se combina con una proteína básica, probablemente histona o protamina. Las protaminas son proteínas derivadas de un corto número de aminoácidos, principalmente de los aminoácidos arginina, lisina e histidina, en los que predomina el carácter básico. Las histonas son similares a las protaminas, pero en ellas es menor la concentración de tales aminoácidos. Por hidrólisis, la porción de ácido nucleico de la molécula cede cuatro moléculas de ácido fosfórico, cuatro moléculas de un azúcar, dos moléculas de bases purínicas y dos moléculas de bases pirimidínicas (pág. 690).

De células vivas se han aislado dos tipos de ácido nucleico, los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico. Se tienen bastantes pruebas de que ambos existen en el núcleo y en ciertos gránulos del citoplasma; sin embargo, en el primero predomina el ácido desoxirribonucleico, y en el citoplasma, el ácido ribonucleico.

Vacuolas. Las vacuolas son cavidades del protoplasma, características de las células vegetales y los protozoos, aunque también se encuentran en células de animales superiores. Las vacuolas de células vegetales contienen un líquido o jugo celular que es comúnmente una solución acuosa de diversos ácidos orgánicos y de sus sales; las de los protozoos contienen a veces secreciones protoplasmáticas o substancias a punto de ser eliminadas, o bien partículas alimenticias en diversas fases de digestión y asimilación.

Gránulos. El contenido celular de las levaduras está mucho mejor diferenciado que el de las bacterias. Las células jóvenes tienen la pared muy delgada y el citoplasma relativamente homogéneo; a medida que envejecen van apareciendo gránulos y vacuolas. Los gránulos de las células de fermentos son metacromáticos y consisten en volutina, glucógeno y grasa.

Gránulos metacromáticos. Los gránulos metacromáticos o de volutina están ampliamente distribuídos entre los hongos y constituyen los elementos de más importancia encontrados en las levaduras. Se localizan casi exclusivamente en las vacuolas celulares, y también hay algunos en el citoplasma que las rodea; probablemente se originan en éste y pasan luego a las vacuolas. En células ya viejas, los gránulos metacromáticos pueden aparecer en número relativamente grande. Se presentan como cuerpos refringentes en preparaciones sin teñir y muestran una gran afinidad por el azul de metileno y otros colorantes básicos, lo cual indica su carácter ácido.

Estos gránulos se componen de ácido nucleico, libre o combinado con proteínas básicas o bases orgánicas. Parece demostrado que contienen ácido ribonucleico, a diferencia del ácido desoxirribonucleico del núcleo (página 690) y se cree que sirven de substancia alimenticia de reserva para la célula. Abundan sobre todo en las células viejas; en cultivos recientes es tal la actividad de las células, que en ellas puede acumularse muy poca volutina, mientras que al envejecer y hacerse menos activas aparecen en ellas los gránulos. Cuando estas células cargadas de volutina se trasladan a un nuevo medio, los gránulos desaparecen, para no hacerse visibles hasta que envejecen otra vez aquéllas.

Véase más información en Lindegren (1948).

Glucógeno. El glucógeno es un carbohidrato blanco amorfo, afín al almidón y la dextrina. Se hidroliza a glucosa por ebullición con ácidos minerales diluidos y también por la acción de enzimas amilolíticas. El glucógeno se reconoce fácilmente por el color pardo que toma al agregarle una solución diluida de yodo; este color desaparece calentando la solución a 60°C, y vuelve a aparecer cuando se enfría.

Se ha comprobado que el glucógeno abunda en células bien nutridas de levaduras y se agota cuando éstas se desnutren. La concentración aumenta al envejecer y alcanza su máximo a las 48 horas; disminuye gradualmente y acaba desapareciendo por completo hacia el final de la fermentación. El glucógeno suele localizarse en vacuolas distintas de las que contienen gránulos metacromáticos; se acumula en las ascas durante la esporulación y es absorbido por las esporas en el curso de su madurez.

Glóbulos de grasa. Todo el citoplasma de las células de levadura contiene glóbulos de grasa dispersos, que se tiñen de pardo con ácido

ósmico. Se hacen abundantes en estas células durante la esporulación y sirven de alimento a las ascosporas; están considerados como substancias nutritivas de reserva.

White y Werkman (1948) exponen las siguientes condiciones en que pueden conseguirse aumentos relativamente grandes y reproducibles del contenido en grasa de células de *Saccharomyces cerevisiae*:

1. Se cultivaron células en un medio apropiado, a 30°C, durante 24 horas.
2. Se recogieron células por medio de una centrífuga de Sharples y se suspendieron en una solución atemperante o tope de fosfato con pH 7,0, la cual contenía acetato. Las células cesaron de proliferar.
3. Se aireó durante 24 horas la suspensión de células no proliferantes; en este lapso el acetato se convirtió en grasa y se almacenó en las células.

MULTIPLICACIÓN DE LAS LEVADURAS

Los fermentos o levaduras se multiplican por gemación, por escisión, por formación de esporas asexuadas y por copulación o reproducción sexual. Sin embargo, la forma más corriente es la gemación; a veces se originan clamidosporas, células de paredes gruesas. Como cada célula produce sólo una espora, no es éste un medio de aumentar el número de células de levaduras, sino simplemente de perpetuar la especie.

Gemación. En casi todas las levaduras, las células se reproducen por gemación, al alcanzar el microorganismo un determinado tamaño. La yema aparece como una pequeña prominencia, separada de la célula madre por una fuerte constricción de la membrana, y aumenta gradualmente de proporciones hasta que termina por separarse de aquélla; por lo regular, nunca llega a alcanzar el tamaño de la célula original. Durante períodos de división activa pueden formarse yemas en distintos puntos de la superficie celular; a veces, las células hijas dan asimismo yemas en varios puntos antes de separarse de la célula madre. De aquí resulta la formación de una pequeña colonia o una cadena de células de levadura.

Escisión transversal. Unas pocas especies de levaduras se reproducen por escisión transversal, en lo que se asemejan a las bacterias.

En el *Schizosaccharomyces octosporus*, las células, redondeadas u ovaladas, se alargan hasta cierto punto y forman luego un tabique; las dos células resultantes se separan y se redondean sus extremos. Cuando estas células alcanzan la madurez se alargan, y el ciclo se repite. Durante períodos de multiplicación rápida, las células se dividen sin separarse y forman igualmente tabiques transversales; así se produce una cadena de células, a modo de micelio, que finalmente se desprende (fig. 53).

En el género *Saccharomyces* se observa una forma de división intermedia entre la gemación y la escisión. Generalmente se producen yemas en los extremos de las células; éstas se alargan primero y emiten un tubo terminal, que se agranda y transforma lentamente en yema, unida

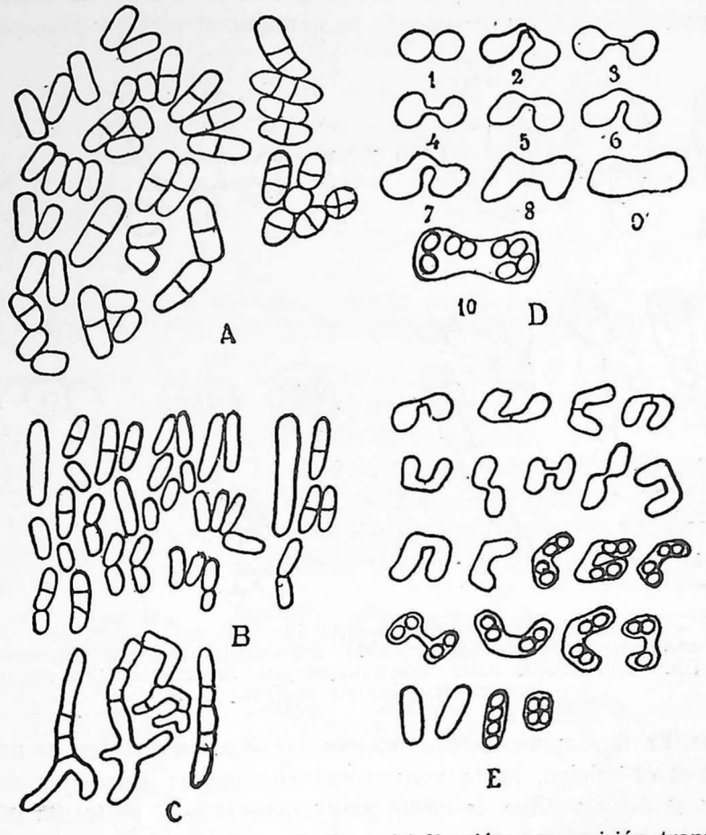


Fig. 53. — *Schizosaccharomyces*. *A*, *B*, multiplicación por escisión transversal; *C*, crecimiento micélico; *D*, *E*, formación de ascas por copulación isogámica. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

aún a la célula por un gollete (fig. 64). Por último, se forma una membrana que separa la yema de la célula.

Formación de esporas asexuadas. Aun cuando la gemación es el método usual de multiplicarse las levaduras, por ese método no se perpetúan las especies. Esto se consigue mediante la producción de esporas, formas de resistencia que permiten a las células permanecer viables después de cesar la gemación. Puede observarse la esporulación en cultivos viejos en que las condiciones del medio se han hecho adversas al desarrollo de células vegetativas; es posible que se formen ciertos

productos metabólicos capaces de trastornarlas de un modo ignorado, para retardar la gemación o la escisión y estimular la esporulación. Cuando el ambiente vuelve a ser favorable, las esporas dan origen a células vegetativas (fig. 54).

Las células de cada especie suelen producir un número determinado de esporas; las que las contienen se denominan ascas, y ascosporas sus

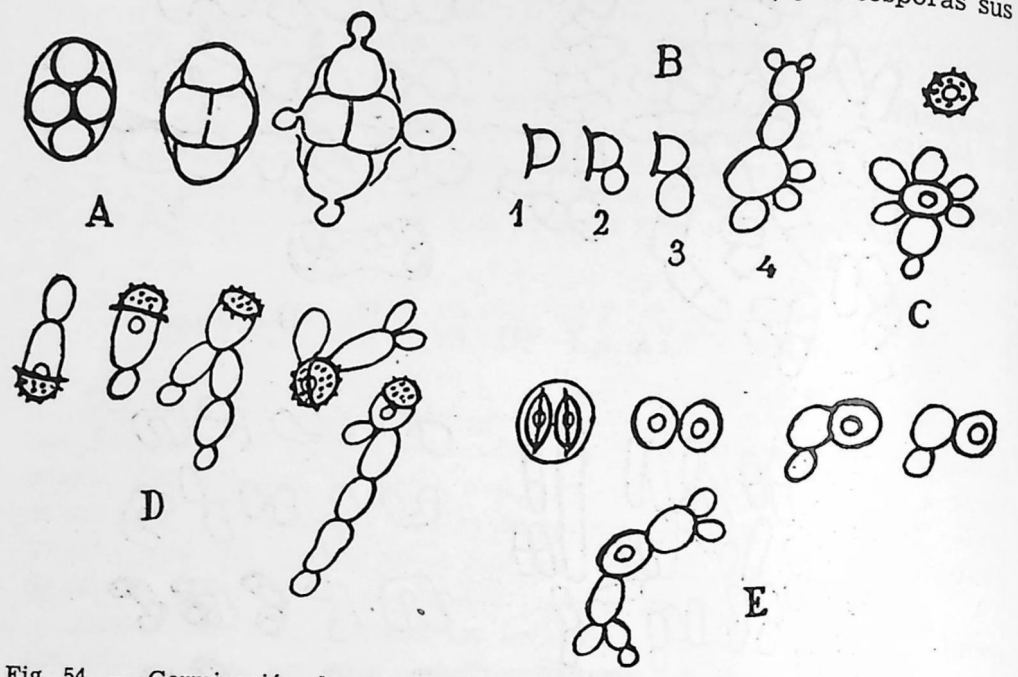


Fig. 54. — Germinación de ascosporas. A, *Saccharomyces cerevisiae*; B, *Hansenula anomala*; C, *Debaryomyces*; D, *Schwanniomyces*; E, *Hansenula saturnus*. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

alojadas. En la mayoría de las especies, las esporas resultan de dividirse dos veces el núcleo, hasta convertirse en cuatro; alrededor de estos núcleos se dispone algo de citoplasma, sobre el cual se forma la membrana envolvente. En otras especies, cada célula puede tener una, dos o más esporas, rara vez ocho.

Las esporas de levaduras asumen diversas formas, y ello permite reconocer fácilmente algunas especies. Suelen ser esféricas u ovoides (figura 55 *A*); así se encuentran en el *Saccharomyces cerevisiae*, levadura corriente del pan o la cerveza, y en otras especies menos conocidas. En la *Hansenula anomala* y en el género *Hanseniaspora*, las esporas son hemisféricas y sus superficies adyacentes presentan un borde que sobresale y les da apariencia de sombreros (fig. 55 *B*). En la especie *Pichia membranaefaciens* toman formas irregulares: ovoide, alargada, triangular, arriñonada o hemisférica (fig. 55 *C*). Las células de *Hansenula saturnus* producen esporas con aspecto de limón, rodeadas de un anillo saliente (fig. 55 *D*); las de *Schwanniomyces occidentalis* están asimismo

rodeadas de un anillo en relieve, y en la membrana se aprecian unas protuberancias duras y erectas (fig. 55 *E*), que también se observan en las esporas globulares de *Debaryomyces* (fig. 55 F). Otras formas se representan en la figura 55 *G, H, I*.

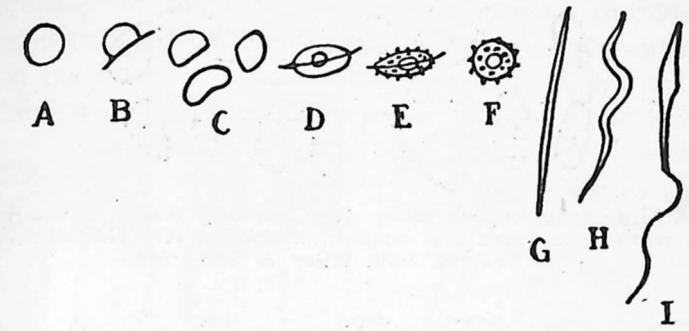


Fig. 55. — Diversos tipos de ascosporas. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour le détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Reproducción sexual. La multiplicación sexual se produce por copulación isogámica, copulación heterogámica, copulación intermedia entre isogamia y heterogamia y copulación de ascosporas.

Copulación isogámica. La copulación isogámica puede definirse como fusión de dos gametos similares. Guilliermond (1920) indicó que las ascas de *Schizosaccharomyces octosporus* resultan de la fusión de dos células; esta copulación se produce cuando las células cesan de multi-

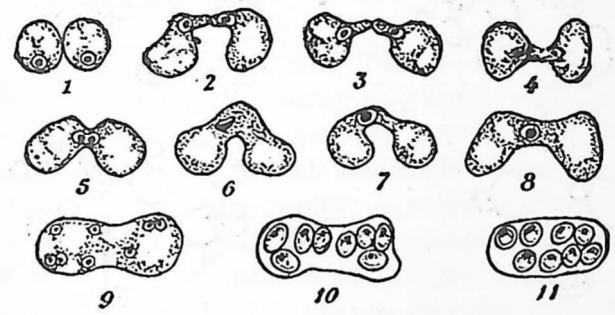


Fig. 56. — *Schizosaccharomyces octosporus*. Copulación isogámica de dos células para formar una asca con ocho ascosporas. (De Guilliermond-Tanner, «The Yeasts», John Wiley & Sons., Inc.)

plicarse. Dos células idénticas adyacentes en una colonia se unen por un conducto de copulación (fig. 56) y reciben entonces el nombre de gametos; no tarda en desaparecer la membrana que separa las dos células, y los respectivos núcleos atraviesan el mencionado conducto, con lo que se forma una célula única o cigospora. Ésta aumenta de tamaño, el núcleo se divide en cuatro u ocho corpúsculos, y sobre el citoplasma que los rodea se forma la membrana de la espora, que así se convierte en asca.

En el *S. pombe*, la copulación es igual que en el *S. octosporus*, excepto que la fusión suele permanecer incompleta. Intervienen dos células contiguas de la misma colonia: los gametos se unen mediante un conducto, por fusión de sus núcleos y protoplasmas; el núcleo resul-

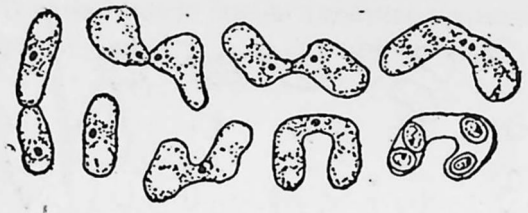


Fig. 57. — *Schizasoccharomyces pomb.* Copulación y fusión incompleta de dos células para formar una asca con cuatro ascosporas. (De Guilliermond-Tanner, «The Yeasts», John Wiley & Sons. Inc.)

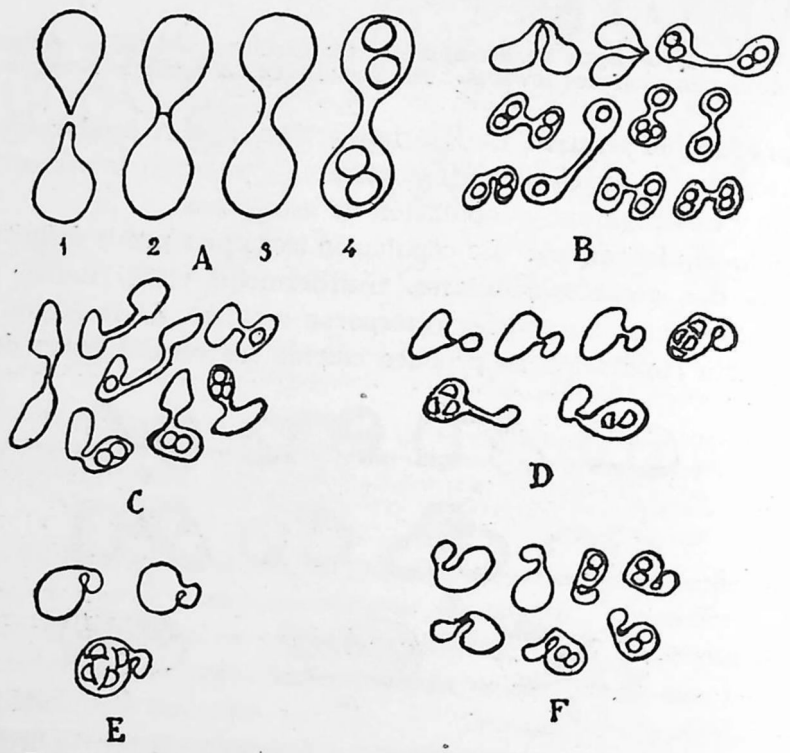


Fig. 58. — *Zygosaccharomyces. A, B,* asca producida por copulación isogámica; *D, E, F, asca* producida por copulación heterogámica; *C,* asca producida por copulación intermedia entre isogamia y heterogamia. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la déterminaton des levures», con licencia de Librairie le François, París).

tante se divide rápidamente, y los dos núcleos hijos emigran a las dos expansiones de la cigospora; allí experimentan una segunda división y se forman cuatro esporas. La cigospora se convierte así en asca, y las esporas en ascosporas (fig. 57).

Copulación heterogámica. La copulación heterogámica puede definirse como fusión de dos gametos desiguales. En algunas ocasiones se

fusiona una célula con una yema rudimentaria de ella misma; así se observa en la especie *Zygosaccharomyces priorianus*. El asca en desarrollo tiene dos prolongaciones desiguales, de las que la mayor corresponde a la célula madre y la otra a la yema; por carecer esta última de espacio, las esporas se forman en la célula madre (fig. 58).

En el género *Nadsonia* hay copulación heterogámica entre una célula adulta y una de sus yemas. Después de fusionarse las dos células, el contenido del gameto masculino o yema pasa al gameto femenino o

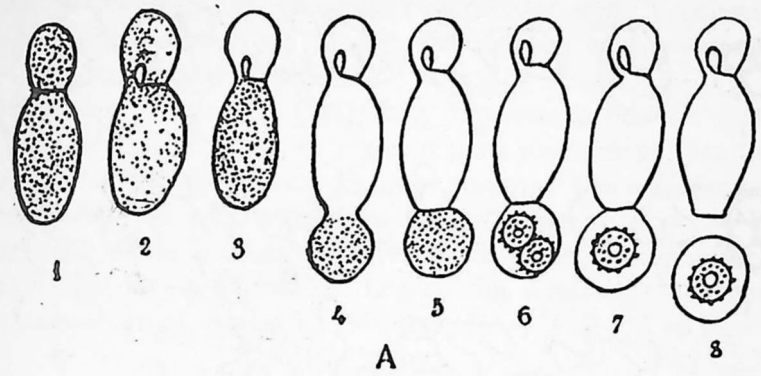


Fig. 59. — *Nadsonia.* Formación de una asca por copulación heterogámica. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

célula madre; entonces se forma una nueva célula por gemación, a la que pasa dicho contenido y que se convierte en asca, generalmente con una sola ascospora (fig. 59).

Forma intermedia de copulación. También se ha observado una forma intermedia de copulación, entre isogámica y heterogámica. En estas levaduras, las dos células o gametos son de iguales dimensiones y no presentan diferenciación sexual. Realizada la fusión, el contenido de una célula pasa al interior de la otra; la primera se puede considerar masculina, y femenina la segunda. Las ascosporas se originan en el gameto femenino, siempre en número de dos (fig. 58 *C*).

Copulación de ascosporas. En algunas especies, como *Saccharomycodes Ludwigii, S. Johannisbergensis* y *Hansenula saturnus,* se produce copulación isogámica entre las ascosporas derivadas de una asca, como muestra la figura 60. En la especie *S. Ludwigii,* una asca contiene habitualmente cuatro esporas; éstas se copulan de dos en dos mediante un conducto y se fusionan las substancias nucleares respectivas. La fusión es incompleta, y cada par de ascosporas así unidas da origen a una cigospora, que se alarga hasta formar un tubo de germinación, origen de numerosas células vegetativas.

La copulación ocurre normalmente entre dos esporas de la misma asca. También se ha observado entre ascosporas de ascas distintas, incluso distanciadas, concretamente de ascas viejas, donde la mayoría de las

esporas están muertas. Algunas esporas pueden germinar solas; otras han de fusionarse por parejas para germinar, lo cual significa que algunas de este último grupo tienen que fusionarse con esporas de ascas diferentes. La fusión de ascorporas no se considera como copulación auténtica, sino como un nuevo proceso que reemplaza a la fecundación sexual corriente.

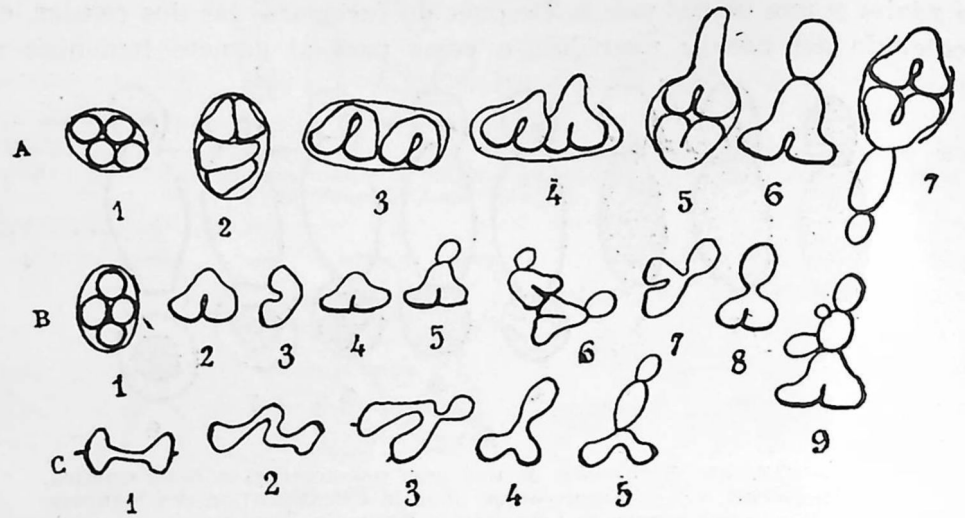


Fig. 60
Conjugación de ascosporas. *A, Saccharomycodes ludwigii*; *B, Saccharomyces johannisbergensis*; *C, Hansenula saturnus*. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Levaduras haploides y diploides. Las levaduras haploides tienen un grupo sencillo de genes, mientras que en las diploides hay dos grupos completos. Los genes son factores de transmisión y determinación de caracteres hereditarios, y cada uno de ellos constituye una pequeña parte de un cromosoma.

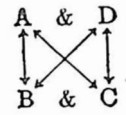
Las levaduras haploides se pueden fusionar por parejas para constituir otras diploides. Según Lindegren (1944):

Hay dos tipos apareados o «sexos» de levaduras haploides, y una célula haploide de un «sexo» puede fusionarse con otra del «sexo» opuesto para formar una célula diploide de las conocidas por diploides legítimas, genuinas o «heterocigóticas». En estas células, los genes conjugados en una o más parejas son diferentes entre sí, en contraste con lo que sucede en las diploides «homocigóticas», donde los dos genes de cada pareja son idénticos. Una célula diploide, espuria o «ilegítima», homocigótica, resulta de la fusión de dos células haploides del mismo «sexo». La mayoría de las levaduras del pan, la cerveza y la destilación que hemos examinado son de razas diploides ilegítimas, probablemente derivadas de fermentos naturales, por selección casual de cultivos aislados de ascosporas homocigóticas para modificar deliberadamente un gen, que afectaba a alguna fase química del proceso de fermentación. Su notable estabilidad pudo llamar la atención del fabricante e inducirle a seleccionarlos.

El mecanismo sexual de las levaduras sugiere la posibilidad de producir variedades nuevas. Por ejemplo, no hay levadura natural que haga fermentar lactosa y maltosa, sino sólo una u otra; es comprensible que, acoplando un fermento haploide de lactosa con otro de maltosa, el híbrido pueda hacer fermentar ambas.

El *Saccharomyces cerevisiae* existe en las formas haploide y diploide. Las células vegetativas ordinarias son diploides, pero, en ciertas condiciones, las células diploides se pueden convertir en ascas con cuatro ascosporas haploides. Las ascosporas germinan para producir cuatro cultivos haploides diferentes, que generalmente se distinguen con facilidad de los cultivos diploides.

Lindegren y Lindegren (1943) han demostrado que los cultivos de células haploides, apareadas, se copulan para producir células diploides, siempre que las haploides sean de sexos opuestos. Las ascosporas haploides procedentes del asca tetrapórea se han designado por A, B, C, D, y los cultivos de la haplofase derivados de ellas se han apareado en todas las combinaciones posibles. Los citados autores comprobaron que A y B pertenecían al mismo tipo de sexualidad, y B y C al tipo complementario. Aparecían tubos de copulación y cigotos cuando se apareaban A y B, A y C, D y B, o D y C; colocadas en un medio propicio, las células diploides producen ascas tetraspóreas, mientras que las parejas A y D, B y C no forman esporas. Millares de experimentos han confirmado que en el *Saccharomyces cerevisiae* hay dos tipos de sexualidad, que Lindegren designaba por «a» y «α». En la figura 61 se representa esquemáticamente el fenómeno del apareamiento. Los cigotos diploides grandes se reconocen fácilmente como *S. cerevisiae*, mientras que cultivos haploides estabilizados de diversos modos no pueden distinguirse de especies de *Torula* o de *Zygosaccharomyces*, según su morfología característica.



A & B, A & C, D & B, D & C

Citamos a continuación de Lindegren (1944):

Los diploides legítimos son heterocigóticos para genes a/α, en tanto que los diploides ilegítimos son homocigóticos, lo mismo aa que $\alpha\alpha$. Las células vegetativas legítimamente diploides esporulan para producir cuatro ascosporas haploides. Estas ascosporas se pueden separar unas de otras, y cada una de ellas multiplicarse para producir un cultivo de células haploides, capaces de actuar como gametos o células sexuadas. Cuando se fusionan dos de estos gametos de sexos opuestos, resulta una célula vegetativa heterocigótica legítimamente diploide; estas células suelen ser muy vigorosas. Cuando las condiciones son favorables para la esporulación, dan origen a cuatro esporas en cada célula. Si la fusión ocurre entre dos gametos de igual sexo, derivados de la misma ascospora, se forma una célula homocigó-

tica ilegítimamente diploide. Este tipo de célula suele ser tan capaz de crecimiento y de fermentación como la diploide genuina, y algunas diploides espurias poseen ciertas propiedades industriales muy convenientes; sin embargo, estas últimas son a menudo de menor tamaño, y habitualmente no producen ascosporas viables; las ascas suelen contener dos esporas.

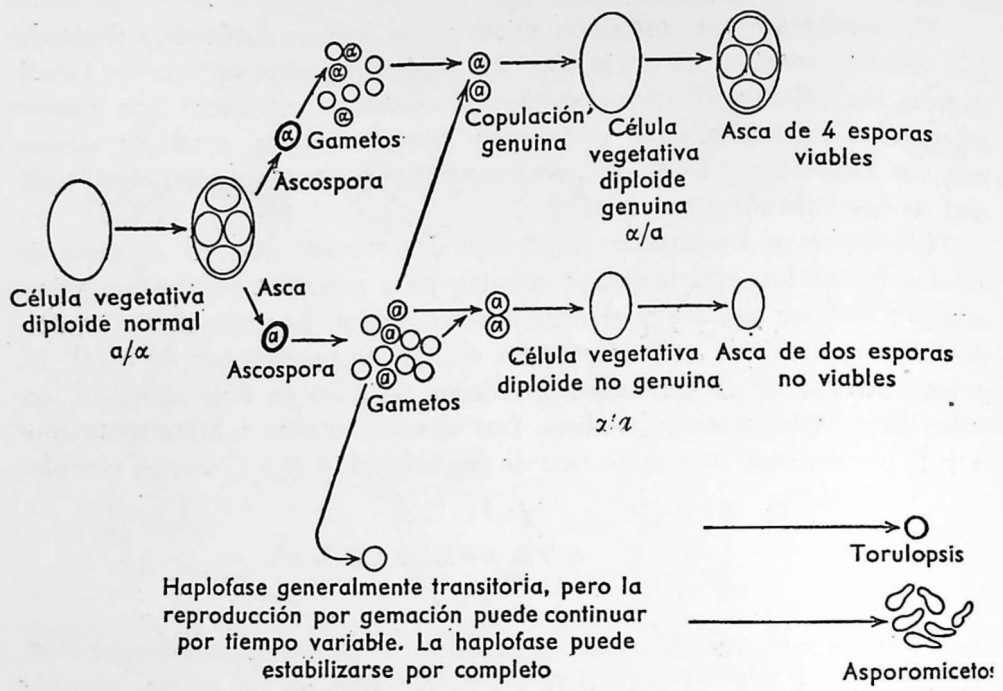


Fig. 61. — Ciclo vital del *Saccharomyces cerevisiae*, que muestra sus relaciones con los géneros *Torula* y *Zygosaccharomyces*. Las ascosporas pertenecen a dos tipos de sexualidad, *a* y α, y el heterocigoto es el diploide genuino; los homocigotos se denominan diploides espurios. (Según Lindegren.)

En la figura 61 los tipos de sexualidad igual de células de la haplofase se designan por «*a*» y «α», y las células de cada tipo sexuado específico se indican literalmente. Los cultivos de la diplofase suelen ser por naturaleza heterocigóticos para genes del tipo *a*/α, y se marcan así en el esquema. Los cultivos diploides, homocigóticos para *a* o α (*aa* o αα), tienden a ser menos vigorosos que los heterocigóticos *a*/α en cuanto a rapidez de crecimiento, peso en seco, rendimiento y viabilidad de las ascosporas.

La superioridad del heterocigoto y su frecuencia normal en la Naturaleza nos han inducido a llamarlo diploide genuino o legítimo, mientras que los homocigotos, con sus esporas poco viables, se han denominado diploides ilegítimos o espurios.

Véase más información en Pomper (1951).

Partenogénesis. Este término puede definirse como desarrollo de un organismo a partir de una célula no fecundada.

En algunas levaduras no se ha observado sexualidad; estas levaduras representan formas partenogenéticas derivadas de células sexuadas primitivas. Si el desarrollo del asca no es resultado de copulación, se trata de un gameto reproducido por partenogénesis.

En el *Schwanniomyces*, las células que forman ascas originan expansiones de diferentes longitudes, que tienden a fusionarse como en una verdadera copulación. Sin embargo, la fusión no llega a producirse, y las células conservan, por lo visto, una porción solamente de sus características sexuales. Este mismo fenómeno se ha observado en la *Torulaspora* y en otras levaduras (figs. 62 y 63).

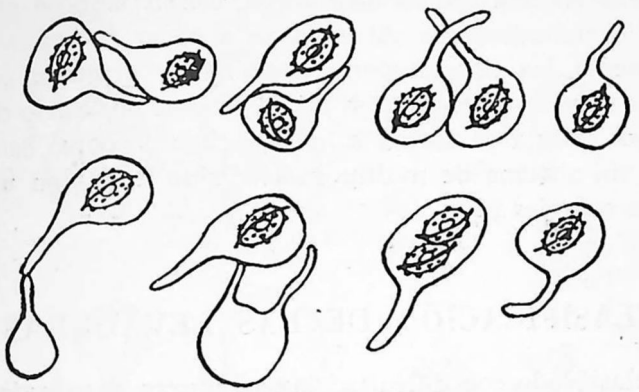


Fig. 62
Schwanniomyces. Ascas con ascosporas. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

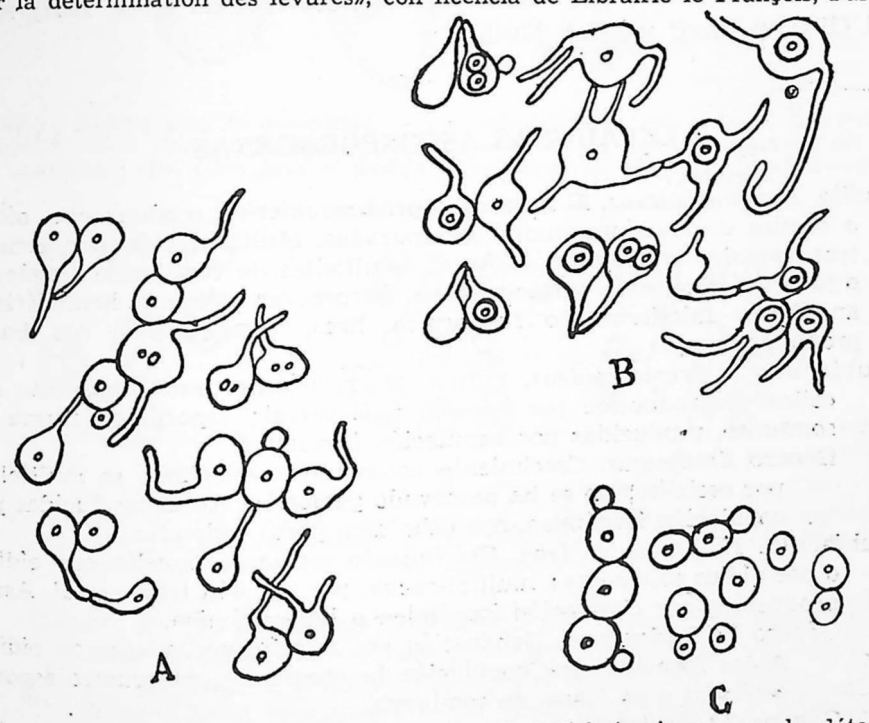


Fig. 63. — *Torulaspora*. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Clamidosporas. En condiciones desfavorables cesan de multiplicarse las células de levaduras, y algunos microorganismos acumulan substancias nutritivas de reserva, tales como grasas y corpúsculos de glucógeno, y se envuelven en una gruesa membrana, convirtiéndose en células de vida latente o clamidosporas. Al volverse a hacer favorables las condiciones del medio, las clamidosporas germinan y originan células vegetativas que, a su vez, se reproducen por el proceso ordinario de gemación. Como de cada célula se forma sólo una clamidospora, esto no puede considerarse un sistema de multiplicación, sino más bien un medio de perpetuar las especies.

CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

Se han clasificado con dificultad las levaduras, y todavía reina gran confusión en este aspecto. La clasificación que damos aquí se ha tomado de los trabajos de Stelling-Dekker (1931) Guilliermond (1928, 1937), Henrici (1941) y Phaff y Mrak (1948).

LEVADURAS ASCOSPORÓGENAS

Familia. *Endomicetáceas.* El desarrollo produce micelio, seudomicelio, oídios o células de levadura, juntas o separadas. Multiplicación por escisión transversal o por gemación. Ascas resultantes de copulación isogámica o heterogámica, o de partenogénesis. Ascosporas esféricas, hemisféricas, angulares, falciformes o fusiformes, lisas, verrugosas o con borde prominente.

Subfamilia I. *Eremascoideas.* Forma de crecimiento exclusivamente micélica. Reproducción por escisión transversal; esporas en forma de sombrero, producidas por copulación isogámica.

Género *Eremascus.* Crecimiento enteramente micélico; se multiplica por escisión; no se ha observado gemación. Ascas producidas por copulación isogámica, con ocho ascosporas redondas.

Subfamilia II. *Endomicoideas.* Crecimiento mediante micelio con oídios, o por oídios solamente; multiplicación por escisión transversal. Ascas producidas por copulación isogámica o heterogámica.

Género 1.º *Endomyces.* Generación por micelio verdadero con oídios. Ascas formadas por copulación heterogámica, con cuatro esporas esféricas o en figura de sombrero.

Género 2.º *Schizosaccharomyces.* Oídios sin micelio; multiplicación por escisión transversal. Ascas formadas por copulación isogámica, con cuatro a ocho esporas redondas (figs. 56 y 57).

Subfamilia III. *Sacaromicoideas.* Crecimiento por micelio con yemas conídicas, y a veces oídios, o sólo células gemíparas de levadura; multiplicación por escisión transversal o por gemación. Esporas esféricas, hemisféricas, angulares o falciformes, o con borde prominente; ascas formadas por copulación isogámica o heterogámica, o por partenogénesis. Se divide en tres tribus.

Tribu 1.ª *Endomicopseas.* Crecimiento por micelio con yemas conídicas, a veces oídios; multiplicación por escisión transversal y por gemación multipolar. Ascosporas en forma de sombrero, falciformes o con borde prominente, y producidas por copulación isogámica o por partenogénesis.

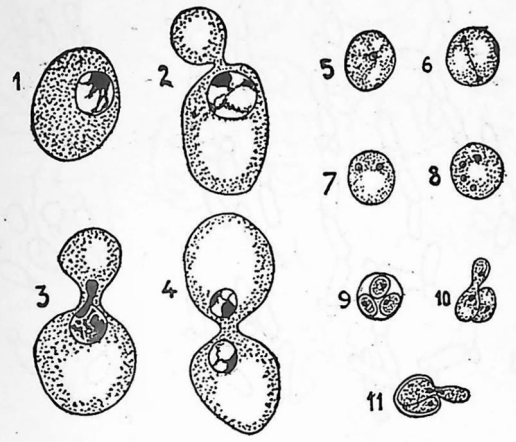


Fig. 64. — *Saccharomyces cerevisiae.* — 1-4, formación de una yema, con división del núcleo; 5-11, formación de una asca a partir de la yema, y germinación de una ascospora. (De Gäumann y Dodge, «Comparative Morphology of Fungi».)

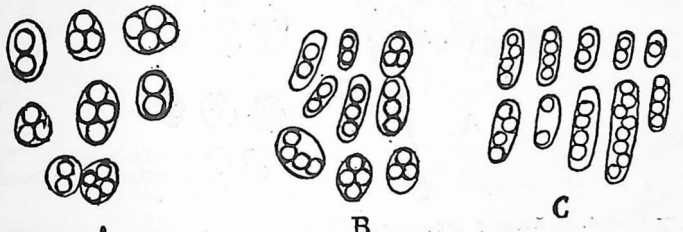


Fig. 65. — *Saccharomyces.* Ascas y ascosporas. *A, S. Cerevisiae; B, S. ellipsoideus; C, S. pastorianus.* (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Género 3.º *Endomycopsis.* Crecimiento por micelio con yemas conídicas, a veces oídios; multiplicación por escisión transversal y por gemación multipolar. Ascosporas hemisféricas, ovoides, falciformes, lisas, verrugosas o con borde prominente, y producidas por copulación isogámica o por partenogénesis.

Tribu 2.ª *Sacaromicetáceas.* Crecimiento a partir de células de levadura, sin micelio; multiplicación por gemación multipolar; ascosporas producidas por copulación isogámica o heterogámica, o por partenogénesis; esporas de diversas formas.

Género 4.º *Sacharomyces.* Células esféricas, ovoides o alargadas. Ascosporas producidas por copulación isogámica o heterogámica, o por partenogénesis, con una a cuatro ascosporas esféricas lisas, que germinan por gemación (figs. 64 y 65).

Género 5.º *Zygosaccharomyces*. Células esféricas, ovoides o alargadas. Ascas formadas por copulación isogámica o heterogámica, o por un proceso intermedio entre ambas, con una a cuatro ascosporas (figura 58).

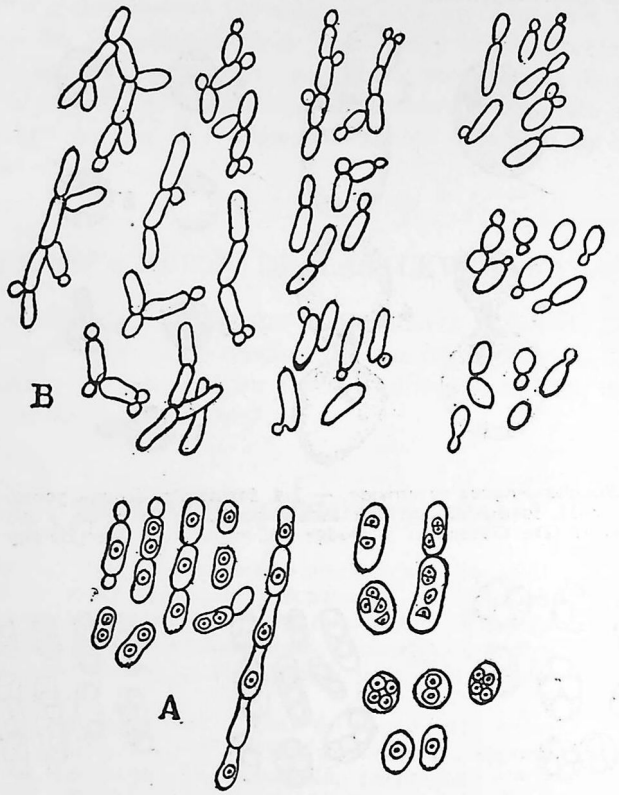


Fig. 66. — *Pichia*. *A*, ascas y ascosporas; *B*, células gemíparas. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Género 6.º *Torulaspora*. Células esféricas, con un glóbulo grande de grasa en el centro. Las ascas muestran un indicio de copulación por desarrollo de expansiones, pero sin enlace; ascas producidas por partenogénesis, con una o dos células esféricas lisas (fig. 63).

Género 7.º *Pichia*. Células ovoides o alargadas. Proceso sexual incierto. Las ascas contienen una a cuatro esporas esféricas, hemisféricas o triangulares (fig. 66).

Género 8.º *Zygopichia*. Células ovoides o alargadas. Ascas formadas por copulación isogámica o heterogámica, o por partenogénesis; contienen una a cuatro esporas esféricas, hemisféricas o triangulares.

Género 9.º *Hansenula*. Células ovoides o alargadas, a veces esféricas. Ascas producidas por partenogénesis, con dos a cuatro esporas en forma de limón o de sombrero (fig. 67).

Género 10. *Zygohansenula*. Células ovoides o alargadas, a veces esféricas. Ascas producidas por copulación isogámica o heterogámica, con dos a cuatro esporas en forma de limón.

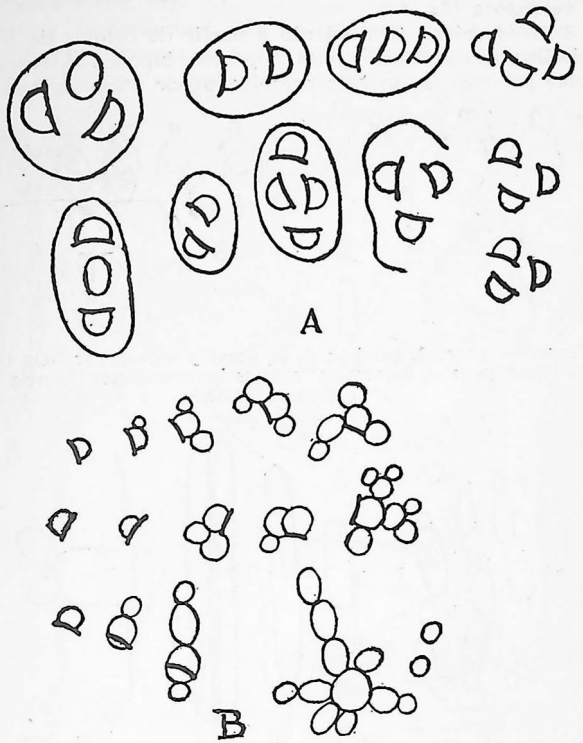


Fig. 67. — *Hansenula*. A, ascas y ascosporas; *B*, germinación de ascosporas por gemación. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

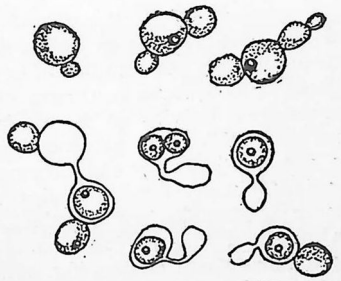


Fig. 68. — *Debaryomyces*. (Reproducido de Guilliermond-Tanner, «The Yeasts», John Wiley & Sons, Inc.)

Género 11. *Debaryomyces*. Células esféricas u ovoides. Ascas producidas por copulación isogámica o heterogámica, con una o más esporas rugosas (fig. 68).

Género 12. *Schwanniomyces*. Células esféricas u ovoides, a veces con micelio rudimentario. Ascas producidas por partenogénesis, con una o dos esporas provistas de un aro prominente y una pared verrugosa (fig. 62).

Tribu 3.ª *Nadsonieas*. Crecimiento a partir de células de levadura, sin micelio; multiplicación por gemación bipolar. Ascosporas producidas por copulación heterogámica o por partenogénesis.

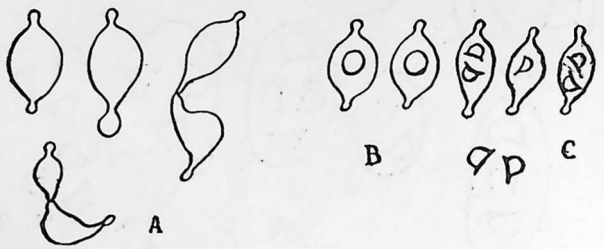


Fig. 69. — *Hanseniaspora*. *A*, células; *B*, *C*, ascas y ascosporas. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

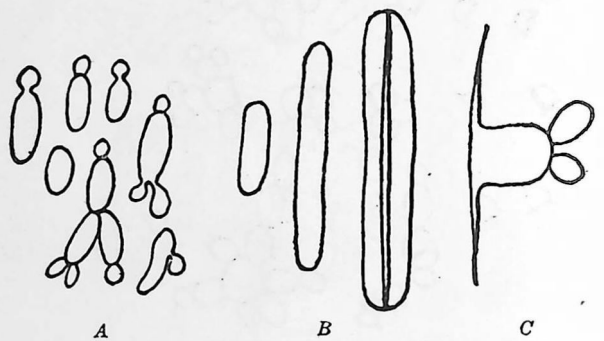


Fig. 70. — *Monosporella*. *A*, células gemíparas; *B*, asca con una ascospora. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Género 13. *Saccaromycodes*. Células en forma de limón, con gemación bipolar. Ascas producidas por copulación heterogámica, con cuatro esporas esféricas lisas, que se conjugan al germinar (fig. 60 *A*).

Género 14. *Hanseniaspora*. Células en forma de limón, con gemación bipolar. Ascas producidas por partenogénesis, con dos a cuatro esporas lisas, entre redondas y capeliformes (fig. 69).

Género 15. *Nadsonia*. Células esféricas, ovales, elipsoideas o en forma de limón. Ascas producidas por copulación heterogámica entre una yema y la célula madre, con una o dos esporas esféricas verrugosas, o a veces hasta cuatro (fig. 59).

Subfamilia IV. *Nematosporídeas*. Crecimiento por micelio y células gemíparas de levadura; multiplicación por copulación isogámica. Esporas aciculares, con apéndices o sin ellos.

Género 16. *Monosporella*. Células ovoides; multiplicación por gemación y por copulación isogámica. Las ascas contienen una espora acicular (fig. 70).

Género 17. *Nematospora*. Células ovoides, largas, irregulares o micelioides; multiplicación por gemación. Ascas producidas por partenogénesis con cuatro o más esporas fusiformes, provistas de apéndice (fig. 71).

Género 18. *Coccidiascus*. Células esféricas u ovoides, que se multiplican por gemación. Ascas producidas por copulación isogámica, con ocho esporas fusiformes no flageladas (fig. 72).

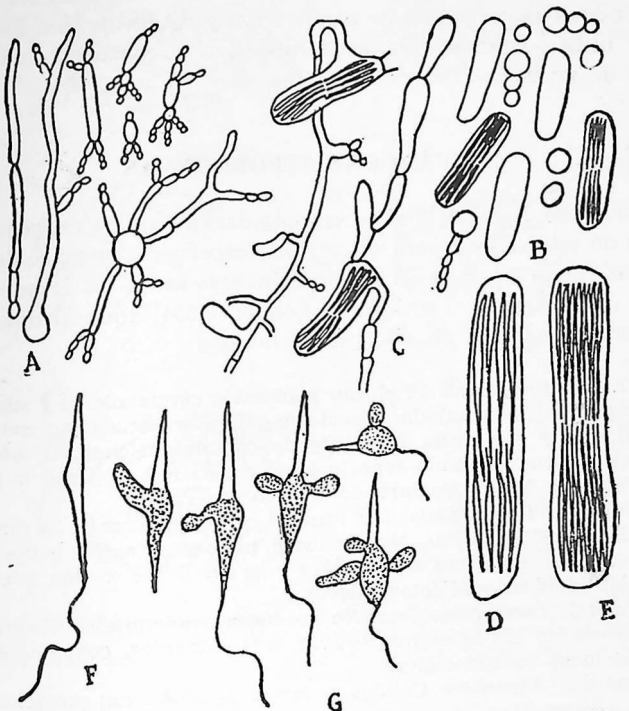


Fig. 71. — *Nematospora*. *A*, crecimiento micélico; *B*, *C*, formación de ascas; *D*, *E*, ascas con 8 ó 16 ascosporas; *F*, *G*, germinación de ascosporas. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

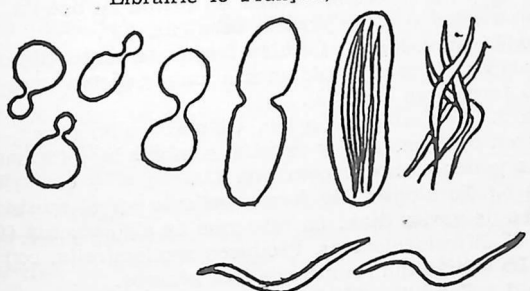


Fig. 72. — *Coccidiascus*. Asca producida por copulación isogámica; cuatro ascosporas por asca. (De Guilliermond, «Clef dichotomique pour la détermination des levures», con licencia de Librairie le François, París.)

Sacaromyces. Este género contiene casi todas las especies de importancia industrial, y es, con mucho, el grupo principal de levaduras. Las células son esféricas, ovoides o alargadas. Las ascas se producen por copulación heterogámica o por partenogénesis, y contienen una a cuatro esporas esféricas lisas.

La especie más importante es *S. cerevisiae,* comúnmente empleada en las industrias cervecera, de panificación y de destilación. Es la misma que se utiliza ampliamente en terapéutica y constituye un depósito natural de vitaminas del complejo B.

LEVADURAS ASPORÓGENAS

El término *Torulae* (*Torula* en singular) se aplica en general a las especies de células incapaces de producir esporas; a veces se denominan levaduras falsas o bravas. Will (1916) incluyó todas las levaduras asporógenas en la familia *Toruláceas*; Lodder (1934) admitió dos familias, y otra provisional con un sólo género dudoso.

Familia I. *Rodotoruláceas.* Producen pigmentos carotenoides, y sus colonias son amarillas, anaranjadas, rosadas o rojas. Se encuentran comúnmente en el aire y son causa frecuente de contaminaciones en laboratorios bacteriológicos. Ninguna especie es fermentativa, ni tiene importancia práctica. La familia comprende un solo género.

Género 1.º *Rhodotorula.* Las mismas características de la familia.

Familia II. *Torulopsidáceas.* No producen pigmentos carotenoides. Incluye las restantes levaduras asporógenas y se subdivide en dos subfamilias: *Torulopsidoideas* y *Micotoruloideas.*

Subfamilia I. *Torulopsidoideas.* No producen seudomicelio. Comprende la mayoría de las levaduras bravas contaminantes, comunes en manipulaciones bacteriológicas.

Género 1.º *Kloeckera.* Células en forma de limón, con gemación bipolar (figura 73).

Género 2.º *Trigonopsis.* Células triangulares, con gemación en los vértices.

Género 3.º *Pityrosporum.* Células en forma de botella, por lo general con gemación sobre amplia base (fig. 73).

Género 4.º *Mycoderma.* Células frecuentemente cilíndricas, con gemación; forman rápidamente una película seca en el mosto. No fermentan (fig. 73).

Género 5.º *Schizoblastosporion.* Células polimórficas, que se reproducen por gemación y escisión combinadas; forman rápidamente una película en el mosto (fig. 73).

Género 6.º *Torulopsis.* No forma película en el mosto, o lo hace al cabo de varios días; en este caso es algo viscosa (fig. 73).

Subfamilia II. *Micotoruloideas.* Producen seudomicelio, con yemas en los nudos. La subfamilia comprende tres géneros.

Género 1.º *Candida.* Células no ojivales ni apuntadas. El seudomicelio, bien desarrollado, forma blastosporas; no hay artrosporas. La producción de ácidos no es abundante (fig. 74).

Género 2.º *Brettanomyces.* Células comúnmente ojivales; seudomicelio no muy desarrollado. Rápida producción en ácido (fig. 75).

Género 3.º *Trichosporon.* Producen seudomicelio, micelio auténtico, artrosporas y blastosporas (fig. 76).

Para información más extensa véase Lodder y Kreger-Van Rij (1953).

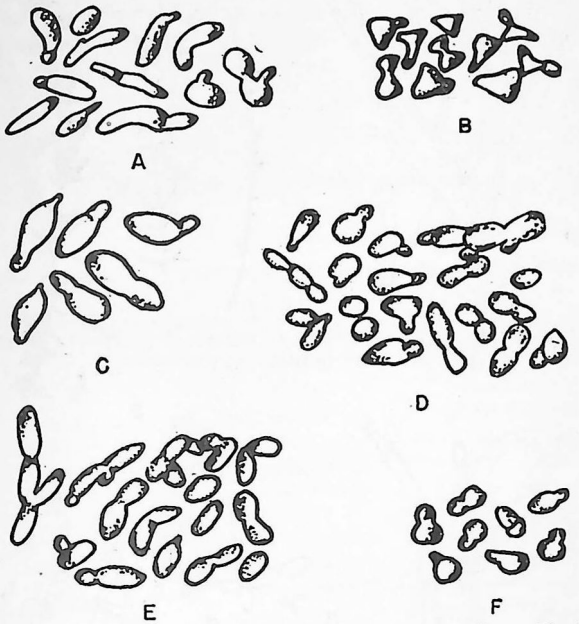


Fig. 73. — Levaduras asporógenas. *A, Schizoblastosporion; B, Trigonopsis; C, Kloeckera; D, Torulopsis; E, Mycoderma; F, Pityrosporum.* (De Mrak, Phaff y Stadtman, «Taxonomy and Morphology of Yeasts», Universidad de California, Berkeley.)

Pityrosporum. Se han aislado de la piel varias especies del género *Pityrosporum,* pero todas ellas parecen ser bastante similares al *P. ovale* para considerarlas idénticas a esta especie. El microorganismo suele llamarse bacilo lageniforme, por parecerse a una botella. Como existe en la piel, especialmente en el cuero cabelludo, algunos autores sostienen que es el agente productor de la caspa. Sin embargo, no parece estar probado que intervenga en la formación de estas escamillas, ni en ninguna afección patológica de la piel o del cuero cabelludo.

Brettanomyces. Este género comprende varias especies de importancia industrial, que participan en la fermentación secundaria o tardía de diversas cervezas inglesas y belgas, desarrollada en botellas donde el oxígeno remanente se utiliza y substituye por dióxido de carbono. La fermentación en condiciones anaeróbicas es muy lenta, y hacen falta varios meses para que termine la reacción. En condiciones aeróbicas, estas levaduras transforman alcohol en ácido acético por oxidación.

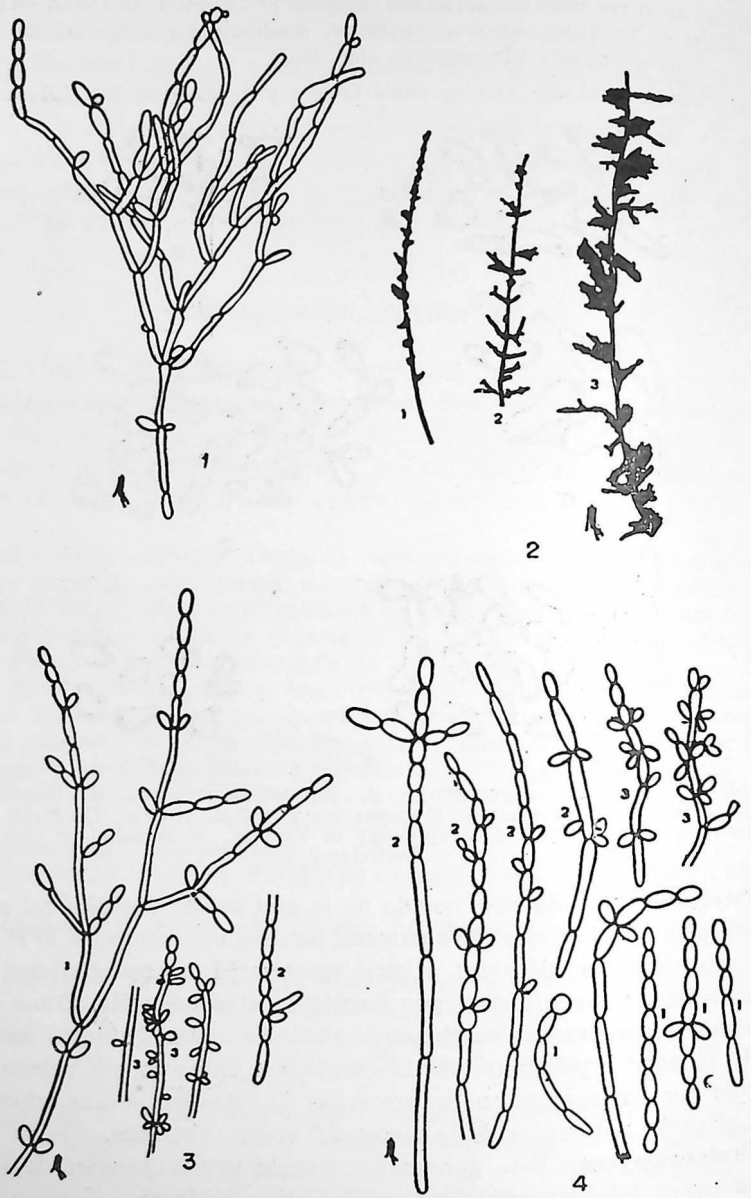


Fig. 74. — Levaduras asporógenas. Varios tipos de seudomicelios formados en especies del género *Candida*. (De Mrak, Phaff y Stadtman, «Taxonomy and Morphology of Yeasts», Universidad de California, Berkeley.)

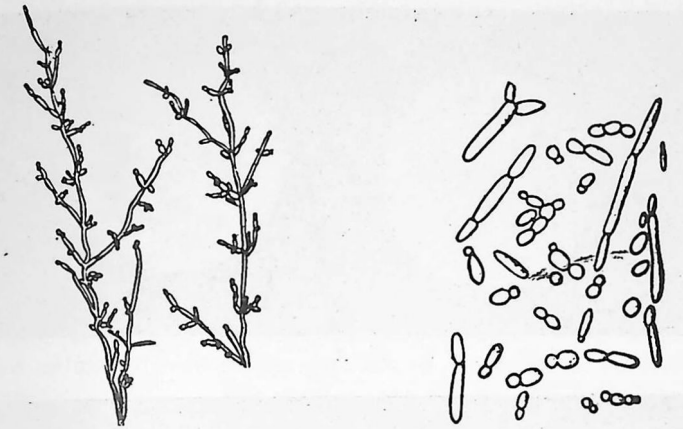


Fig. 75. — Levaduras asporógenas. A derecha e izquierda, *Brettanomyces lambicus*. (De Mrak, Phaff y Stadtman, «Taxonomy and Morphology of Yeasts», Universidad de California, Berkeley.)

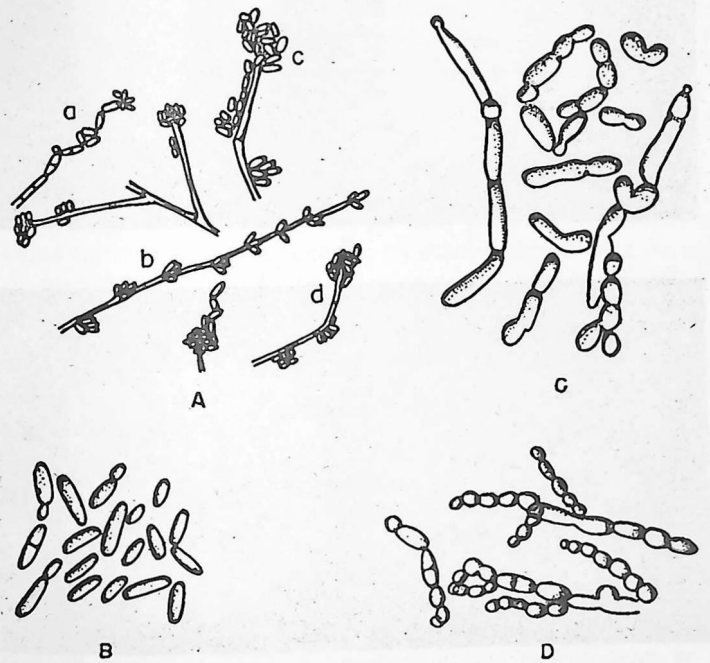
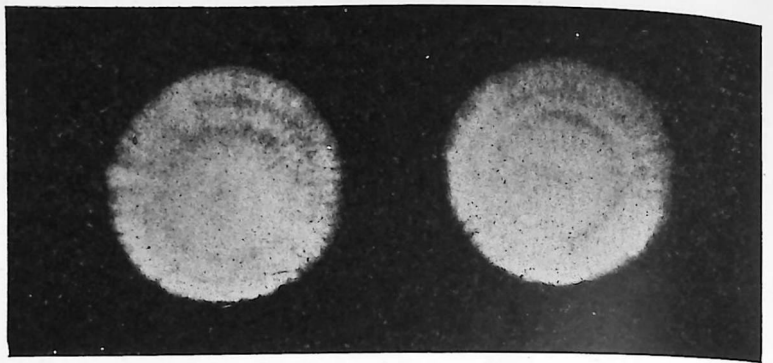
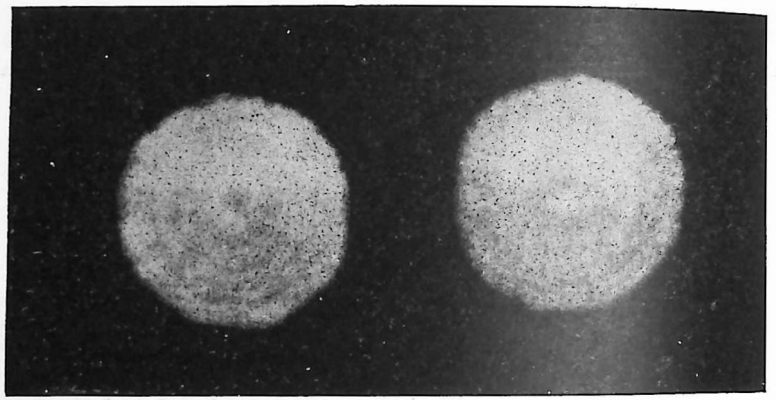


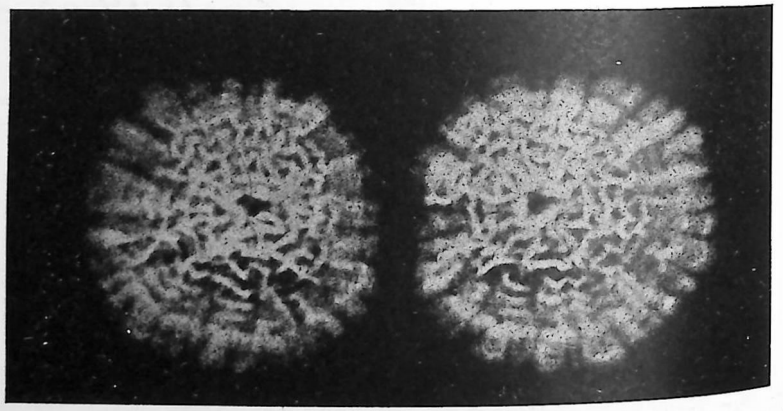
Fig. 76. — Levaduras asporógenas. *A*, *B*, *Trichosporon capitatum*; *C*, *T. pullulans*; *D*, *T. margaritiferum*. (De Mrak, Phaff y Stadtman, «Taxonomy and Morphology of Yeasts», Universidad de California, Berkeley.)



A



B



C

Fig. 77. — Hibridación de levaduras. *A*, *Saccharomyces cerevisiae*, cepa danesa de levadura del pan; *B*, *Saccharomyces cerevisiae*, cepa II; *C*, híbrido obtenido del cruzamiento de ambas cepas, a los treinta días. (Según Winge y Laustsen.)

Las células son ovoides o globulares, a menudo oblongas y apuntadas por ambos extremos. Puede producirse gemación en todos los puntos de la célula, a modo de agregados irregulares, con tendencia a formar un seudomicelio poco desarrollado. No se originan ascosporas. Estos microorganismos crecen muy despacio en medios de cultivo.

Para informes sobre el uso de reacciones de fermentación con objeto de clasificar levaduras, véanse Skinner y Bouthilet (1947), y Wickerham y Burton (1948).

HIBRIDACIÓN

Puede definirse un híbrido como un nuevo organismo desarrollado de dos células de diferentes especies, o de distintas características genéticas.

Winge y Laustsen (1938, 1939) demostraron que es posible producir nuevas variedades de levaduras por hibridación (fig. 77). Pusieron dos esporas de sexualidad opuesta y especies distintas en una gota de solución de cultivo, para que pudieran copularse, y se formó una cigospora, de la que germinó la levadura híbrida. Estos investigadores lograron obtener 14 nuevos tipos de levaduras, a partir de ocho especies y razas diferentes de *Sacharomyces* y una de *Zygosaccharomyces*.

Lindegren (1944, 1945b, 1949), y Lindegren y Lindegren (1943, 1945) han conseguido igualmente esporas híbridas de levaduras a base de especies y razas distintas; las nuevas cepas tenían pronunciadas características útiles para necesidades o fines especiales.

Este procedimiento es muy complicado, pero aún lo es más determinar qué cultivos de esporas tienen propiedades específicas para atender a una necesidad determinada. Los diseños de la figura 78 ilustran cuatro fases del proceso de hibridación.

Fase 1.ª Se representan células de dos razas (A y B) de levadura, después de iniciada la formación de esporas; éstas se retiran por microdisección, con ayuda de un micromanipulador.

Fase 2.ª Se siembra cada espora en un medio nutritivo, para que produzca cultivos separados de esporas. Después de comprobar con cuidado las características que interesan, se eligen dos cultivos de esporas de sexualidad distinta, para aparearlas o cruzarlas.

Fase 3.ª Al juntar los dos cultivos de esporas, en lugar de emitir yemas se fusionan por parejas y producen una combinación totalmente nueva, pero estable, de cualidades heredadas.

Fase 4.ª La nueva raza híbrida representada constituye una combinación de las mejores cualidades de las cepas A y B. El híbrido obtenido crece y se reproduce por gemación; las nuevas cualidades heredadas se transmiten asimismo a todas las células reproducidas.

En la figura 79 se exponen cinco fases del empleo del microútil para cortar la pared celular de una asca y retirar las esporas que contiene. Consiste en un potente microscopio asociado a un manipulador, que reduce

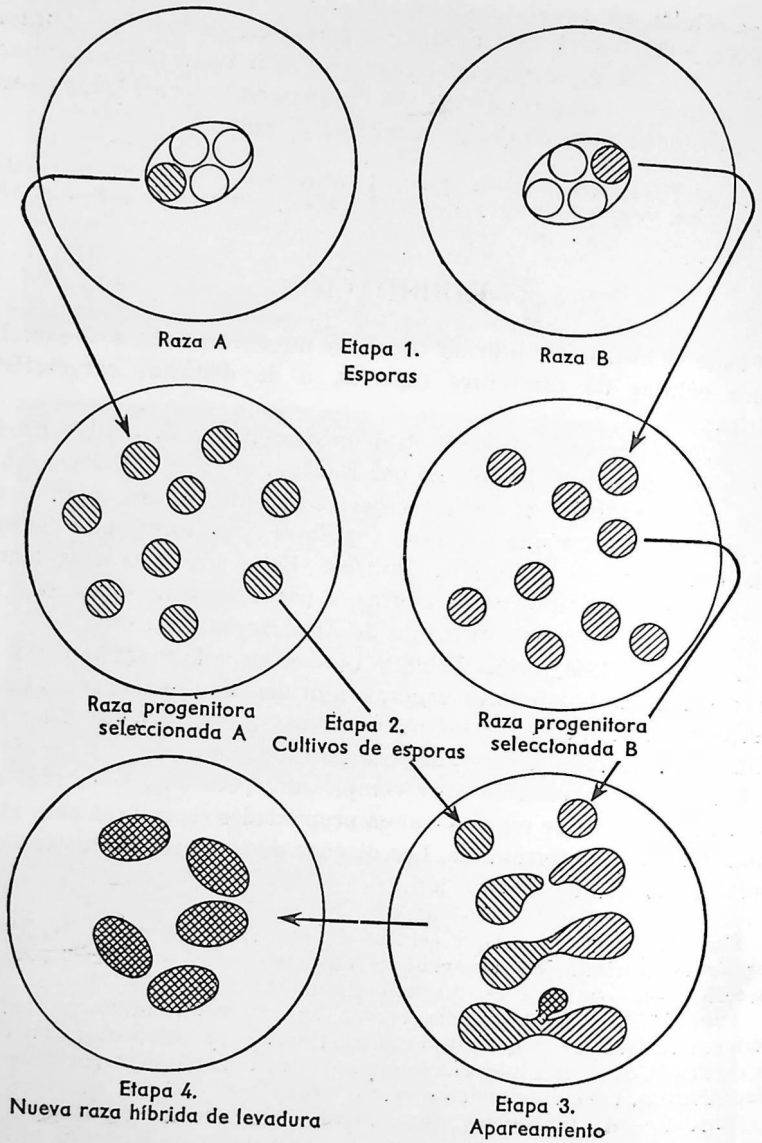


Fig. 78. — Cuatro fases del proceso de hibridación; descripción en el texto. (Con licencia de Anheuser-Busch, Inc.)

varios millares de veces los movimientos manuales; cuando el operador mueve una palanca 1/4 de pulgada, la microaguja se desvía menos de 1/10.000 de pulgada.

Más información sobre genética de levaduras se encontrará en Winge (1952).

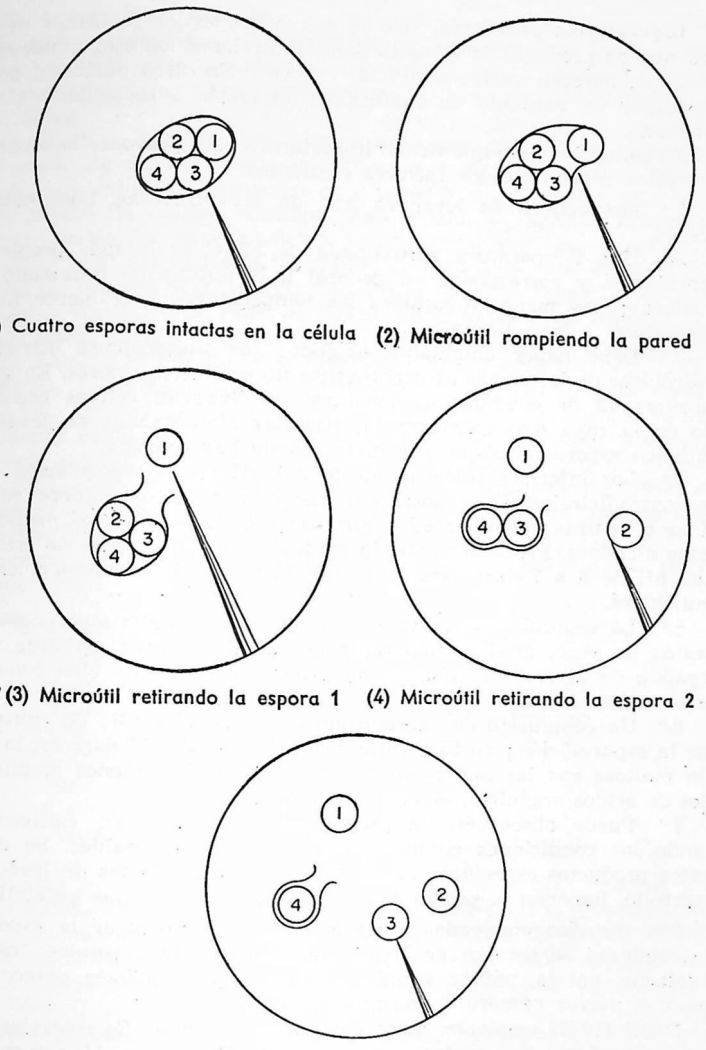


Fig. 79. — Cinco fases de la microdisección de esporas de levadura; descripción en el texto. (Con licencia de Anheuser-Busch, Inc.)

TÉCNICA DE LABORATORIO

Los métodos utilizados para aislar y estudiar levaduras en cultivos puros son, en general, los mismos que se emplean cuando se trata de bacterias.

La mayoría de las especies de levaduras se desarrollan en condiciones óptimas a una temperatura aproximada de 25° C.

Esporulación provocada. No se conocen bien los requisitos necesarios para que se produzca la esporulación; intervienen en ello numerosos factores, que parecen variar según las especies. En otras palabras, no puede formularse un conjunto de condiciones aplicable a todas las especies de levaduras.

En general se cree que tienen importancia para provocar la esporulación en células vegetativas los factores siguientes:

1.° Las células de levadura han de ser vigorosas, bien nutridas y jóvenes.

2.° Una temperatura aproximada de 25° C es la más propicia a la esporulación y corresponde en general a la óptima de desarrollo de las levaduras; son menos favorables las temperaturas ligeramente inferiores o superiores a la indicada.

3.° Debe haber abundante oxígeno; las suspensiones estrictamente anaeróbicas de levaduras ascosporógenas no producen esporas. En secciones transversales de colonias de levaduras se observan células esporulantes sólo en la capa más exterior; las pastillas almacenadas de levadura no contienen esporas más que por fuera, donde hay oxígeno.

4.° Los informes sobre el efecto del pH en la esporulación parecen ser contradictorios. Unos sostienen que este proceso requiere soluciones ácidas o neutras; otros arguyen que son más favorables los medios débilmente alcalinos. Probablemente, la esporulación no depende de este factor, y un pH de 6 a 7 dará resultados satisfactorios si se cumplen las demás condiciones.

5.° La esporulación exige mucha humedad. Materiales porosos compuestos de yeso, arcilla, madera, papel de filtro, agar, gelatina, etc., se empapan de agua o de solución nutritiva y sirven muy bien como portadores de humedad.

6.° Un compuesto de carbono apropiado en el medio de cultivo favorece la esporulación; su tipo varía según la especie. Al parecer, la manosa y la maltosa son las que producen más ascas; dan buenos resultados las sales de ácidos orgánicos, especialmente los acetatos.

7.° Puede observarse la producción de esporas en cultivos viejos, cuando las condiciones circundantes son menos favorables. Se cree que ciertos productos específicos del metabolismo, procedentes de levaduras en desarrollo, imponen la producción de esporas a las células vegetativas.

Los métodos empleados antiguamente para provocar la esporulación en levaduras se servían de trozos cuneiformes de vegetales: zanahoria, remolacha, patata, pepino y nabo; de éstos, la zanahoria parece proporcionar el mayor número de resultados favorables.

Engel (1872) empleaba tacos compuestos de yeso. Se colocaba un taco en un recipiente de vidrio o una placa de Petri y se le agregaba agua hasta que la parte inferior quedaba sumergida. El recipiente y su contenido se esterilizaban en autoclave. Se inoculaba fuertemente la superficie alta del taco con un cultivo en caldo reciente, y se dejaba el recipiente en la estufa, a 25° C, durante una semana aproximadamente. Este método suele producir una esporulación satisfactoria.

Gorodkowa (1908) desarrolló un medio que contenía 1 % de peptona y 0,25 % de glucosa solidificada con agar. La esporulación se presentaba a los tres o cuatro días. Un medio similar, con 5 % de glucosa, no provocó la formación de esporas, lo cual indica que las condiciones esenciales para ello dependen de los azúcares del medio más bien que de los otros compuestos.

Se afirma generalmente que un medio poco nutritivo favorece más la

formación de esporas; pero esto no explica los hechos. Welten (1914) comprobó que las levaduras esporulaban fácilmente en extracto de ciruela y agar, sobre todo si el extracto estaba concentrado, y demostró que la esporulación requería una acentuada acidez. No se encontraban esporas en medio alcalino.

Mrak, Phaff y Douglas (1942) observaron que cultivos en agar inclinado, a partir de un extracto acuoso de zanahorias, remolacha, pepinos y patatas, provocaban la formación de esporas y constituían a la vez un excelente medio de cultivo continuo. Este medio se preparó triturando pesos equivalentes de los vegetales y mezclándolos con una cantidad de agua igual al peso del material triturado; la mezcla se tuvo en autoclave a 10 libras de presión durante diez minutos, y luego se separó el extracto de la pulpa a través de un filtro de lienzo. En el extracto se disolvió agar al 2 %. El medio se distribuyó en tubos, se trató en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos y se mantuvo después inclinado.

Nickerson y Thimann (1941) hallaron que la copulación y la esporulación en una especie de *Zygosacchromyces* eran más abundantes cuando había muchas células muertas, de lo que infirieron que éstas proporcionaban cierta substancia estimulante. También comprobaron que un extracto de *Aspergillus niger* aumentaba la esporulación. Posteriormente (1943) demostraron que la riboflavina y el glutarato sódico eran tal vez las substancias estimulantes contenidas en el extracto.

Lindegren y Lindegren (1944*a*) recomiendan el siguiente medio previo a la esporulación:

Extracto de remolacha (hojas)	10 ml
Extracto de remolacha (raíz)	20 ml
Zumo de albaricoque	35 ml
Zumo de uva	16,5 ml
Levadura (seca)	2 g
Glicerina	2,5 ml
Agar	3 g
Carbonato cálcico	1 g
Agua, hasta completar 100 ml.	

La mezcla se sometió a corriente de vapor durante diez minutos y se envasó en tubos; éstos se esterilizaron a 15 libras de presión durante veinte minutos y se mantuvieron inclinados. En estos cultivos, la mayoría de las levaduras producen directamente esporas si se dejan crecer durante unas semanas. Cuando se necesitan en menos tiempo, hay que trasladarlos a tacos de yeso.

Puede resumirse que es esencial un medio nutritivo específico para que se produzca una esporulación abundante. Si tal medio es satisfactorio, y no excesivo su contenido en azúcar, es posible que se formen esporas, incluso en agar inclinado. En caso de utilizar tacos de yeso, el agua debe dar reacción alcalina y contener subproductos del desarrollo de levaduras, así como, a ser posible, algunas substancias resultantes de la muerte y desintegración de las células de levadura.

Aislamiento de cultivos puros. Se han recomendado muchos métodos para aislar levaduras en cultivos puros; la mayoría de ellos se basan en aislar células sueltas y propagarlas en un medio de cultivo adecuado. Tales métodos requieren considerable habilidad y paciencia. Por los mismos medios empleados para separar especies bacterianas (pág. 161) pueden aislarse también cultivos puros de levaduras.

Para una información más amplia sobre levaduras, véanse Guilliermond (1940), Henrici (1941), Leonian y Lilly (1943), Lindegren (1945*a*, 1949), Lindegren y Hamilton (1944), Lindegren y Lindegren (1944*b*), Lindegren, Spiegelman y Lindegren (1944, 1945), Phaff y Mrak (1949), Prescott y Dunn (1949), Skinner, Emmons y Tsuchiya (1947), Smith (1942), Spiegelman (1945), Spiegelman y Lindegren (1944, 1945), Spiegelman, Lindegren y Hedgecock (1944), Spiegelman, Lindegren y Lindegren (1945), y Winge (1951).

REFERENCIAS

Engel, L.: Les Ferments alcoholiques, Universidad de París, **1**: 1872.

Fuchs, J.: Schimmepilze als Hefebildner, *Centr. Bakt.*, Abt. II, **66**: 490, 1926.

Gorodkowa, A. A.: Ueber das Verfahren rasch die Sporen von Hefepilzen zu gewinnen, *Bull. jard. imp. bot. St. Peters.*, **8**: 163, 1908.

Guilliermond, A.: «The Yeasts», traducido por F. W. Tanner, Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1920.

—: «Clef dichotomique pour la détermination des levures», París, Librairie le François, 1928.

—: «La Sexualité, le cycle de développement, la phylogénie, et la classification des levures d'après les travaux récents», París, Masson et Cie, 1937.

—: Sexuality, development cycle and phylogeny of yeasts, *Botan. Rev.*, **6**: 1, 1940.

Henrici, A. T.: The yeasts: genetics, cytology, variation, classification and identification, *Bact. Rev.*, **5**: 97, 1941.

Loenian L. H., y V. G. Lilly: Induced autotrophism in yeast, *J. Bact.*, **45**: 329, 1943.

Lindegren, C. C.: The improvement of industrial yeasts by selection and hybridization, *Wallerstein Lab. Commun.*, **7**: 153, 1944.

—: Mendelian and cytoplasmic inheritance in yeasts, *Ann. Missouri Botan. Garden*, **32**: 107, 1945*a*.

—: Yeast genetics: Life cycles, cytology, hybridization, vitamin synthesis, and adaptive enzymes, *Bact. Rev.*, **9**: 111, 1945*b*.

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

—: Yeasts of tomorrow, Anheuser-Busch, Inc., St. Louis, Mo. 1949.

—: «The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology», St. Louis, Educational Publishers, Inc., 1949.

—: The mechanics of budding and copulation in *Saccharomyces*, *Exp. Cell Research*, **2**: 305, 1951.

— y E. Hamilton: Autolysis and sporulation in the yeast colony, *Botan. Gaz.*, **105**: 316, 1944.

— y G. Lindegren: A new method for hybridizing yeast, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **29**: 306, 1943.

— y —: Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Botan. Gaz.*, **105**: 304, 1944*a*.

— y —: Instability of the mating type alleles in *Saccharomyces*, *Ann. Missouri Botan. Garden*, **31**: 203, 1944*b*.

— y —: Vitamin-synthesizing deficiencies in yeasts suplied by hybridization, *Science*, **102**: 33, 1945.

—, S. Spiegelman, y G. Lindegren: Mendelian inheritance of adaptive enzymes in yeast, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **30**: 346, 1944.

—, —, —: Survey of growth and gas production of genetic variants of *Saccharomyces cerevisiae* on different sugars, *Arch. Biochem.*, **6**: 185, 1945.

Lodder, J.: Die Hefesammlung des «Centraalbureau voor Schimmel-cultures», II Teil. Die Anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte, *Verhandel. Koninkl. Akad. Wetenschap. Amsterdam, Afdeel. Natuurk*, **32**: 1, 1934.

— y N. W. J. Kreger-Van Rij: «The Yeasts—A Taxonomic Study», Nueva York, Interscience Publishers, Inc., 1953.

Mager, J.: Studies on the polysaccharides of capsulated yeasts, *Biochem. J.*, **41**: 603, 1947.

Mrak, E. M., H. J. Phaff, y H. C. Douglas: A sporulation stock medium for yeasts and other fungi, *Science*, **96**: 432, 1942.

Nickerson, W. J., y K. V. Thimann: The chemical control of conjugation in *Zygosaccharomyces*, *Am. J. Botany*, **28**: 617, 1941; II. *ibíd.*, **30**: 94, 1943.

Phaff, H. J., y E. M. Mrak: Sporulation in yeasts, Part I, *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**: 261, 1948; Part II, *ibíd.*, **12**: 29, 1949.

Pomper, S.: Recent developments in yeast genetics, *Wallerstein Lab. Commun.*, **14**: 31, 1951.

Prescott, S. C., y C. G. Dunn: «Industrial Microbiology», Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1949.

Roelofsen, P. A., e I. Hoette; Chitin in the cell wall of yeasts, *Antonie van Leeuwenhoek*, **17**: 27, 1951.

Skinner, C. E., y R. Bouthilet: Melibiose broth for classifying yeasts, *J. Bact.*, **53**: 37, 1947.

—. C. W. Emmons, y H. M. Tsuchiya: «Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1947.

Smith, George: An «Introduction to Industrial Mycology», Londres, Edward Arnold & Co., 1942.

Spiegelman, S.: The physiology and genetic significance of enzymatic adaptation, *Ann. Missouri Botan. Garden*, **32**: 139, 1945.

— y C. C. Lindegren: A comparison of the kinetics of enzymatic adaptation in gentically homogeneous and heterogeneous populations of yeast, *ibíd.*, **31**: 219, 1944.

— y —: The relation of sporulation and the range of variation of the haplophase to populational adaptation, *J. Bact.*, **49**: 257, 1945.

—, —, y L. Hedgecock: Mechanism of enzymatic adaptation in genetically controlled yeast populations, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **30**: 13, 1944.

—, —, y G. Lindegren: Maintenance and increase of a genetic character by a substrate-cytoplasmic interaction in the absence of the specific gene, *ibíd.*, **31**: 95, 1945.

Stelling-Dekker, N. M.: Die Hefesammlung des «Centraalbureau voor Schimmelcultures» Beiträge zu einen Monographie der Hefearten. I. Teil Die Sporogenen Hefen, *Verhandel. Koninkl. Akad. Wetenschap. Amsterdam, Afdeel. Natuurk.*, **28**: 1, 1931.

Welten, H.: Wann bildet die Hefe Sporen? *Mikrokosmos*, **8**: 3, 41, 1914.

White, A. G. C., y C. H. Werkman: Fat synthesis in yeast, *Arch. Biochem.*, **17**: 475, 1948.

Wickerham, L. J., y K. A. Burton: Carbon assimilation tests for the classification of yeasts, *J. Bact.*, **56**: 363, 1948.

Will, H.: Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung, welche in Brauereibetrieben und in deren Umgebung vorkommen. VI, Die Torulaceen, *Centr. Bakt.*, Abt. II, **46**: 226, 1916.

Winge, Ö.: The relation between yeast cytology and genetics. A critique, *Compt. red. Trav. lab. Carlsberg, Série physiol*, **25**: 85, 1951.

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

— y O. Laustsen: Artificial species hybridization in yeast, *Compt. rend. travaux lab. Carlsberg, Série physiol.*, **22**: 235, 1938.

— y —: On 14 new yeast types, produced by hybridization, *ibíd.*, **22**: 337, 1939.

CAPÍTULO VI

MOHOS

Los mohos son diminutos hongos filamentosos, saprófitos o parásitos, que se reproducen mediante esporas asexuadas o sexuadas. Constituyen un extenso grupo heterogéneo de organismos con aspecto de plantas, que forma una subdivisión de las *Talófitas*, uno de los cuatro tipos del reino vegetal. Las talófitas crecen en masas irregulares de tejidos, no diferenciadas en raíces, tallos y hojas, y que se conocen por el nombre de talo.

Los mohos difieren de las algas en que no contienen clorofila, el pigmento verde que permite a las plantas sintetizar carbohidratos a base de dióxido de carbono y agua, en presencia de la luz solar como manantial de energía. Las plantas típicas son quimiosintéticas, por su capacidad de utilizar substancias simples para formar compuestos de mayor complejidad. Utilizan dióxido de carbono para formar carbohidratos y grasas, y eliminan oxígeno. En términos generales los animales son quimioanalíticos, por su facultad de desdoblar substancias orgánicas complejas en cuerpos simples, y se distinguen de las plantas porque absorben oxígeno y eliminan dióxido de carbono. Los mohos tienen estructura de plantas y son inmóviles como ellas, pero parecen estar más relacionados con los animales, por requerir oxígeno en su metabolismo y eliminar dióxido de carbono.

Los mohos poseen un talo consistente en una masa de filamentos ramificados, hifas, que en conjunto componen el micelio, y suelen ser incoloros. Las hifas que intervienen en la formación de esporas se califican de fértiles, y de vegetativas las que sirven al moho para procurarse substancias nutritivas. Las hifas fértiles se elevan en el aire, produciendo y descargando esporas; las vegetativas se introducen en el substrato, para digerir y absorber alimentos.

Estructura de las hifas. Las hifas pueden constar de una sola célula indivisa, o de muchas, separadas por tabiques transversales, llamados septos; apenas se encuentran tabiques longitudinales u oblicuos. Las hifas son tubos continuos, más o menos ramificados, de crecimiento apical en la mayoría de los mohos; pero también pueden crecer otras

células no apicales y originar ramificaciones. En algunas especies, todas las células continúan creciendo y ramificándose. Las hifas no tabicadas forman una célula grande con muchos núcleos; las tabicadas pueden albergar en cada célula uno, dos o más núcleos. Los septos no son frecuentes en los ficomicetos, salvo en los cuerpos fructíferos, aunque se encuentran a veces en cultivos viejos (fig. 80).

Los núcleos suelen ser pequeños, y en muchos hongos sólo se hacen visibles por métodos especiales de coloración. En organismos jóvenes, el citoplasma puede llenar casi toda la célula, mientras que en los viejos

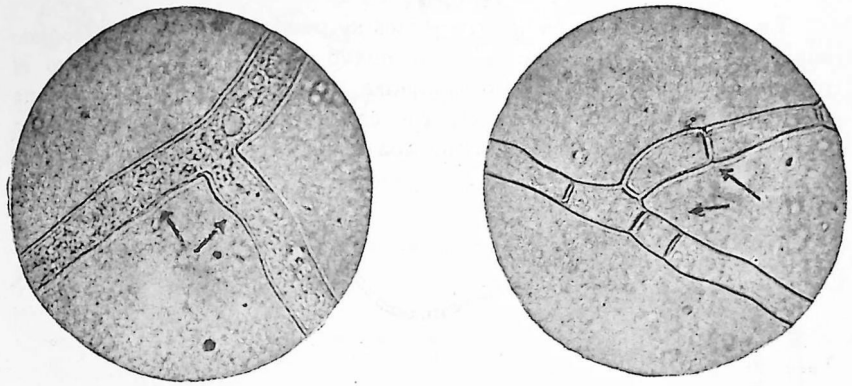


Fig. 80. — Hifas de moho: sin tabiques, a la izquierda; tabicadas, a la derecha. (Según Kurung.)

se limita muchas veces a una delgada capa junto a la membrana celular; en el centro se forma entonces una vacuola grande, llena de jugo celular incoloro. También se encuentran diversos materiales alimenticios de reserva, tales como glóbulos de grasa, glucógeno y gránulos metacromáticos o volutina (pág. 103).

Membrana celular. La membrana celular de los mohos se creía antes compuesta de una substancia similar a la celulosa y se denominaba celulosa de mohos; pero investigaciones más recientes indican que está constituída en gran parte por una glucosamina acetilada y polimerizada, conocida por quitina, con proporciones menores de otras substancias de naturaleza poco clara. También hay quitina en los caparazones de crustáceos y en los élitros de coleópteros.

Clases de hongos. Se considera, en general, que el subtipo *Hongos* comprende los *Esquizomicetos* y los *Eumicetos*; aquéllos son las bacterias, y éstos incluyen levaduras y mohos. Los *Eumicetos* se subdividen en *Ficomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos* y *Hongos imperfectos*; algunos micólogos agregan los *Mixomicetos* o mohos mucilaginosos, masas desnudas de protoplasma que reptan pausadamente sobre una superficie y engloban alimentos sólidos. Los *Hongos imperfectos* comprenden todos

los mohos en que no se ha observado una fase sexual o perfecta. En los *Basidiomicetos*, las esporas sexuadas o basidiosporas son exógenas y típicamente suman cuatro; esta clase incluye en parte los hongos grandes, carnosos, como boletos arborícolas, setas y cuescos de lobo. En los *Ascomicetos*, las esporas sexuadas son endógenas, y su número típico es ocho. Los *Ficomicetos* forman esporas sexuadas, simples o múltiples.

REPRODUCCIÓN DE LOS MOHOS

La mayoría de los mohos corrientes se pueden cultivar trasladando cualquier parte de la planta a un nuevo medio nutritivo; pero el proceso normal de desarrollo comienza con la germinación de una espora. Los mohos producen esporas en gran número, de diferentes formas y tamaños, y compuestas de una o varias células.



Fig. 81. — Germinación de conidios. (Según Wehmer.)

Una espora comprende una pared externa, epispora, y otra interna, endospora. La epispora puede ser lisa o presentar hoyos o rugosidades; la endospora encierra el protoplasma, en el que se ven gotitas de substancia oleosa o grasa y uno o varios núcleos. En condiciones favorables,

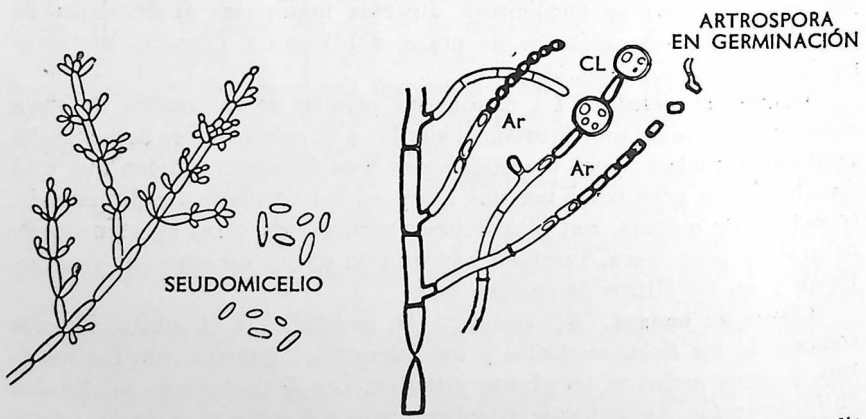


Fig. 82. — Fragmentación del talo. A la izquierda, *Candida*. Emisión de micelio para formar blastosporas. A la derecha, *Geotrichum*. Segmentación de hifas terminales para producir artrosporas; redondeo y engrosamiento de paredes celulares de un talo vegetativo, para constituir clamidosporas. (Con licencia de Plunkett y Wilson.)

la espora se hincha primero y emite luego uno o más tubos germinativos (figura 81), que se alargan y ramifican hasta formar una red de hifas o micelio. Después, en las hifas fértiles se desarrollan cuerpos esporíferos; algunas hifas presentan cuerpos fructíferos especiales, en los que se forman esporas.

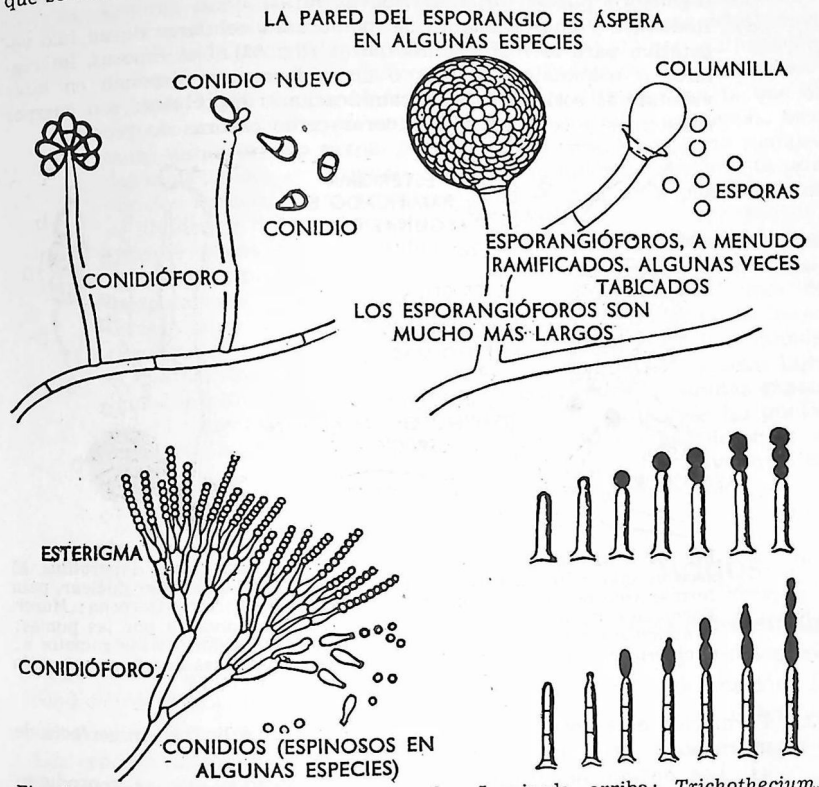


Fig. 83. — Formación de esporas asexuadas. Izquierda, arriba: *Trichothecium*, moho tabicado que se produce solamente formando esporas asexuadas, conocidas por conidios. Derecha, arriba: *Mucor*, que desarrolla una estructura cerrada o esporangio en la punta de un esporangióforo, y allí produce esporangiosporas. Izquierda, abajo: *Penicillium*, desarrollo de esporas, llamadas conidios, en el extremo de una rama de hifa o conidióforo. (Con licencia de Plunkett y Wilson.) Derecha, abajo: Formación de conidios; en la mitad superior, la espora terminal es la más vieja; en la inferior, la más joven.

Las esporas pueden ser sexuadas y asexuadas. Las primeras no son efecto de la fusión de dos gametos o células sexuales. Algunos mohos producen varios tipos de esporas, que corresponden a diversas fases de su desarrollo. Casi todos los mohos corrientes producen esporas asexuadas, y algunos las forman sexuadas además.

Tipos de reproducción en los mohos. Los tipos de reproducción en los mohos pueden clasificarse como sigue:

1.° Fragmentación del talo.
   a) Reproducción por gemación, como en las levaduras y sus análogos (página 104).
   b) Emisión de micelio para formar blastosporas (fig. 82).
   c) Segmentación de hifas terminales, seguida de redondeo y separación de los segmentos para formar artrosporas (fig. 82); los segmentos pueden originar nuevas hifas.
   d) Redondeo y engrosamiento de membranas celulares de un talo vegetativo para formar clamidosporas (fig. 82). Las esporas, intercalares o terminales, simples o en cadenas, se disponen en hifas vegetativas corrientes o en ramificaciones especiales; son cuerpos resistentes y se pueden considerar como esporas de reposo.

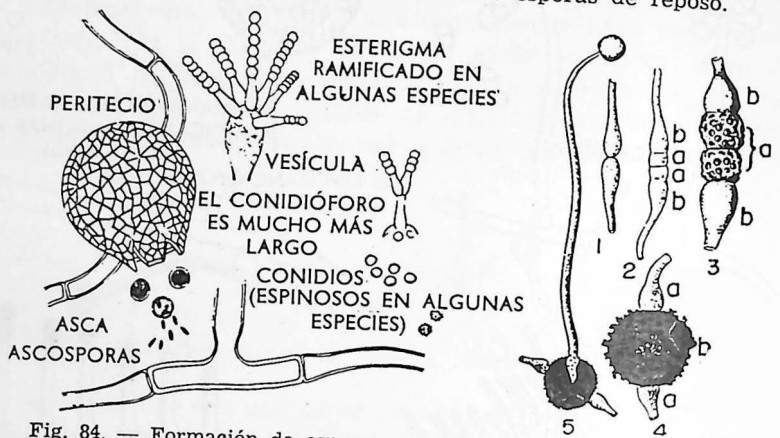


Fig. 84. — Formación de esporas sexuadas. Izquierda: *Aspergillus*. El asca es una célula madre esporífera, resultante de fusión nuclear, para formar ascosporas. (Con licencia de Plunkett y Wilson.) Derecha: *Mucor*. Formación de una cigospora: 1, dos hifas en contacto por las puntas; 2, articulación en gameto *a* y suspensor *b*; 3, fusión de los gametos *a*; 4, cigospora madura *b*, sostenida por los suspensores *aa*; 5, germinación de la cigospora. (Según Brefeld.)

2.° Formación de esporas asexuadas. Esto constituye la fase imperfecta de un moho.
   a) Los *hongos imperfectos* son mohos tabicados que se reproducen sólo por formación diversa de esporas asexuadas (fig. 83); no se conoce una fase sexuada. Los mohos se clasifican según los tipos de esporas y el modo de producirse éstas.
   b) Los *Ficomicetos* se reproducen asexualmente, por formación de una estructura cerrada o esporangio en la punta de un esporangióforo; dentro del esporangio se producen esporangiosporas (fig. 83).
   c) Los *Ascomicetos* desarrollan esporas de paredes delgadas en la punta de una rama de hifa o conidióforo; tales esporas se conocen por conidiosporas o conidios (fig. 83) y pueden desprenderse del extremo del conidióforo o brotar de las conidiosporas ya existentes, en vez de hacerlo directamente del conidióforo (fig. 83). En el primer caso la espora más alta es la más antigua y mayor; en el segundo, es la más joven y diminuta.
3.° Formación de esporas asexuadas. Esto constituye la fase imperfecta de un moho. Las esporas provienen de fusión nuclear y se constituyen dentro de células especializadas o sobre ellas. Con frecuencia se fusionan hifas, pero ello no es indicio obligado de sexualidad.
   a) Esporas sexuadas de *Ficomicetos*. Fusión de gametos desiguales en una célula grande, para formar oosporas, o bien de gametos iguales, para formar cigosporas (fig. 84). Las esporas son simples en unos casos y múltiples en otros.
   b) Esporas sexuadas de *Ascomicetos*. El asca es una célula madre esporífera, resultante de fusión nuclear, para formar ascosporas por división reductriz (fig. 84). Se producen: 1, por conjugación directa, como en las levaduras; 2, por fusión de dos células micélicas; 3, por fusión de órganos sexuales definidos, en la que el oogonio se convierte en asca; 4, a partir de hifas ascógenas, brotadas de un órgano sexual binucleado. El asca joven tiene siempre dos núcleos, que se fusionan, y el núcleo diploide experimenta una división reductriz para proporcionar cuatro núcleos haploides; éstos se dividen y dan típicamente ocho esporas.
   c) Esporas sexuadas de *Basidiomicetos*. No hay órganos sexuales. El basidio típico es mazudo, no segmentado, y lleva cuatro basidiosporas exógenas. Al principio, los basidios son extremos de hifas compuestas de células binucleadas; al crecer éstas, lo hacen también los núcleos, que se fusionan y forman un núcleo diploide, el cual se divide luego dos veces para formar cuatro núcleos hijos haploides. En el ápice del basidio aparecen cuatro diminutas expansiones (esterigmas), que se prolongan, y a cada una de las puntas infladas pasa un núcleo; una vez maduras, las basidiosporas se desprenden. El basidio es semejante a una asca, salvo que las esporas se producen fuera y no dentro del receptáculo.

RESISTENCIA DE LAS ESPORAS DE MOHOS

Los mohos son causa de enormes pérdidas domésticas e industriales, en particular porque producen innumerables esporas muy resistentes a condiciones desfavorables del medio, como calor, frío, desecación, luz ultravioleta, presión osmótica elevada y deficientes reservas nutritivas. Las esporas de mohos resisten más el calor que el micelio, y menos, en general, que las esporas bacterianas.

El viento y las corrientes de aire diseminan con facilidad las esporas, y por eso se encuentran de ordinario en los laboratorios, donde son causa frecuente de contaminaciones de cultivos y medios nutritivos. Esto obliga a mantener cerradas las ventanas, para que el viento no agite el polvo y las esporas en la atmósfera de los laboratorios.

Los mohos abundan particularmente en sitios húmedos, pues sus esporas no germinan en un ambiente seco. Muchos productos industriales, como papel, cuero, tejido y substancias alimenticias, absorben fácilmente la humedad de la atmósfera y así se exponen al ataque de los mohos. Para disminuir este peligro, conviene evitar todo exceso de humedad en laboratorios y otros locales.

Los mohos son mucho menos delicados que las bacterias y pueden

reproducirse y crecer en condiciones que éstas no soportan. Así se explican los daños que ocasionan en conservas de frutas, jaleas, adobos, mantequilla, queso, carnes saladas, desecadas y ahumadas, frutas y hortalizas. Richards (1949) comunicó el aislamiento y la identificación de varias especies de mohos en las superficies de vidrio de instrumentos ópticos; si no se retiran las colonias de mohos, la humedad acabará por deteriorar la superficie y dejarla corroída o levantada en el sitio que ocupan. Los mohos no se reproducen sin aire (u oxígeno) y por eso no pueden desarrollarse en los alimentos enlatados del comercio. Esto se discutirá con más detalle en los respectivos capítulos.

CLASIFICACIÓN DE LOS MOHOS

Los mohos se clasifican según principios generales análogos a los aplicados para las bacterias (pág. 454). A continuación ofrecemos una clasificación resumida de los géneros y especies más comunes.

Clase I. *Ficomicetos.* Micelio vegetativo, típicamente exento de tabiques, que suelen formarse con ocasión del desarrollo de estructuras reproductivas, o en hifas ya viejas. Esporangios con esporangiosporas móviles o inmóviles, o conidios; oosporas o cigosporas formadas a veces después de la fecundación y a veces sin fusión previa de gametos o gametangios. Unos son parásitos y otros saprófitos.

Orden. *Mucorales.* Multiplicación eventual por esporangiosporas. Esporangios globosos a ovoides, habitualmente con numerosas esporas, a veces con una o muy pocas. Cigosporas formadas por la conjunción de dos gametangios, en columnilla, desnudas o cubiertas de excrecencias de su propia membrana o de las de sus suspensores. Los esporangios principales contienen esporas en número considerable.

Familia. *Mucoráceos.* En ramas laterales de los principales esporangióforos se desarrollan esporangiolos. Esporangios de una sola clase; esporangióforo simple o ramificado, pero la dicotomía no se repite. Suspensores sin apéndices en la madurez.

Género 1.º *Mucor.* Se admiten tres tipos principales de ramificación: los simples, con esporangióforos generalmente no ramificados; los racemosos, con pedicelo de ramas laterales, y los cimosos, con esporangióforos típicamente ramificados.

Sin estolones; esporangios solitarios y terminales.

Esporangióforos generalmente no ramificados (monomúcores):

M. mucedo. Columnilla piriforme a cilíndrica; esporangio brisáceo; sin artrosporas ni clamidosporas.

M. hiemalis. Columnilla esférica; esporangio aceitunado a pardo grisáceo en la madurez.

M. rammanianus. Columnilla esférica; esporangio rojizo.

M. piriformis. Columnilla piriforme; esporangios muy grandes.

Esporangióforos con pedicelo y ramas laterales secundarias (racemomúcores):

M. racemosus. Columnilla ovoide o piriforme. El micelio sumergido se fracciona en células como las de levadura o artrosporas, que germinan por gemación; clamidosporas negras formadas en el micelio aéreo; células como de levadura, capaces de fermentación alcohólica del azúcar.

M. erectus. Columnilla esférica; esporangio amarillogrisáceo. Similares al *M. racemosus,* excepto en la forma de la columnilla.

M. fragilis. Columnilla esférica; esporangio negro. Similar al *M. racemosus,* excepto en la forma de la columnilla.

Esporangióforos típicamente ramificados (cimomúcores):

M. spinosus (plumbeus). Columnilla espinosa; esporas con púas; micelio gris plomizo.

M. circinelloides. Esporangios en dos filas, con esporas esféricas y elipsoidales alternadas. El micelio sumergido se fragmenta en células como de levadura o artrosporas, que germinan por gemación.

M. alternans. Esporangios en dos filas, alternados; esporas más largas, elipsoidales.

M. ambiguus. Esporangios de origen irregular.

M. rouxii. Columnilla esférica; esporas grandes y ovoides. En el micelio aéreo aparecen clamidosporas negras, y células gemíparas en las partes sumergidas. Contienen las enzimas necesarias para convertir almidón en azúcar, y éste en alcohol; se emplea en la fabricación de alcoholes.

Género 2.º *Rhizopus.* Micelio aéreo rastrero o estoloniforme.

R. nigricans. Es el moho negro común del pan.

R. oryzae. Empleado para hidrolizar almidón y transformarlo en azúcar.

R. japonicus. También se emplea en la transformación hidrolítica de almidón en azúcar.

Clase II. *Ascomicetos.* Con excepción de las levaduras, todos poseen micelio bien desarrollado, de hifas ramificadas y tabicadas. Las células del micelio tienen uno o varios núcleos. Multiplicación por conidios y por clamidosporas, pero más característica por ascosporas; una asca suele contener ocho esporas, rara vez menos o más. Algunas especies de *Aspergillus, Penicillium* y *Alternaria* producen ascosporas y deberían incluirse aquí (fig. 85). Sin embargo, no se han identificado ascas en la gran mayoría de las especies, y por eso se agrupan todas, por razones de conveniencia, entre los *Hongos imperfectos.*

Clase III. *Basidiomicetos.* Todos tienen micelio bien desarrollado y producen basidiosporas, que nacen por fuera sobre la célula madre o basidio; éste, cuando es joven, contiene dos núcleos, que se fusionan y luego se dividen para proporcionar los núcleos de las esporas. Se forman éstas sobre un esterigma, por el cual se traslada el núcleo del basidio a la espora en curso de desarrollo. Las basidiosporas son unicelulares, redondas u ovoides y están asimétricamente unidas a sus esterigmas, de ordinario con una pared lisa, más bien delgada. En algunas especies se ven esporas equinuladas.

Clase IV. *Hongos imperfectos.* Método característico de reproducción por conidios. En algunas especies puede haber artrosporas y clamidosporas; no producen esporangiosporas, ascosporas ni basidiosporas.

Orden. *Moniliales.* Conidióforos libres, que brotan irregularmente del micelio.

Familia 1.ª *Moniliáceas*. Hifas incoloras, o de colores pálidos o brillantes.
Género 1.º *Trichotecium (Cephalothecium)*. Esporas bicelulares, en pequeños agregados, al extremo de conidióforos erectos.
T. roseum. Moho rosado común de la fruta podrida; a veces contamina los medios de cultivo en laboratorios.

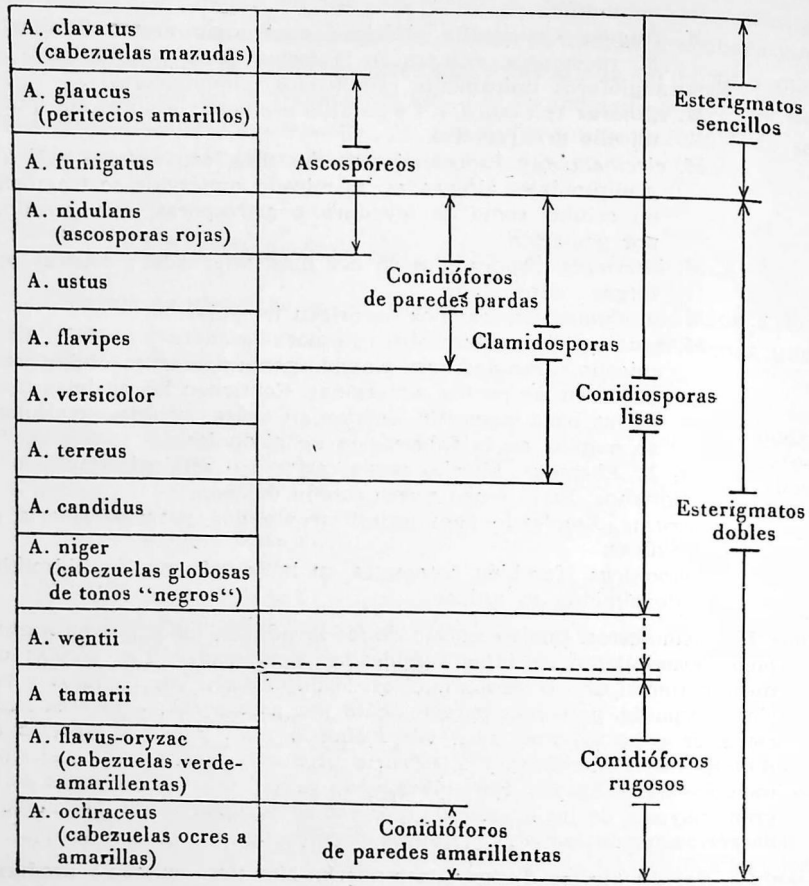


Fig. 85. — Relaciones naturales entre los grupos del género *Aspergillus*. (Adaptado de Thom y Raper.)

Género 2.º *Geotrichum*. Reproducción regularmente por fragmentación del micelio en artrosporas; no produce blastosporas, a no ser por excepción.
G. candidum. Se encuentra comúnmente en la leche y el queso; da sabor y aroma a muchos tipos de quesos.
Género 3.º *Candida (Monilia)*. Reproducción por fragmentación del micelio en blastosporas; no producen artrosporas. Colonias secas, planas y rugosas en agar de Sabouraud; película gruesa en medios líquidos.
C. krusei (M. krusei). Colonias húmedas y cremosas en agar de Sabouraud; película ligera o nula en medios líquidos.

C. parakrusei (parapsilosis). Fermenta glucosa sólo de carbohidratos.
C. tropicalis (M. candida). Fermenta glucosa, maltosa y sacarosa; no fermenta lactosa ni rafinosa.
C. pseudotropicalis (M. mortifera). Fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, pero no maltosa ni rafinosa.
C. guilliermondi (M. guilliermondi). Fermenta glucosa, sacarosa y rafinosa.
C. albicans (M. albicans). Fermenta glucosa, pero no sacarosa; blastosporas en agregados densos.

Género 4.º *Aspergillus*. El micelio vegetativo consta de hifas tabicadas, ramificadas, incoloras o coloreadas. Los conidióforos brotan de células basilares especializadas, usualmente sin tabiques, terminadas en una dilatación que sustenta los esterigmas. Conidios en cadenas formadas por separación de esterigmas; varían mucho de color, tamaño, forma y señales distintivas. En algunos de los siguientes grupos se encuentran peritecios (son desconocidos en la mayoría de las especies), los cuales producen ascas y ascosporas en pocas semanas.
A. clavatus. Cabezas conídicas, mazudas, de color verdeazulado pálido; conidióforos generalmente toscos, de paredes lisas, incoloros; conidios elípticos, lisos, de paredes gruesas.
A. glaucus. Peritecios amarillos, de paredes delgadas, suspendidos en redes de hifas rojas o amarillas. Las ascas contienen ocho ascosporas lenticulares, lisas o de paredes rugosas. Conidióforos de paredes lisas, terminados en vesículas cupuliformes; conidios elípticos a subglobosos, uniformemente ásperos.
A. fumigatus. Cabezas conídicas columnares, verdes y verdeoscuras; vesículas lageniformes. Conidióforos de paredes lisas, generalmente verdes; conidios globosos, equinulados, verdes.
A. nidulans. Cabezas conídicas columnares cortas, generalmente de color verde oscuro. Conidióforos de paredes lisas, terminados por vesículas cupuliformes o hemosféricas. Suele tener peritecios. Ascosporas de color rojo purpúreo; conidios globosos.
A. ustus. Conidióforos pardoamarillentos, lisos. Cabezas conídicas irregulares; vesículas hemisféricas; conidios ásperos, de color verdeazulado pálido a pardo intenso.
A. flavipes. Conidióforos lisos, de color amarillo, limitado con frecuencia a la capa externa. Cabezas dolioliformes a columbares; vesículas subglobosas a elípticas. Conidios incoloros, lisos, de paredes delgadas.
A. versicolor. Cabezas conídicas hemisféricas a casi globosas, generalmente verdes o verdeazuladas. Conidióforos lisos, incoloros, más o menos sinuosos; vesículas globosas a elípticas. Conidios globosos o subglobosos, equinulados.
A. terreus. Cabezas columnares, de tonos ante pálidos o encarnado claro. Conidióforos lisos, incoloros; vesículas hemisféricas, con la porción superior cubierta de esterigmas; conidios pequeños lisos, globosos o ligeramente elípticos.
A. candidus. Cabezas conídicas blancas, o cremosas al envejecer, globosas, pero casi columnares si son pequeñas. Conidióforos lisos, incoloros o ligeramente amarillos; conidios lisos, globosos o subglobosos.
A. niger. Cabezas conídicas negras, negroparduscas o pardopurpú-

reas. Cabezas grandes, globosas. Conidióforos lisos, incoloros o algo pardoamarillentos; vesículas globosas en cabezas grandes, y con remate cupuliforme en las pequeñas; conidios ásperos, generalmente con rayas o bandas de color negropardusco.

A. wentii. Cabezas conídicas grandes, globosas, de colores muy variados. Conidióforos de paredes lisas o poco menos, a menudo finamente rugosas; vesículas globosas; conidios en general, elípticos, lisos o algo ásperos, según las especies.

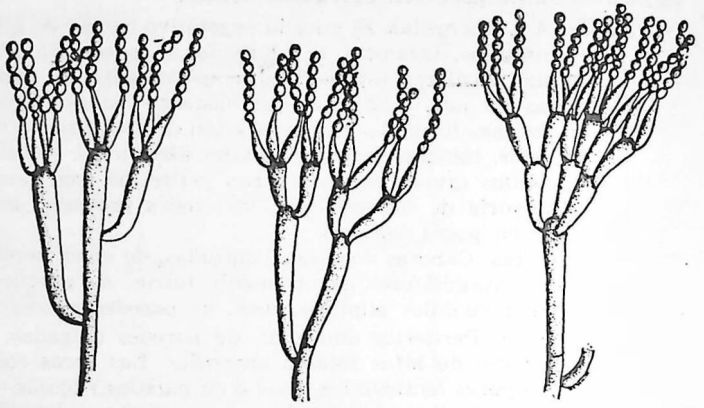


Fig. 86.— Ramificación de cabezas conídicas en el género *Penicillium*. Izquierda: monoverticilada; centro: biverticilada; derecha, poliverticilada. Descripción, en el texto.

A. tamarii. Cabezas conídicas radiadas, hemisféricas a globosas, de color pardoamarillento o pardoaceitunado. Conidióforos incoloros, ásperos en toda su longitud o en parte de ella; vesículas globosas a subglobosas; conidios de paredes gruesas, ásperos, elípticos, piriformes o subglobosos.

A. flavus-oryzae. Conidióforos incoloros, ásperos o con hoyuelos. Cabezas hemisféricas a columnares o subglobosas; vesículas hemisféricas a cupuliformes en cabezas pequeñas, globosas en las grandes; conidios ásperos, de diversos colores.

A. ochraceus. Cabezas conídicas amarillas a ocráceas. Cabezas globosas o radiadas, con cadenas conídicas, por lo general adheridas en columnas divergentes. Conidióforos amarillentos; conidios de paredes delgadas y lisas en algunas series, y en otras equinulados y de paredes dobles.

Género 5.º *Penicillium.* Conidios derivados de esterigmas, que a su vez provienen de ramas cortadas *(metulae)* que brotan de puntas de conidióforos. Se dividen en cuatro grupos, a base del tipo de ramificación de las cabezas conídicas: 1, asimétricas; 2, monoverticilada, con un solo verticilo de esterigmas en la punta del conidióforo; 3, biverticilada, con verticilos de esterigmas originados en dos ramas disétricas; 4, poliverticilada, con verticilos de esterigmas que arrancan de tres o más ramas simétricas (figura 86).

P. camemberti. Se encuentra en los quesos de Camembert y de Brie; colonias coposas, de color blanco o verdegrisáceo.

P. brevicaule. Se encuentra en los quesos de Camembert y de Brie; zonas de color pardoamarillento; esporas rugosas.

P. roqueforti. Se encuentra en el queso de Roquefort; forma rayas verdes en el interior del queso.

P. italicum. Produce una ligera putrefacción de frutos del género *Citrus*; colonias verdeazuladas.

P. digitatum. Ocasiona retracción y desecación de frutos agrios infectados; colonias de color apagado verdeamarillento o verdeaceitunado.

P. expansum. Produce una ligera putrefacción en manzanas y peras; colonias verdeazuladas.

P. notatum. Produce penicilina, de uso comercial.

P. chrysogenum. Produce penicilina, de uso comercial.

Familia 2.ª *Dematiáceas.* Micelio, esporas, o ambos, de color pardo, oscuro a negro; conidióforos sueltos, no apretados.

Género 1.º *Cladosporium.* Las esporas aumentan por gemación, formando cadenas ramificadas; son unicelulares, pero se hacen bicelulares en cultivos viejos.

C. herbarum. Se encuentra en el papel viejo, la paja y materiales análogos.

Género 2.º *Alternaria.* Esporas pluricelulares en forma de maza o en cadenas.

A. tenuis. Se halla en semillas enmohecidas y en el suelo. Es frecuente en el aire de laboratorios.

MORFOLOGÍA DE LOS MOHOS COMUNES

Se han descrito varios centenares de géneros y millares de especies de mohos (80.000 por lo menos), aunque son pocos los comunes y frecuentes, y éstos pueden reconocerse con facilidad. Entre ellos se cuentan: *Mucor, Rhizopus, Cephalothecium (Trichothecium), Geotrichum, Candida (Monilia), Aspergillus, Penicillium, Cladosporium y Alternaria.* He aquí sus características respectivas:

Mucor. Es el género más numeroso del orden *Mucorales,* y sus especies se encuentran en desperdicios vegetales y en el pan. El micelio vegetativo, generalmente blanco, penetra en la substancia alimenticia y emite al exterior filamentos largos y delgados, que se conocen por hifas aéreas. Cerca de la punta de cada hifa se forma un tabique. La célula terminal de la hifa se dilata hasta formar una columnilla redonda, cilíndrica o piriforme; entonces se desarrolla una estructura globular o esporangio en torno a la columnilla, y dentro de ella se originan numerosas esporangiosporas asexuadas. Los esporangios son casi negros; la pared del esporangio maduro se abre fácilmente, descargando las esporas que contiene. Cada espora es capaz de repetir el ciclo (fig. 83).

En ciertas condiciones, a la formación de esporas precede la conjugación de dos células de distintas hifas, y se desarrolla una cigospora; ésta es la reproducción sexual. De la cigospora madura surge un tubo germinativo, en cuyo extremo se forma un esporangio (fig. 84).

La separación de las diversas especies se basa en la longitud y el diámetro de los esporangióforos; en el tipo de ramificación, si existe; en el tamaño y el color de los esporangios; en el carácter de la membrana esporangial, en las características de las cigosporas y las clamidosporas, cuando las hay; en el tamaño y la forma de las esporas, y en los caracteres generales de la colonia, tales como el color y la altura que alcanzan las partes aéreas.

Rhizopus. Los miembros de este género son corrientes y con frecuencia causan infecciones en los laboratorios, en cuyos medios de cultivo se desenvuelven con gran rapidez. Los mohos se propagan ampliamente

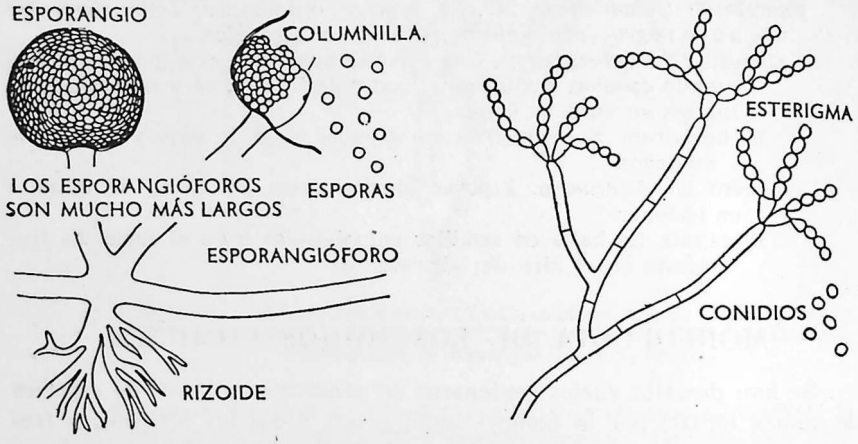


Fig. 87. — Izquierda: *Rhizopus*; derecha: *Cladosporium*. Véase la descripción en el texto. (Con licencia de Plunkett y Wilson.)

por medio de hifas rastreras a modo de estolones, y los tubos de cultivo y las placas de Petri no tardan en llenarse de un denso micelio algodonoso. Las especies de este género se distinguen fácilmente de las del género *Mucor* por la presencia de estolones, que a menudo alcanzan varios centímetros de longitud y presentan unos manojos de hifas radiciformes o rizoides, que emergen de los puntos donde los estolones se ponen en contacto con el medio o con la superficie del vidrio. La columnilla es hemisférica, no redonda, cilíndrica o piriforme como en los *Mucor*, y se hallan en una expasión acopada del esporangióforo, denominada apófisis. Las esporas pueden ser ovoides, poligonales o estriadas. Estos mohos suelen ser más grises, y su crecimiento es más exuberante que el de los *Mucor* (fig. 87).

Cephalothecium (Trichothecium). Este género comprende varias especies, si bien sólo una es corriente, el *C. roseum*. Las colonias son tenues, amplias y coposas, de color blanco al principio, que poco a poco se vuelve rosado pálido. Los conidióforos sostienen agregados de esporas

ligados al ápice; las esporas son ovoides, con una protuberancia o verruga en el punto de inserción, y constan de dos células; la más próxima al conidióforo es también la más pequeña (fig. 83). Esta especie se halla muy difundida y se encuentra en frutos, madera, papel, plantas y en el suelo.

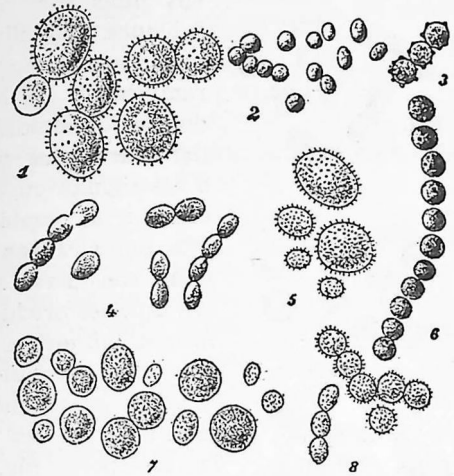


Fig. 88. — Conidios de varias especies de *Aspergillus*. 1, *A. glaucus*; 2, *A. fumigatus*; 3, *A. niger*; 4, *A. clavatus*; 5, *A. tokelau*; 6, *A. varians*; 7, *A. oryzae*; 8, *A. wentii*. (Según Lafar.)

Geotrichum. La especie más conocida es el *G. candidum*, que se encuentra en diversos productos lácteos. Se desarrolla fácilmente en la leche o en agar-malta, donde origina una delgada vegetación mucilaginosa. Las colonias en agar son de color blancocremoso. En cultivos recientes se ven largas hifas filamentosas, mientras que en los viejos se dividen éstas en cortos fragmentos rectangulares, denominados artrosporas, cada uno de los cuales da por germinación una nueva planta (figura 82).

Candida (Monilia). Los miembros de este género son esencialmente organismos parecidos a levaduras y tienden a formar micelio en medios de cultivo pobres en substancias nutritivas. Los cultivos recientes en agar glucosado muestran a veces una vegetación blanca, pastosa, compuesta enteramente de células gemíparas redondas u ovoides, como de levadura; los cultivos viejos en agar pueden presentar filamentos delgados que penetran en el medio. Al microscopio se distinguen filamentos y células gemíparas como de levadura. En algunos cultivos por picadura en gelatina nutritiva se ven estas células en la superficie, y a lo largo de la picadura se observan ramilletes de micelio que irradian a la gelatina.

Aspergillus. Las especies de este género abundan relativamente en el aire, y se hallan universalmente sobre casi todos los tipos de subs-

tratos. Los hay en desperdicios de frutas, hortalizas, granos, pan y otros productos alimenticios en descomposición, y es frecuente observarlos en medios de cultivo imperfectamente esterilizados. Su color puede variar mucho, y ser verde, amarillo, anaranjado, negro o pardo; tienen aspecto polvoriento y, en marcado contraste con los mohos del género *Mucor*, sus hifas son ramificadas y con tabiques, dilatadas por los extremos, para formar conidióforos no ramificados. En los ápices hinchados de los conidióforos se desarrollan numerosos pedúnculos cortos o esterigmas, cuyas puntas emiten cadenas de conidiosporas o conidios, que alcanzan a veces una longitud considerable (fig. 88). Algunas especies producen peritecios esféricos, cilíndricos o lageniformes, huecos, que contienen las ascas y se abren generalmente por un poro terminal; en las ascas se hallan las ascosporas (fig. 84).

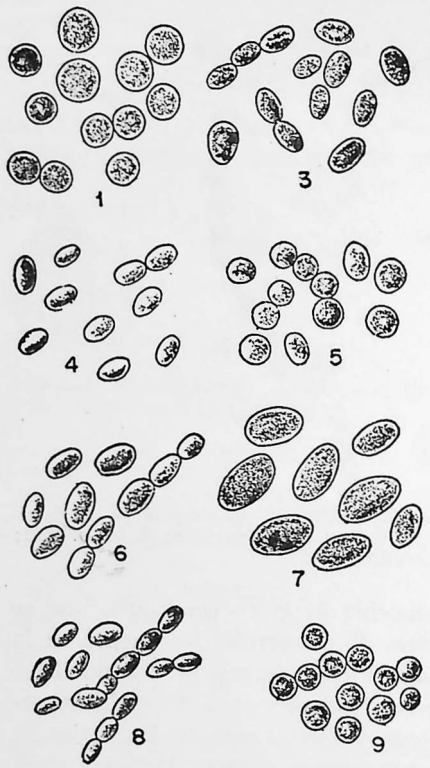


Fig. 89. — Conidios de varias especies de *Penicillium*. 1, *P. camemberti*; 2, *P. purpurogenum*; 3, *P. claviforme*; 4, *P. rubrum*; 5, *P. italicum*; 6, *P. olivaceum*; 7, *P. luteum*; 8, *P. glaucum*. (Según Lafar.)

La monografía de Thom y Raper (1945) contiene más información sobre los mohos del género *Aspergillus*.

Penicillium. Los mohos de este género son muy afines a los del anterior y también se hallan muy difundidos en la Naturaleza. El género comprende los característicos mohos de color verdeazulado que se observan con gran frecuencia en frutos agrios y otros, y en hortalizas, granos, heno, infusiones orgánicas, quesos y algunos productos alimenticios más (fig. 83). El micelio vegetativo penetra en las substancias, y luego aparecen hifas aéreas o conidióforos; éstos se ramifican una o más veces desde la misma articulación, y originan un agregado terminal de hifas paralelas, conocidas por esterigmas, cada una de las cuales emite una cadena de conidios (fig. 89).

Algunas especies son nocivas, y útiles otras. Probablemente las de mayor importancia son *P. roqueforti* y *P. camemberti*, causa de las características transformaciones que experimentan algunos quesos, como los de Roquefort, Camembert, Gorgonzola y otros análogos. Los *Penicillium* se emplean en la fabricación de un número considerable de productos comerciales importantes, que estudiaremos al tratar de la bioquímica de los mohos (pág. 149).

Las especies de *Penicillium* son más difíciles de clasificar que las del género *Aspergillus*. Sus conidios presentan menos variedades de color, pues si bien éste cambia según las condiciones del medio y la edad de los cultivos, la mayoría de las especies son de matiz verdoso durante el período de crecimiento activo; además, las especies de *Penicillium* son mucho más numerosas.

Para completar la información sobre los mohos del género *Penicillium*, remitimos a la monografía de Raper y Thom (1949).

Cladosporium. La especie más importante de este género es el *C. herbarum*, ampliamente difundido, pues se encuentra en gomas, cueros, tejidos, alimentos, en el suelo y en hojas en descomposición, paja y otros vegetales de la superficie (fig. 87). En medios de cultivo produce una gruesa capa aterciopelada, cuyo color varía de un verde intenso a pardo-grisáceo oscuro.

Las primeras esporas se desarrollan directamente de los extremos de los conidióforos y luego se forman otras por gemación de conidios ya existentes. Esto da origen a una cadena de esporas, de las cuales la más joven es la terminal. Las esporas jóvenes suelen ser monocelulares; las viejas constan a menudo de dos células.

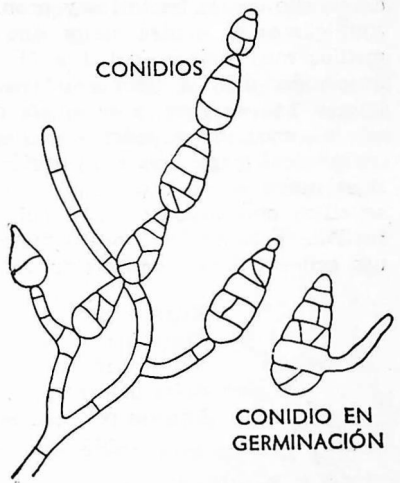


Fig. 90. — *Alternaria*. Véase la descripción en el texto. (Con licencia de Plunkett y Wilson.)

Alternaria. Las especies de este género se encuentran generalmente en compuestos orgánicos, pero se han aislado formas parásitas de plantas cultivadas. En medio de cultivo, estos organismos crecen con rapidez y producen un micelio denso, coposo, de color verde aceituna o pardo, tabicado, que puede formar conidiosporas grandes, hinchadas, de color pardoverdoso a pardoscuro (fig 90). Los conidios constan de más de una célula, y su forma varía de ovoide a mazuda, con un pico pronunciado en la punta; las esporas componen cadenas cortas, a veces con cortos trechos de micelio entre ellas.

Véase información suplementaria acerca de mohos en Smith (1942), Skinner, Emmons y Tsuchiya (1947), y Wolf y Wolf (1947).

TÉCNICA DE LABORATORIO

Para poder estudiar detenidamente los mohos es necesario disponer de ellos en cultivos puros. Los métodos empleados para aislarlos y estudiarlos así, son, en general, semejantes a los que sirven para las bacterias (pág. 160).

Medios de cultivo. Muchas son las clases de medios, tanto sólidos como líquidos, que se emplean para cultivar mohos, pero son pocos los de uso general. Comúnmente se utilizan con este fin vegetales y extractos de vegetales, azucarados o no. Los medios sólidos pueden componerse de substancias que lo sean, como patatas, zanahorias y judías, o de líquidos solidificados por adición de agar o de gelatina. Los mohos suelen desarrollarse más despacio que las bacterias. Si existen unos y otras en el material que ha de examinarse, es de esperar que las bacterias se reproduzcan más de prisa, y así resulta difícil o imposible obtener cultivos puros aislados de mohos; esto se puede evitar haciendo los medios de cultivo desfavorables para el desarrollo de las bacterias y propicios al de los mohos. Como éstos toleran condiciones de acidez mejor que las bacterias, generalmente se preparan medios muy ácidos (pH 2 a 5). Un medio sólido útil de uso general se conoce por agar de Sabouraud; se compone de 2 % de glucosa, 1 % de peptona y 2 % de agar, y se ajusta a un pH de 5,6.

Algunos investigadores prefieren emplear medios compuestos de sales inorgánicas puras, de composición constante y rigurosamente comparables si se preparan en distintos laboratorios. Uno de los medios sintéticos más sencillos empleados para el cultivo de mohos es la solución de Czapek, fácil de preparar y probablemente tan buena como otra cualquiera para uso general. Una modificación de la primitiva fórmula es la siguiente:

Nitrato sódico.	2 g
Cloruro potásico	0,5 g
Sulfato magnésico	0,5 g
Sulfato ferroso.	0,01 g
Fosfato potásico ácido	1 g

Agua destilada, hasta 1000 ml.

Se pueden añadir diversos carbohidratos, tales como glucosa o sacarosa; generalmente, 50 g de glucosa o 30 g de sacarosa. Este medio es ácido (pH 4,2), desfavorable para el desarrollo de la mayoría de las bacterias, y puede solidificarse añadiendo 20 g de agar por litro. Probablemente es el medio sólido más útil de los empleados para el cultivo de mohos.

Aislamiento y purificación de mohos. Los mohos se purifican de un modo fácil y satisfactorio por los procedimientos de cultivo en estrías y de difusión, utilizados para separar y propagar especies bacterianas, y que se exponen con detalle en la página 161.

Métodos microscópicos. Proporciona amplia información un primer examen en seco, bajo un objetivo de pocos aumentos, de los cultivos vivos. Éstos se colocan sobre la platina del microscopio en placas de Petri destapadas y se examinan con luz transmitida o refractada. Así se estudian con facilidad micelios aéreos, conidióforos, cuerpos fructíferos, cadenas de esporas y otros elementos, y se adquiere una idea preliminar de los que debe mirarse al examinar preparaciones sobre portaobjetos, pues los mohos se deterioran al menor descuido.

Para el examen con grandes aumentos son necesarias las preparaciones.

Las muestras de mohos se retiran muy difícilmente de sus medios de cultivo sin grave daño, y se requiere gran cuidado para montarlas de manera satisfactoria. No debe utilizarse agua con este objeto, porque se evapora en seguida, ocasiona retracción de las hifas por osmosis y hace que las diversas partes se aglomeren y confundan, con lo que las preparaciones no sirven para una observación minuciosa. Probablemente, el medio líquido más útil para los montajes es el lactofenol, cuya composición es la siguiente:

Fenol cristalizado	20 g
Ácido láctico	20 g
Glicerina	40 g
Agua destilada	20 g

Primero se disuelve el fenol en el agua, y luego se añaden el ácido láctico y la glicerina.

Este líquido no hace encogerse las células, ni se evapora, lo cual permite obtener preparaciones duraderas. Se le puede añadir un colorante para teñir las diversas partes del moho, sobre todo si interesa impresionar fotografías de las preparaciones.

Los mohos se montan poniendo primero una gota de lactofenol en el centro de un portaobjetos limpio. Se toma del cultivo una pequeña porción y se coloca en la gota; con un par de agujas se disgregan suavemente las diversas partes, hasta que se humedezcan bien, y a continuación se aplica un cubreobjetos, procurando que no queden burbujas de aire interpuestas.

En las monografías de Skinner, Emmons y Tsuchiya (1947), Smith (1942) y Wolf y Wolf (1947) se exponen magistralmente los métodos micológicos.

BIOQUÍMICA DE LOS MOHOS

En el mundo industrial es de gran importancia la actividad bioquímica de los mohos. Tal vez no sean tan principales en este aspecto como las levaduras y las bacterias, pero lo cierto es que provocan ciertas transformaciones que no son capaces de realizar los otros dos grupos de hongos. Entre los cambios bioquímicos de más relieve producidos por mohos se cuentan los siguientes:

Fermentación alcohólica. El alcohol suele obtenerse industrialmente por fermentación de diversos azúcares mediante levaduras (pág. 421). Las materias primas son azúcares tales como el de caña (sacarosa), melazas, zumos de frutas y glucosa, y también varios almidones o féculas (de patata, maíz, malta, cebada, trigo, arroz, etc.) y celulosa. Para ser transformados por fermentos, los almidones y otros polisacáridos han de hidrolizarse previamente, a fin de reducir los azúcares solubles.

En general, los métodos de sacarificación de carbohidratos complejos requieren el empleo de enzimas, de ácidos diluídos o de una combinación de ambos. Diversos mohos, bacterias y plantas elaboran la enzima o las enzimas necesarias para sacarificar almidones y otros polisacáridos,

después de lo cual ciertas levaduras pueden convertir azúcares en alcohol por fermentación. Takamine (1914) recomendaba utilizar takadiastasa (Taka-koji), que se obtiene cultivando *Aspergillus oryzae* sobre salvado esterilizado (véase Underkofler y Fulmer, 1943).

Varias especies de *Mucor* pueden fermentar almidón directamente a alcohol. Los mohos segregan amilasa (diastasa) y cimasa; la amilasa es una enzima que por hidrólisis transforma almidón en azúcar, y cimasa es el nombre aplicado a un grupo de fermentos y cofermentos que convierten azúcar en alcohol. El *Mucor rouxii* produce más alcohol que ninguna otra especie de este género, y generalmente se prefiere para ese objeto. En Oriente se utiliza para preparar bebidas alcohólicas de arroz; mezclado con harina de arroz se expende como levadura china. Alrededor de 5 % de alcohol se obtiene al final de la fermentación.

Ácido cítrico. Este ácido es un componente de los frutos del género *Citrus* y otros. Scheele, en 1784, fué quien primero lo aisló y cristalizó a partir del zumo de limón.

Wehmer (1893) demostró que dos especies de *Citromyces* (ahora *Penicillium*) eran capaces de hacer fermentar azúcar y producir así ácido cítrico. Después se comprobó que muchas especies de mohos producen ácido cítrico en cantidades variables, pero nunca suficientes para que el método compita con la extracción de ácido cítrico de limones y otros frutos agrios. Currie (1917) descubrió que el rendimiento podría hacerse mucho mayor empleando el moho *Aspergillus niger*; este moho se emplea hoy comercialmente, y en muchos lugares resulta tan barato preparar ácido cítrico con él como extrayéndolo de sus fuentes naturales.

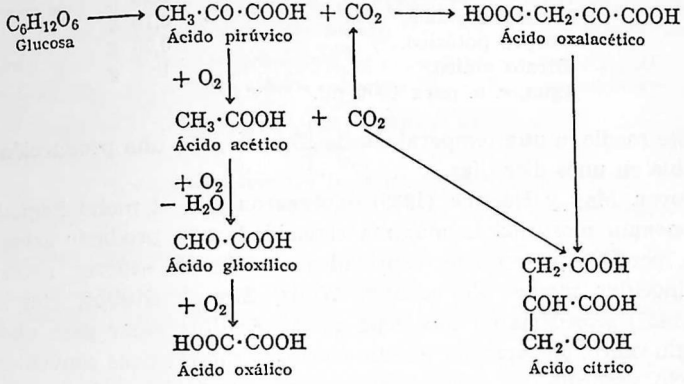
Los carbohidratos apropiados para la fermentación cítrica comprenden almidón, sacarosa, glucosa, frutosa, lactosa, azúcar invertido, maltosa, melazas y glicerina, alcohol superior. Los dos factores que más influyen en la producción de ácido cítrico son la aportación de oxígeno y la composición del medio. Los mohos son resueltamente aerobios y requieren una provisión abundante de oxígeno, y para que el hongo se desarrolle bien se necesitan nitrógeno y substancias minerales en cantidad suficiente. El máximo rendimiento en ácido cítrico se obtiene cuando en el medio hay 15 % de sacarosa.

Según Currie, el medio más favorable para la producción de ácido cítrico presenta la siguiente composición:

Sacarosa	150 g
Nitrato amónico	2,5 g
Fosfato potásico ácido.	1 g
Sulfato magnésico	0,25 g
Agua destilada, c. s. para 1000 ml.	
HCl hasta un pH aproximado de 3,5.	

La fermentación proporciona ácido oxálico y dióxido de carbono, además de ácido cítrico. El ácido oxálico se separa de la mezcla fermentada por evaporación y cristalización, y queda en la solución el ácido cítrico.

Foster, Carson, Ruben y Kamen (1941) informaron que se necesitaba dióxido de carbono para obtener ácido cítrico mediante la reacción de Wood-Werkman (ácido pirúvico + CO_2 → ácido oxalacético). Su esquema de reacción es como sigue:



El resultado conjunto se puede representar por la ecuación

$$\underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} + 3\,O \rightarrow \underset{\text{Ácido cítrico}}{H_3C_6H_5O_7} + 2\,H_2O$$

Según el esquema anterior: 1.°, se forma probablemente ácido pirúvico mediante la misma serie de reacciones que en la fermentación alcohólica (pág. 422); 2.°, la formación de ácido cítrico depende de la presencia de dióxido de carbono; 3.°, el dióxido de carbono liberado por descarboxilación de algo de ácido pirúvico se fija en la reacción de Wood-Werkman y convierte otras moléculas de ácido pirúvico en ácido oxalacético; 4.°, en cultivos no aireados, el dióxido de carbono procedente de la respiración se acumula en las proximidades del micelio y da mucho más ácido cítrico que ácido oxálico; 5.°, en cultivos aireados, el aire arrastra el dióxido de carbono y resulta ácido oxálico en cantidad muy superior a la de ácido cítrico.

Véase más información en Erkama y Hägerstrand (1949), Erkama, Hägerstrand y Junkkonen (1949), Erkama, Heikkinen, Hägerstrand y Junkkonen (1949), Karow y Waksman (1947), Martin, Wilson y Burris (1950), Shu y Johnson (1947, 1948), Tomlinson, Campbell y Trussell (1950).

Ácido d-glucónico. Molliard (1922) fué el primero en comprobar la presencia de ácido glucónico en cultivos de mohos, utilizando la especie *Sterigmatocystis nigra* y un medio de cultivo que contenía sacarosa. Más tarde, Butkewitsch (1923) identificó el mismo ácido en cultivos de *Aspergillus niger*. Hoy se sabe que producen este ácido varios mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

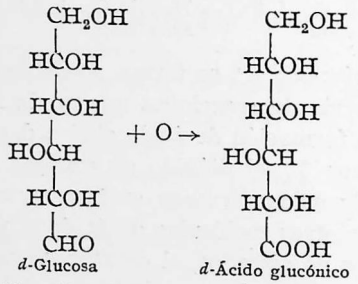
El ácido glucónico se puede preparar más económicamente por medio de mohos que empleando métodos químicos. Herrick y May (1928) emplearon el moho *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* y comprobaron que era elevado el rendimiento en ácido glucónico, con exclusión de otros ácidos. El medio de cultivo utilizado fué:

Glucosa	200 g
Sulfato magnésico	0,25 g
Fosfato disódico	0,10 g
Cloruro potásico	0,05 g
Nitrato sódico	1 g
Agua, c. s. para 1000 ml.	

Este medio, a una temperatura de 25 a 30°, dió una producción considerable en unos diez días.

Moyer, May y Herrick (1936) observaron que el moho *Penicillium chrysogenum* mostraba la máxima capacidad para producir ácido glucónico, pero no proporciona cantidades grandes de esporas, necesarias para inocular medios de cultivo. Wells, Moyer, Stubbs, Herrick y May (1937) seleccionaron una cepa de *Aspergillus niger* para elaborar ácido glucónico, por apreciar en ella ciertas características convenientes; en efecto, esporuló con facilidad y dió fermentaciones uniformes.

La reacción de oxidación de la glucosa a ácido glucónico es como sigue:



d-Glucosa — *d*-Ácido glucónico

Para más información véase Porges, Clark y Gastrock (1940).

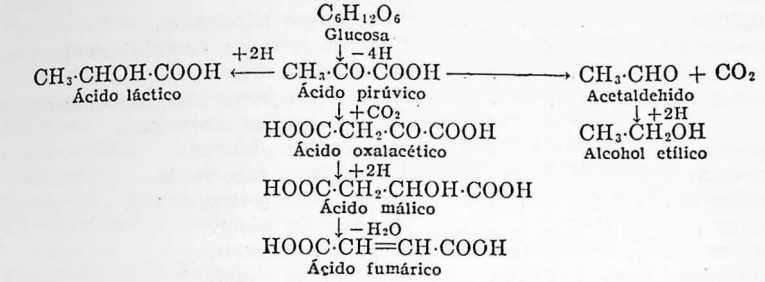
Ácido fumárico. El ácido fumárico es un ácido no saturado que produce varios mohos, principalmente especies del género *Rhizopus*; su fórmula empírica es HOOC·HC = CH·COOH.

El ácido se obtiene de diversos monosacáridos, sacarosa, maltosa, melazas y almidones. Para una producción satisfactoria de ácido fumárico puede usarse el siguiente medio:

Glucosa	150 g
$(NH_4)_2SO_4$	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
$Fe_2(SO_4)_3$	0,02 g
Agua, hasta completar 1000 ml.	

Al medio se agrega carbonato cálcico para neutralizar el ácido fumárico a medida que se forma.

Foster y Davis (1948) propusieron el siguiente esquema para obtener este ácido a partir de glucosa:



Quesos. Muchos quesos se maduran mediante mohos. Se pueden dividir en dos grupos: 1.°, quesos blandos, como el Camembert y el Brie, y 2.°, quesos veteados de verde, como los de Roquefort, Gorgonzola y Stilton.

Los quesos del primer grupo se maduran con el moho *Penicillium camemberti*. La renina (fermento lab) produce la cuajada, que se exprime y se moldea en tortas, se sala superficialmente y se siembra de esporas de moho. Las tortas se llevan luego a un local húmedo, donde el moho se multiplica rápidamente en la superficie, penetra poco a poco y ablanda toda la masa de cuajada; al final, un 80 % de la substancia nitrogenada se vuelve hidrosoluble; el proceso dura unas cuatro semanas.

Los quesos del segundo grupo se preparan sembrando primero en la cuajada un cultivo puro de *P. roqueforti*; la cuajada se comprime hasta cuartearla, y luego se airea de vez en cuando la torta, pinchándola con alambres. El moho se propaga nutridamente a lo largo de las grietas y da al producto final un aspecto veteado o jaspeado. Durante la maduración se sala periódicamente la superficie del queso, para reducir el número de microorganismos no convenientes; estos quesos tardan cinco a seis meses en madurar.

TABLA 6. — ÁCIDOS PRODUCIDOS POR MOHOS

Compuesto (ácido)	Producido por
Acotínico	*Aspergillus niger.*
Bisoclámico	*Byssochlamys fulva.*
Cárlico	*Penicillium charlesii.*
Carlósico	*Penicillium charlesii.*
Carólico	*Penicillium charlesii.*
Carolínico	*Penicillium charlesii.*
γ-Cetopentadecoico	*Penicillium minioluteum.*

Compuesto	Producido por
Cójico	*Aspergillus flavus-oryzae-tamarii* grupos.
Dimetilpirúvico	*Aspergillus niger.*
Espiculispórico	*Penicillium spiculisporum, P. crateriforme.*
Estipitático	*Penicillium stipitatum.*
1-Etilenoxi-α-β-dicarboxílico	*Candida formosa, Penicillium viniferum.*
Fórmico	*Aspergillus oryzae.*
Fumárico	*Aspergillus fumaricus, Rhizopus* esp. *Penicillium griseofulvum.*
Gláucico	*Aspergillus glaucus.*
Glaucónico	*Penicillium,* esp. verde.
Gentísico	*Penicillium griseofulvum.*
Glicólico	*Aspergillus niger.*
Glioxílico	*Ustulina vulgaris.*
Glucurónico	*Aspergillus niger.*
2-Hidroximetil-furano-5-carboxílico	*Aspergillus glaucus, A. clavatus, A. niger, A, oryzae, A. wentii.*
Itacónico	*Aspergillus terreus.*
Itatartárico	*Aspergillus terreus* mutant.
d-Láctico	*Rhizopus stolonifer, R. oryzae, R. tritici, R. japonicus.*
Málico	*Aspergillus flavus,* esp. *Clasterosporium.*
Malónico	*Penicillium funiculosum.*
Manónico	*Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium.*
Metilsalicílico	*Penicillium griseofulvum.*
γ-Metiltetrónico (III)	*Penicillium charlesii.*
Minioluteico.	*Penicillium minioluteum.*
Oxálico.	*Penicillium oxalicum* y otras especies. *Aspergillus niger.*
Penicillium brevi-compactum I.	*Penicillium brevi-compactum.*
Penicillium brevi-compactum II	*Penicillium brevi-compactum.*
Penicillium brevi-compactum III	*Penicillium brevi-compactum.*
Penicillium brevi-compactum IV	*Penicillium brevi-compactum.*
Penicílico	*Penicillium cyclopium.*
Pirúvico	*Aspergillus niger.*
Puberúlico	*Penicillium puberulun.*
Succínico	*Mucor stolonifer, Aspergillus terreus, Penicillium aurantio-virens, Fusarium oxysporum, F. heterosporum.*
Terréstrico	*Penicillium terrestre.*

TABLA 7. — PIGMENTOS PRODUCIDOS POR MOHOS

Compuesto	Producido por
Ácido emódico	*Penicillium cyclopium, P. citreo-roseum.*
Ácido fúlvico	*Penicillium griseofulvum, P. flexuosum, P. brefeldianum.*
Ácido penetrínico	*Penicillium notatum.*

Compuesto	Producido por
Alboleersina	*Helminthosporium leersii.*
Aurofusarina	*Fusarium culmorum, F. graminearum.*
Auroglaucina	*Aspergillus glaucus.*
β-Caroteno	*Mucor hiemalis, neurospora* esp.
Carviolacina	*Penicillium carmino-violaceum.*
Carviolina	*Penicillium carmino-violaceum.*
Catenarina	*Helminthosporium* esp.
Cinodontina	*Helminthosporium* esp.
Citrinina	*Penicillium citrinum.*
Citromicetina	*Penicillium glabrum.*
Crisogenina	*Penicillium chrysogenum.*
Culmorina	*Fusarium culmorum, F. graminearum.*
4,5-Dihidroxi-7-metoxi-2-metil-9-antranol	*Arpergillus glaucus.*
4,5-Dihidroxi-7-metoxi-2-metil-10-antranol	*Arpergillus glaucus.*
Eritroglaucina	*Arpergillus glaucus.*
Fenicina	*Penicillium phoeniceum, P. rubrum.*
Fisción.	*Arpergillus glaucus.*
Flavoglaucina	*Arpergillus glaucus.*
Funiculosina.	*Penicillium funiculosum.*
Helmintosporina	*Helminthosporium* esp.
ε-Hidroxiemodina	*Penicillium cyclopium, P. citreo-roseum.*
Luteoleersina	*Helminthosporium leersii.*
Monascoflavina.	*Monascus purpureus.*
Monascorrubrina	*Monascus purpureus.*
Penicilliopsina	*Penicilliopsis clavariae formis.*
Ravenelina	*Helminthosporium ravenelii, H. turcicum.*
Rubrofusarina	*Fusarium culmorum, F. graminearum.*
Rubroglaucina	*Arpergillus glaucus.*
Tritisporina	*Helminthosporium* esp.

TABLA 8. — POLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR MOHOS

Compuesto	Producido por
Ácido luteico.	*Penicillium luteum.*
Capreolinosa.	*Penicillium capreolinum.*
Esclerotiosa	*Penicillium sclerotiorum.*
Glucógeno	*Penicillium digitatum, Aspergillus,* esp.
Gomas.	*Penicillium lactis, P. guttulosum, Mucor racemus, Candida tropicalis, Oidium* esp.
Micodextrana	*Penicillium expansum, Aspergillus niger.*
Poligalactosa	*Penicillium charlesii.*
Polimanosa	*Penicillium charlesii.*
Rugulosa	*Penicillium rugulosum.*
Varianosa.	*Penicillium varians.*

TABLA 9. — ANTIBIÓTICOS PRODUCIDOS POR MOHOS

Compuesto	Producido por
Ácido aspergílico	*Aspergillus flavus.*
Ácido penicilínico	*Penicillium puberulum, P. cyclopium, P. thomii, P. suavolens, Aspergillus ochraceus.*
Citrinina	*Penicillium citrinum.*
Clavacina	*Aspergillus clavatus, P. expansum, P. claviforme, P. patulum.*
Fumigacina	*Aspergillus fumigatus.*
Gliotoxina	*Gliocladium fimbriatum.*
Penicilina	*Penicillium notatum, P. chrysogenum.*

TABLA 10. — CUERPOS DIVERSOS PRODUCIDOS POR MOHOS

Compuesto	Producido por
Acetaldehido	*Penicillium* esp., *Mucor* esp., *Aspergillus niger.*
Acetato de etilo	*Penicillium digitatum.*
Alcohol gentisílico	*Penicillium patulum.*
Erdina	*Aspergillus terreus.*
i-Eritritol	*Penicillium brevi-compactum, P. cyclopium.*
Esclerotiorina	*Penicillium sclerotiorum.*
Espinulosina	*Penicillium spinulosum.*
Esteroles	*Aspergillus fischeri, Penicillium puberulum Paecilomyces varioti.*
Fumigatina	*Aspergillus fumigatus.*
Geodina	*Aspergillus terreus.*
Glicerina	*Mucor racemosus, Aspergillus wentii.*
Griseofulvina	*Clasterosporium, Helminthosporium* esp.
Meleína (ocracina)	*Aspergillus melleus, A. ochraceus.*
Metilglioxal	*Aspergillus niger.*
Palitantina	*Penicillium palitans.*
Palmitato de ergosterilo	*Penicillium brevi-compactum, P. italicum.*
Terreína	*Aspergillus terreus.*

Substancias antibióticas. Varios mohos elaboran ciertas substancias tóxicas específicas, que estorban el metabolismo de otros seres vivos hasta el punto de destruirlos o impedir su reproducción. El representante más conocido de este grupo es la penicilina, producida por el moho *Penicillium notatum.* Este importante tema se estudia en Antibiosis (pág. 508).

Otros compuestos producidos por mohos. Además de los compuestos ya enumerados, los mohos producen gran número de cuerpos que, con pocas excepciones, no tienen gran importancia industrial. Son productos metabólicos no nitrogenados, probablemente resultantes de la acción de mohos sobre carbohidratos o compuestos análogos. Debe advertirse que, en conjunto, los mohos producen cuerpos más complejos que las bacterias. La mayoría de los compuestos aislados y caracterizados se mencionan en las tablas 6 a 10.

Más información sobre productos de mohos se encontrará consultando a Birkinshaw (1937), Clutterbuck (1936), Gould (1947), Lockwood y Moyer (1938), Prescott y Dunn (1949), Raistrick (1938, 1940) y Tatum (1944).

Informes de carácter general proporcionan Fitzpatrick (1930), Foster (1949), Gwynne-Vaughan y Barnes (1937), Johansen (1940), Skinner, Emmons y Tsuchiya (1947), y Wolf y Wolf (1947).

REFERENCIAS

Birkinshaw, J. H.: Biochemistry of the lower fungi, *Biol. Rev.* **12**: 357, 1937.

Butkewitsch, W.: Über die Bildung del Citronensäure aus Zucker in Kulturen von *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger, Biochem, Z.*, **136**: 224, 1923.

Clutterbuck, P. W.: Recent developments in the biochemistry of molds, *J. Soc. Chem. Ind. (Trans. and Com.)*, **55**: 55 T, 1936.

Currie, J. N.: The citric acid fermentation of *Aspergillus niger, J. Biol. Chem.*, **31**: 15, 1917.

Erkama, J., y B. Hägerstrand: Studies on the metabolism of *Aspergillus niger.* III. The effect of oxygen tension on the formation of citric and oxalic acids in surface mould cultures, *Acta Chem. Scand.*, **3**: 867, 1949.

—, — y S. Junkkonen: Studies on the metabolism of *Aspergillus niger.* II. Effect of iron on the production of citric and oxalic acids, *ibíd.*, **3**: 862, 1949.

— I. Heikkinen, y B. Hägerstrand: Studies on the metabolism of *Aspergillus niger.* I. The effect of aeration on the formation of citric and oxalic acids in surface mould cultures, *ibíd.*, **3**: 858, 1949.

Fitzpatrick, H. M.: «The Lower Fungi—Phycomycetes», Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1930.

Foster, J. W.: «Chemical Activities of Fungi», Nueva York, Academic Press, Inc., 1949.

— y J. B. Davis: Anaerobic formation of fumaric acid by the mold *Rhizopus nigricans, J. Bact.*, **56**: 329, 1948.

Gould, B. S.: Chemical compounds formed from sugars by molds, *Scientific Report Series No. 7*, Sugar Research Foundation, Inc., Nueva York, 1947.

Gwynne-Vaughan, H. C. I., y B. Barnes: «The Structure and Development of the Fungi», Nueva York, The Macmillan Company, 1937.

Herrick, H. T., y O. E. May: The production of gluconic acid by the *Penicillium luteum-purpurogenum group.* II. Some optimal conditions for acid formation. *J. Biol. Chem.*, **77**: 185, 1928.

Johansen, D. A.: «Plant Microtechnique», Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1940.

Karow, E. O., y S. A. Waksman: Production of citric acid in submerged culture, *Ind. Eng. Chem.*, **39**: 821, 1947.

Kurung, J. M.: The isolation and identification of pathogenic fungi from sputum, *Am. Rev. Tuberc.*, **46**: 367, 1942.

Lockwood, L. B., y A. J. Moyer: The production of chemicals by filamentous fungi, *Botan. Rev.*, **4**: 140, 1938.

Martin, S. M., P. W. Wilson, y R. H. Burris: Citric acid formation from $C^{14}O_2$ by *Aspergillus niger, Arch. Biochem.*, **26**: 103, 1950.

Molliard, M.: Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra, Compt. rend.*, **174**: 881, 1922.

Moyer, A. J., O. E. May, y H. T. Herrick: Production of gluconic acid by *Penicillium chrysogenum, Centr. Bakt., Abt. II*, **95**: 311, 1936.

Porges, N., T. F. Clark, y E. A. Gastrock: Gluconic acid production. Repeated use of submerged *Aspergillus niger* for semi-continuous production, *Ind. Eng. Chem.*, **32**: 107, 1940.
Prescott, S. C., y C. G. Dunn: «Industrial Microbiology», Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1949.
Raistrick, H.: Certain aspects of the biochemistry of the lower fungi(«Moulds»), *Ergeb. Enzymforsch.*, 1938.
—: Biochemistry of the lower fungi, *Ann. Rev. Biochem.*, **9**: 571, 1940.
Shu, P., y M. J. Johnson: Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *Aspergillus niger* in submerged culture, *J. Bact.*, **54**: 161, 1947.
Skinner, C. E., C. W. Emmons, y H. M. Tsuchiya: «Henrici's Molds Yeasts, and Actinomycetes», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1947.
Smith, G.: «An Introduction to Industrial Mycology», Londres, Edward Arnol & Co., 1942.
Takamine, J.: Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry, *Chem. News*, **110**: 215, 1914.
Tatum, E. L.: Biochemistry of the fungi, *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 13, 1944.
Thom, C.: «The Penicillia», Baltimore, The William & Wilkins Company, 1930.
— y K. B. Raper: «A Manual of the Aspergilli», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1945.
Tomlinson, N. J. J. R. Campbell, y P. C. Trussell: The influence of zinc, iron, copper, and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*, *J. Bact.*, **59**: 217, 1950.
Underkofler, L. A., y E. I. Fulmer: Microbial amylases for saccharification of starch n the alcoholic fermentation, *Chronica Botan.*, **7**: 420, 1943.
Wehmer, C.: Preparation d'acide citrique de synthèse par la fermentation du glucose, *Compt. rend.*, **117**: 332, 1893.
Wells, P. A., A. J. Moyer, J. J. Stubbs, H. T. Herrick, y O. E. May: Gluconic acid production. Effect of pressure, air flow, and agitation on gluconic acid production by submerged mold growths, *Ind. Eng. Chem.*, **29**: 653, 1937.
Wolf, F. A., y F. T. Wolf: «The Fungi», vols. I y II, Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1947.

CAPÍTULO VII

TÉCNICA DE LOS CULTIVOS PUROS

Puede definirse un cultivo como el desarrollo activo de microorganismos en medios nutritivos.

Un cultivo mixto consiste en la vegetación conjunta de dos o más especies distintas de microorganismos.

Un cultivo puro consta sólo de una especie única que se desarrolla en medios nutritivos. Estos cultivos puros se necesitan para estudiar la morfología y la fisiología de los microorganismos. Todos los estudios de laboratorio, con escasas excepciones, se basan en el empleo de cultivos puros; a veces se cultivan juntas dos especies, con objeto de analizar los diversos tipos de asociaciones bacterianas.

Se entiende por cultivos en placa los de microorganismos que se desarrollan en un medio sólido contenido en placas o platillos de Petri.

Cultivos inclinados son los de microbios que crecen en la superficie inclinada de un medio sólido, como el de agar nutritivo, que se designa específicamente por cultivo en agar inclinado. Otros tipos de medios sólidos comprenden suero sanguíneo coagulado, cuñas de patata y huevo coagulado. Los cultivos así preparados se designan en ocasiones por cultivos en estrías sobre los respectivos medios utilizados. Los medios de cultivo sólidos inclinados tienen por objeto exponer al aire una superficie mayor, para favorecer la multiplicación de los microorganismos.

Los cultivos por picadura se preparan pinchando un medio sólido, como gelatina o agar nutritivos, hasta profundizar bastante con un alambre recto previamente inoculado. Los medios de gelatina se emplean para estudiar el carácter de la licuación o fusión producida por ciertos gérmenes. Si se utiliza agar con un carbohidrato fermentescible, se aprecia la formación de gases al aparecer burbujas en el agar; en algunos casos, éste puede separarse en discos, con interposición de capas de gases.

Los cultivos líquidos se preparan sembrando gérmenes en un medio líquido, como caldo nutritivo, leche o solución peptonada de Dunham.

También se preparan cultivos por agitación, sembrando en agar licuado y sacudiendo o rodando el tubo para obtener una suspensión

uniforme de microorganismos y agar antes de que éste se solidifique. Un cultivo agitado sirve para indicar el oxígeno que necesita un germen; los anaerobios obligados o estrictos medran en las profundidades del medio, mientras que los aerobios lo hacen en la superficie o cerca de ella, en presencia de oxígeno.

MÉTODOS EMPLEADOS PARA SEMBRAR EN MEDIOS DE CULTIVO

Para inocular diversos tipos de medios de cultivo se recomiendan los siguientes procedimientos:

Cultivos en agar por picadura. Esterilizar a la llama un alambre o aguja y dejarlo enfriar unos cinco segundos; quitar con el dedo meñique de la mano derecha el tapón de algodón de un cultivo en agar inclinado y flamear la embocadura del tubo, manteniéndolo oblicuo, no derecho, a fin de reducir al mínimo el peligro de contaminación aérea. Retirar con el alambre esterilizado una pequeña cantidad del cultivo, flamear nuevamente los bordes del tubo de agar inclinado, taparlo y dejarlo en la gradilla. Quitar con el dedo meñique de la mano derecha el tapón del tubo que se va a inocular; flamear el tubo por los bordes, y con el alambre que contiene los gérmenes picar hasta el fondo del tubo. Retirar con cuidado el alambre, flamear de nuevo la boca del tubo, volverlo a tapar y flamear el alambre antes de dejarlo en la mesa. Marcar el tubo con lápiz graso e incubar el nuevo cultivo a temperatura adecuada.

Si la siembra se hace desde un medio líquido, en lugar de aguja se empleará una asa, que se cargará y se introducirá hasta el fondo del tubo, retirándola luego con cuidado. Los demás pormenores son los ya descritos.

Cultivos en agar inclinado. Se esteriliza a la llama una aguja o una asa, según que se utilice un medio sólido o líquido, y se deja enfriar unos cinco segundos. Se quita con el dedo meñique de la mano derecha el tapón de algodón del cultivo, y se pasa por una llama la boca del tubo. Se toma una pequeña cantidad del cultivo con el alambre, o se carga una asa, si el medio es líquido; se vuelve a flamear el tubo, se tapa y se deja en la gradilla. Se quita como antes el tapón del tubo de agar inclinado en que ha de hacerse la siembra, se pasa la boca del tubo por una llama, y se extienden los gérmenes por la superficie del agar, trazando estrías en ambos sentidos, a pocos milímetros de intervalo, empezando por abajo. Se saca con cuidado el alambre o el asa del tubo, cuyos bordes se flamean de nuevo, y se vuelve a tapar con el algodón; también se flamea el alambre o el asa antes de dejarlo sobre la mesa. Se marca el tubo con lápiz graso y se incuba la preparación a temperatura adecuada.

Cultivos en caldo. El procedimiento es el mismo que para preparar cultivos en agar inclinado, salvo que, al sembrar, se sumerge la aguja o el asa en el caldo y se sacude, para que se desprendan de ella los gérmenes adheridos.

AISLAMIENTO DE ESPECIES EN CULTIVO PURO

No es corriente encontrar en la Naturaleza bacterias de una sola especie, sino mezcladas. Por eso, para estudiar bien un microorganismo, primero ha de aislarse y desarrollarse en un cultivo puro. Dos especies distintas que crezcan juntas pueden dar reacciones muy distintas de las de cada una de ellas observada por separado.

Se han empleado diversos métodos para la propagación de cultivos a partir de células solitarias; la mayoría son demasiado difíciles y entretenidos, y por ello no tienen valor práctico más que en ciertos casos especiales.

Los cultivos en placa permiten aislar microbios de un modo relativamente sencillo. Por lo general se siguen dos métodos: el de la placa estriada y el de difusión.

Método de la placa estriada. Se funden en agua hirviendo o en un esterilizador de Arnold dos tubos de agar nutritivo y se dejan enfriar hasta unos 50° C. Se quita el tapón de algodón de uno de los tubos y se flamea éste por sus bordes. Se levanta la tapa de una placa de Petri esterilizada, lo necesario para introducir justamente la boca del tubo y verter en la placa el agar fundido. Se procede de igual forma con el segundo tubo, cuyo contenido se vierte en otra placa de Petri esterilizada. Esto debe hacerse con gran cuidado, para evitar contaminaciones externas, flameando siempre los bordes de los tubos y sin levantar la tapa de las placas de Petri más de lo indispensable. Estas placas se dejan en reposo hasta que el agar adquiera consistencia.

Se esteriliza a la llama una asa de alambre y se deja enfriar durante unos cinco segundos. Con el dedo meñique de la mano derecha se quita el tapón de algodón del cultivo en caldo y se flamea la boca del tubo, del cual se retira una asa de cultivo; se vuelve a flamear el tubo por los bordes, se coloca de nuevo el tapón de algodón y se deja el tubo en la gradilla. Se levanta la tapa de la placa de Petri justamente lo necesario para introducir el asa, cuya carga se extiende por el borde de la placa, a fin de atenuarla; seguidamente se trazan en ambos sentidos varias estrías sobre la superficie del agar, a intervalos de 5 a 7 mm, moviendo libremente el brazo desde el codo. Así, la primera estría contendrá más cultivo que la segunda, ésta más que la tercera, y así sucesivamente, de modo que en las últimas estará suficientemente atenuado para dar colonias sueltas. Suele ser conveniente preparar otra placa en igual forma con la misma asa, sin tomar nuevamente cultivo, con lo cual es más seguro obtener colonias bien aisladas. Cada colonia representa habitualmente el desarrollo de un solo germen. Las placas se marcan con lápiz graso y se incuban a temperatura adecuada.

Las colonias aparecen solamente en la superficie del agar. De una colonia bien aislada es posible obtener un cultivo puro trasladando, con el alambre o la aguja, una porción de ella a un medio de cultivo apropiado (fig. 91).

Método de difusión. Se funden en agua hirviendo o en un esterilizador de Arnold tres tubos de agar nutritivo y se dejan enfriar a unos 50° C. Se esteriliza el asa de alambre a la llama y se deja enfriar unos cinco segundos. Con el dedo meñique de la mano derecha se quita el tapón de algodón del cultivo en caldo y se flamean los bordes del tubo; se toma una asa de cultivo, se vuelve a flamear la boca del tubo, se coloca de

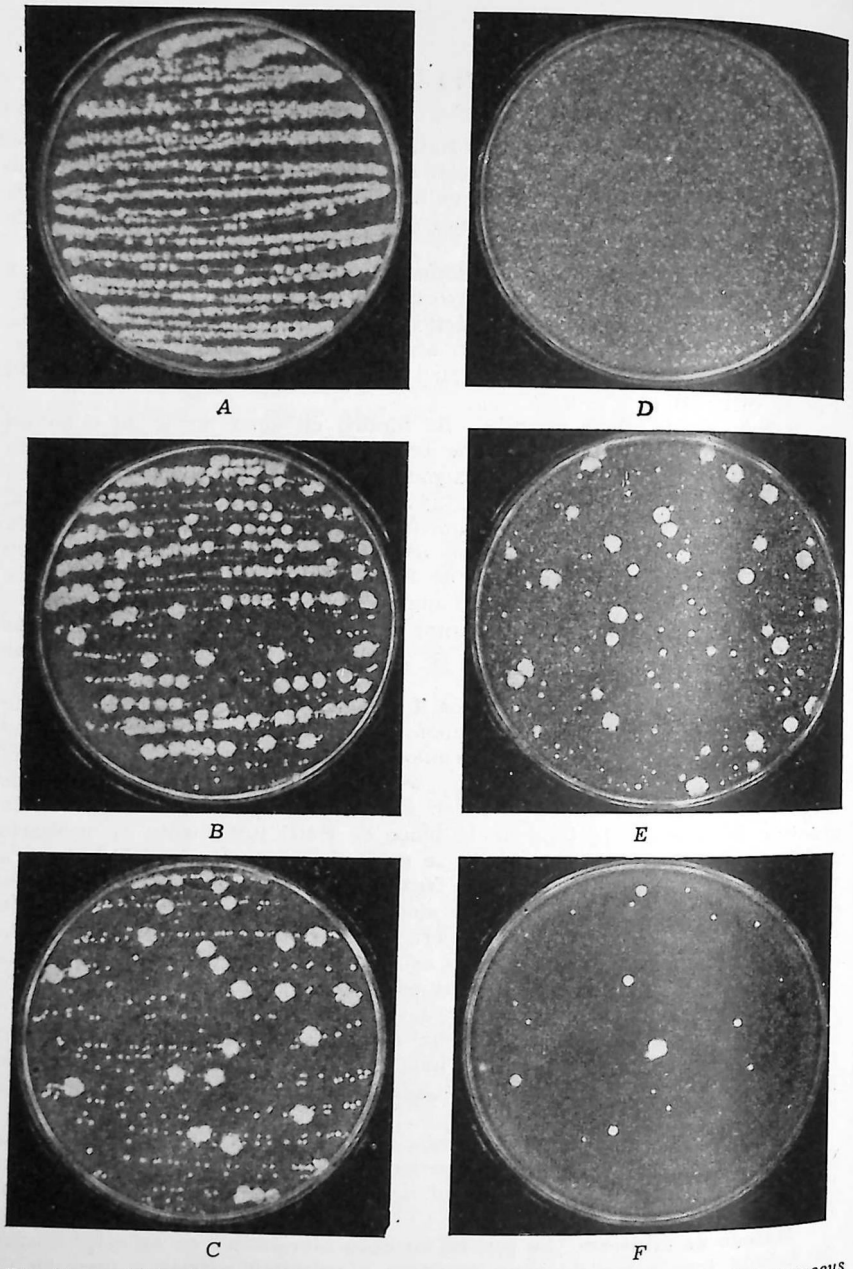


Fig. 91. — Aislamiento de especies a partir de un cultivo mixto de *Micrococcus pyogenes var. aureus* y *Bacillus subtilis*. Método de la placa estriada: *A*, Extensión del cultivo en estrías sobre el agar; *B*, segunda placa estriada con la misma asa sin cargar de nuevo; *C*, tercera placa estriada sin cargar tampoco el asa. Método de difusión; *D*, agar mezclado con una asa de cultivo; *E*, agar mezclado con una asa de cultivo del tubo *B*. *F*, agar mezclado con una asa de cultivo del tubo *A*. En los tres casos, el agar mezclado se vierte en una placa de Petri.

nuevo el tapón de algodón, y el tubo se coloca en la gradilla. Se quita de igual modo el tapón de uno de los tubos de agar fundido y enfriado, se flamea el tubo por sus bordes y se introduce en el agar el asa cargada de gérmenes, sacudiéndola para que se desprenda de ella el material de siembra antes de sacarla. Se vuelve a flamear la boca del tubo y se aplica de nuevo el tapón de algodón; también se flamea el asa antes de dejarla sobre la mesa. Se mezcla bien el contenido del tubo, rodando éste entre las palmas de las manos, para obtener una suspensión uniforme de gérmenes. Se toma una asa cargada del primer tubo y se traslada al segundo, que se hace girar entre las palmas de las manos para mezclar bien su contenido. Del tubo segundo se toma una asa cargada y se lleva al tercero, el cual se rueda también para obtener una mezcla perfecta. El agar así inoculado se vierte en tres placas de Petri esterilizadas; una vez solidificado, las placas se incuban invertidas a temperatura conveniente (fig. 91).

En este procedimiento, la mayoría de las colonias queda dentro del agar, y sólo unas pocas aparecen en la superficie. La primera placa contiene generalmente demasiados gérmenes y es difícil encontrar en ella una colonia bien aislada, pues están tan juntas, que no pueden extenderse normalmente. La segunda o la tercera placa deben presentar colonias separadas, de dimensiones normales. Puede obtenerse un cultivo puro retirando con la aguja de alambre parte de una colonia perfectamente separada y sembrándola en un medio apropiado.

Las colonias superficiales bien aisladas son generalmente redondas y muy características de cada especie; en cambio, las englobadas en el agar son de reducido tamaño y en la mayoría de los casos lenticulares, por lo que no es posible distinguir las diversas especies por el aspecto de estas colonias profundas.

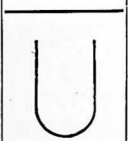
Suele ser más fácil obtener cultivos puros por el método de difusión, porque los organismos se separan mejor cuando se interponen en el agar fundido. Las bacterias que producen colonias mucoides son muy difíciles de separar de microorganismos no mucoides por el método de la placa estriada.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS

En las páginas 164 a 168 se inserta una ficha descriptiva, preparada por el Comité de Técnica Bacteriológica de la Society of American Bacteriologists, y que se emplea para identificar y clasificar bacterias. Los métodos expuestos se han ideado principalmente para la identificación de saprófitos aerobios y no de parásitos obligados o anaerobios estrictos.

Las características más importantes de un microorganismo pueden registrarse en el anverso de la ficha, a la derecha, y las reacciones de fermentación al pie. Mirando las cifras inscritas en el margen derecho y abajo, es posible examinar y comparar un gran número de fichas.

Nombre del microorganismo _____ Origen _____
Fecha de aislamiento _____ Habitación _____
¿Se ha observado variación de fase? _____ Fase en esta ficha: U, uniforme; Gr, granular; M, mucoide; G, gonídica _____.

Subráyense los términos apropiados	Diseños
Células Vegetativas: Medio empleado _____ Reacción (pH) ____ Temp. ____ °C Tiempo ____ días. Tamaño predominante _____ Extremos *redondeados, truncados, cóncavos, agudos.* **Movilidad:** En caldo _____ En agar _____ **Esporangios y Endosporas:** *presentes, ausentes.* Medio empleado ____ pH____ Temp.____ °C. Tiempo____ días. Endosporas *esféricas, elipsoideas, cilíndricas.* **Formas irregulares:** Presentes en _____ a los _____ días, a _____ °C.	
Colonias en Agar: Temp. _____ °C. Tiempo _____ días. Forma: *puntiforme* (hasta 1 mm diám.), *circular* (más de 1 mm diám.), *filamentosa, irregular, rizoide.* Superficie: *lisa, rugosa, anular concéntrica, con surcos radiales.* Borde: *entero, ondulado, lobulado, mellado, filamentoso, festoneado.* Altura: *velada, plana, realzada, convexa.* Caracteres ópticos: *opaca, translúcida, obalescente, iridiscente.*	Colonias superficiales / Colonias profundas
Colonias en Gelatina: Temp. _____ °C. Tiempo _____ días. Forma: *puntiforme, circular, irregular, filamentosa.* Altura: *plana, realzada, convexa, pulvinada, crateriforme* (licuación) Borde: *entero, ondulado, lobulado, mellado, filamentoso, festoneado.* Licuación: *acopada, somera, difusa.* Superficie: *lisa, perfilada, rugosa.* Caracteres ópticos: *opaca, translúcida, opalescente, iridiscente.*	Colonias superficiales / Colonias profundas
Agar Estriado: Temp. _____ °C. Tiempo _____ días. Vegetación: *escasa, regular, abundante, nula.* Forma: *filiforme, espinosa, perlada, difusa.* Brillo: *vivo, apagado.* Cromogénesis _____ *fosforescente, fluorescente.* Olor: *ninguno, pronunciado, parecido a* _____ Consistencia: *butirácea, viscosa, membranosa, quebradiza.* Medio: *agrisado, oscurecido, enrojecido, azulado, verdoso, inalterado.*	 Medio: Temperatura ____ °C. Tiempo ____ días.
Caldo nutritivo: Temp. _____ °C. Tiempo _____ días. Vegetación superficial: *circular, película, grumosa, membranosa, ninguna.* Opacidad: *ligera, regular, intensa, transitoria, persistente, nula, enturbiamiento flúido, desarrollo granular.* Olor: *ninguno, pronunciado, parecido a* _____ Sedimento: *compacto, grumoso, granular, escamoso, viscoso.* Cantidad de sedimento: *abundante, escaso, nulo.*	 Medio: Temperatura ____ °C. Tiempo ____ días.
Picadura en Gelatina: Temp. _____ °C. Tiempo _____ días. Vegetación: *uniforme, mejor arriba, mejor en el fondo.* Línea de picadura: *filiforme, perlada, papilar, vellosa, arborescente.* Licuación: *nula, crateriforme, infundibuliforme, napiforme, saculada, estratiforme*; empieza a los _____ días; termina a los _____ días. Grado de licuación a los _____ días _____ Método usado _____ Medio: *fluorescente, oscurecido, inalterado.*	 Medio: Temperatura ____ °C. Tiempo ____ días.

Fermentación — Temperatura ____ °C.

_____ Medio con _____ _____ y:	Monosacáridos						Disacáridos							Polisacáridos						Alcoholes							Glucósidos			
	Arabinosa	Ramnosa	Xilosa	Glucosa	Fructosa	Galactosa	Manosa	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Trehalosa	Melibiosa	Celobiosa	Rafinosa	Melecitosa	Almidón	Inulina	Dextrina	Glucógeno	Glicerina	Eritrita	Arabita	Adonita	Manita	Sorbita	Dulcita	Salicina	Esculina	Coniferina	α-Metilgluc.
Gases en el tubo de fermentación _____																													
Cantidad de CO_2 en el tubo de Eldredge																													
Reacción (pH) al cabo de ____ _____ días																													
Acidez valorable en c. c. de NaOH/n.____																													

Estudiado por _____ Cultivo núm. _____
Condiciones óptimas: medios _____ Temp. _____ °C
Fases registradas en otras fichas _____

Caracterización resumida

Determinada cada una de las características siguientes, indíquese en el correspondiente cuadro marginal, mediante cifras. Si alguna es dudosa y no se ha determinado, señálese como sigue:

I, indeterminado; V, variable; X, dudoso.

Morfológicas	Células vegetativas	Forma y organización: 1, estreptococos; 2, diplococos; 3, micrococos; 4, sarcinas; 5, bacilos; 6, vibriones; 7, espirales; 8, bacilos ramificados; 9, filamentosa.	
		Diámetro: 1, menos de 0,5μ; 2, entre 0,5 y 1μ; 3, más de 1μ.	
		Coloración de Gram: 0, negativa; 1 positiva.	
		Flagelos: 0, ninguno; 1, perítricos; 2, polares; 3, indeterminados.	
		Cápsulas: 0, ausentes; 1, presentes.	
		Cadenas (4 ó más células): 0, ausentes; 1, presentes.	
	Esporangios: 0, ausentes; 1, elípticos; 2, como bacilos cortos; 3, fusiformes; 4, mazudos; 5, como bolillos.		
	Endosporas: 0, ninguna; 1, centrales a excéntricas; 2, subterminales; 3, terminales.		
De cultivo	Agar estriado	Vegetación: 0, nula; 1, abundante; 2, regular; 3, escasa.	
		Brillo: 1, vivo; 2, apagado.	
	Colonias en Agar	Forma: 1, puntiforme; 2, circular (más de 1 mm diám.); 3, rizoide; 4, filamentosa; 5, festoneada; 6, irregular.	
		Superficie: 1, lisa; 2, perfilada; 3, rugosa.	
	Colonias en gelatina	Forma: 1, puntiforme; 2, circular (más de 1 mm diám.); 3, irregular; 4, filamentosa.	
		Superficie: 1, lisa; 2, perfilada; 3, rugosa.	
Fisiológicas	Afinidades biológicas: 1, patógeno para el hombre; 2, para los animales, no para el hombre; 3, para las plantas; 4, parásito, pero no patógeno; 5, saprófito; 6, autotrófico.		
	Afinidad para el oxígeno: 1, aerobio estricto; 2, anaerobio facultativo; 3, anaerobio estricto; 4, microaerófilo.		
	En medios nitrados: 0, ni nitrito ni gas; 1, nitrito y gas; 2, nitrito, pero no gas; 3, gas, pero no nitrito.		
	Cromogénesis: 0, nada; 1, rosado; 2, violado; 3, azul; 4, verde; 5, amarillo; 6, anaranjado; 7, rojo; 8, pardo; 9, negro.		
	Otros caracteres fóticos: 0, ninguno; 1, fosforescente; 2, fluorescente; 3, iridiscente.		
	Indol: 0, negativa; 1, positiva.		
	Sulfuro de hidrógeno: 0, negativa; 1, positiva.		
	Hemólisis: 0, negativa; 1, positiva.		
	Metahemoglogina: 0, negativa; 1, positiva.		
	Licuación o digestión de proteínas	Gelatina: 0, negativa; 1, positiva.	
		Caseína: 0, negativa; 1, positiva.	
		Albúmina de huevo: 0, negativa; 1, positiva.	
		Suero sanguíneo: 0, negativa; 1, positiva.	
	Reducción de indicadores	Tornasol: 0, negativa; 1, positiva.	
		Azul de metileno: 0, negativa; 1, positiva.	
		Verde Jano: 0, negativa; 1, positiva.	
	Producción de cuajo: 0, negativa; 1, positiva.		

DATOS SUPLEMENTARIOS

Relaciones de temperatura

Medio _____ pH _____
Temperatura óptima de desarrollo _____ °C.
Temperatura máxima de desarrollo _____ °C.
Temperatura mínima de desarrollo _____ °C.

PUNTO TÉRMICO LETAL a los 10 minutos: _____ °C.
Medio _____ pH _____

TIEMPO TÉRMICO LETAL:

Medio _____ pH _____

Temp.	Tiempo	Temp.	Tiempo
_____ °C.	_____ min.	_____ °C.	_____ min.
_____ °C.	_____ min.	_____ °C.	_____ min.
_____ °C.	_____ min.	_____ °C.	_____ min.
_____ °C.	_____ min.	_____ °C.	_____ min.
_____ °C.	_____ min.	_____ °C.	_____ min.

Cromogénesis

Gelatina _____
Agar _____
Patata _____

Otros caracteres fóticos

Fosforescencia en _____
Iridiscencia en _____
Fluorescencia en _____

Relación con la reacción (pH) del medio

Medio _____
pH óptimo aproximado: _____
pH límite para el desarrollo: _____

Relación con el oxígeno libre

Método _____
Medio _____ Temp. _____ °C.
Desarrollo aerobio: *nulo, existe, mejor que el anaerobio, microaerófilo.*
Desarrollo anaerobio: *nulo, existe en presencia de glucosa o sacarosa, lactosa o nitrato; mejor que el aerobio.*
Datos complementarios: _____

Leche

Temperatura _____ °C.

Reacción:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Coagul. ácida:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Cuajado:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Peptonización:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___

Leche con tornasol

Temperatura _____ °C.

Reacción:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Coagul. ácida:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Cuajado:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Peptonización:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___

La reducción del tornasol *comienza a los* _____ *días, y termina a los* _____ *días.*

PATOLOGÍA

Inoculación animal

Medio empleado _____ Tiempo del cultivo _____ Cantidad _____
Período de incubación _____.

		Cultivo total			Células			Filtrado		
Animal:										
Tipo de inyección	Subcutánea	*								
	Intraperitoneal									
	Intravenosa									
	Por vía bucal									

* En los casos en que se observe patogenicidad, indíquese la localización y el tipo de la lesión, por ejemplo, edematosa, histolítica, gaseosa, hemorrágica, ulcerosa, diftérica, etc.

Acción antigénica

Animal _____ Medio empleado _____ Tiempo del cultivo _____
Tipo de inyección _____ Número de inyecciones _____
El cultivo produce *citolisinas, aglutininas, precipitinas, antitoxinas.*
Especificidad: Los anticuerpos producidos son eficaces contra otros antígenos, como sigue: _____
Sueros inmunes de _____
_____ eficaces como antígenos contra este microorganismo.

COMPLEMENTARIOS

Acción sobre los eritrocitos

Células: _____
Método: *placa, caldo, filtrado.*
Hemólisis: *negativa, positiva.*
Metahemoglobina: *negativa, positiva.*

Producción de indol

Medio _____
Ensayo realizado _____
Indol *ausente, presente en* _____ *días*

Producción de sulfuro de hidrógeno

Medio _____
Ensayo realizado _____
SH_2 *ausente, presente en* _____ *días*

Acción sobre los nitratos

Medio _____ Temperatura _____ °C.

Nitrito:	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Gas (N_2)	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___

Medio _____ Temperatura _____ °C.

Nitrito	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___
Gas (N_2)	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___;	___d. ___

Producción de amoníaco (en medio nitratado exento de N amínico): *negativa, positiva.*
Desaparición total del nitrato en el medio _____: *positiva, negativa.*
Desaparición de 2 p. por millón de nitrito en el medio _____: *positiva, negativa.*

Reducción de indicadores

Medio _____ pH _____ Temp. _____ °C.

Indicador	Conc.	Reducción:	
_____	_____ %	___h. ___;	___h. ___
_____	_____ %	___h. ___;	___h. ___
_____	_____ %	___h. ___;	___h. ___
_____	_____ %	___h. ___;	___h. ___

Reacciones de coloración

Gram: ___d. ___; ___d. ___; ___d. ___; ___d. ___
Método: _____
Esporas: Método _____
Cápsulas: Método _____
Medio _____
Flagelos: Método _____
Coloraciones especiales _____

Pruebas adicionales

Rojo de metilo: *negativa, positiva.*
Voges-Proskauer: *negativa, positiva.*
Desarrollo en citrato sódico: *negativo, positivo.*
Desarrollo en ácido úrico: *negativo, positivo.*
Hidrólisis de almidón: *completa* (yodo incoloro); *parcial* (yodo pardorrojizo); *nula* (yodo azul).
Nitrógeno obtenido de los siguientes compuestos: ___

PRUEBAS ESPECIALES

FICHA DESCRIPTIVA presentada en la reunión anual de la SOCIETY OF AMERICAN BASTERIOLOGISTS, el 28 de diciembre de 1934, por el Comité de Técnica Bacteriológica. Elaborada por un Subcomité integrado por M. W. Jennison y H. J. Conn.

Formación de colonias. En términos generales, toda especie bacteriana desarrollada en un medio sólido patrón forma un tipo característico de agrupación o colonia. Las colonias se diferencian por su tamaño, forma, bordes, altura o elevación, estructura interna, etc. (figs. 92 y 93).

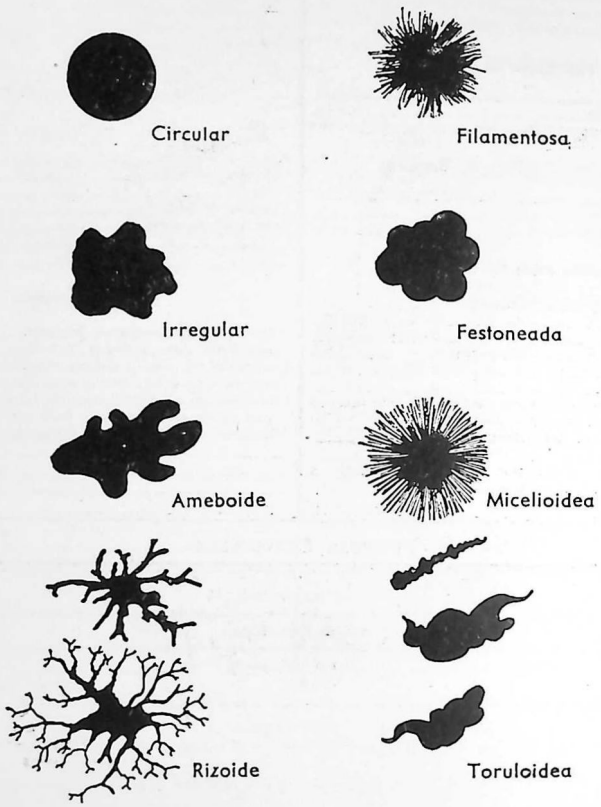


Fig. 92. — Configuración de las colonias. (Según Thomas.)

Cultivos por picadura y en estrías. El tipo de vegetación en la superficie y en el interior de medios de agar es característico de muchas especies bacterianas (figs. 94 y 95). Otro tanto cabe decir del carácter de la licuación de los cultivos por picadura en gelatina (fig. 96). Estas diversas características sirven para diferenciar y clasificar bacterias.

ERRORES POSIBLES AL UTILIZAR LAS FICHAS

Cuando se practican ensayos corrientes para identificar especies bacterianas, el inexperto se expone a incurrir en varias confusiones. Las más importantes provienen: 1.°, del peligro de que existan cultivos

contaminados; 2.°, de la disociación de especies en dos o más fases, y 3.°, de diferencias en los métodos de estudio.

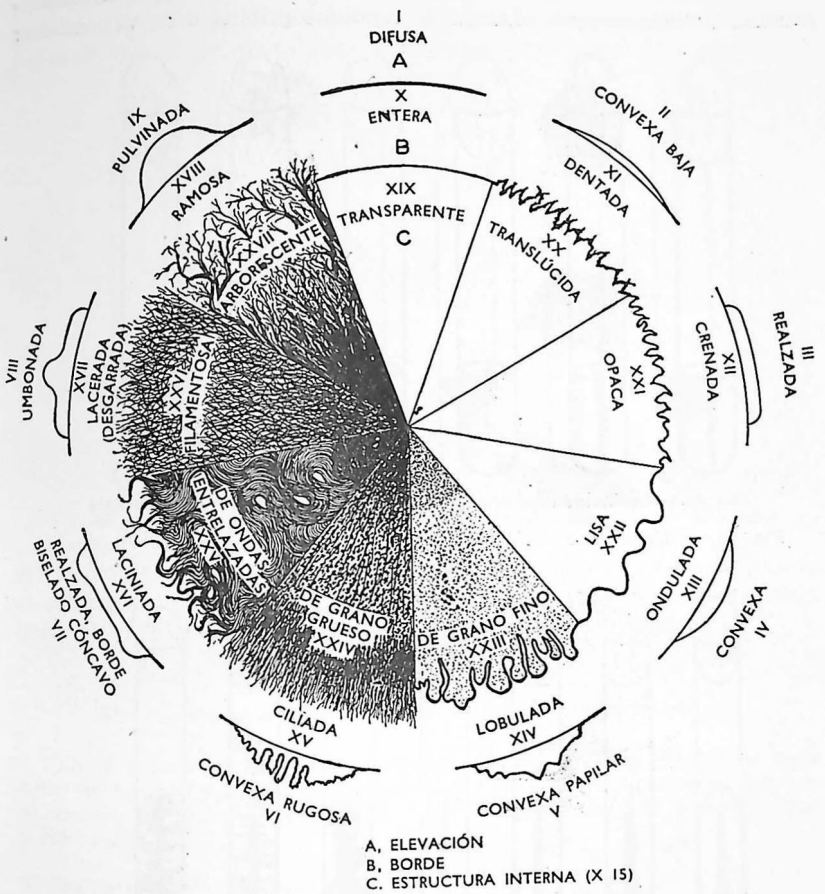


Fig. 93 — Formaciones de colonias bacterianas.

Contaminación de especies. No hace falta decir que el principiante no pondrá nunca bastante cuidado, al manipular y realizar traslados de cultivos, para evitar una contaminación externa. A menos de conservar un cultivo puro y viable, los resultados de los ensayos serán siempre engañosos.

Disociación de especies. Durante los primeros años de la Bacteriología, la mayoría de los bacteriólogos creían que las bacterias podían existir en más de una forma celular. Unos años más tarde, este concepto se abandonó por la idea de una forma celular fija para cada especie.

Aquellas que discrepaban más o menos de los tipos normales solían desecharse como formas de involución, células degeneradas o especies diferentes que constituían impurezas. En la actualidad, se han reunido pruebas suficientes para sostener la hipótesis primitiva de variabilidad

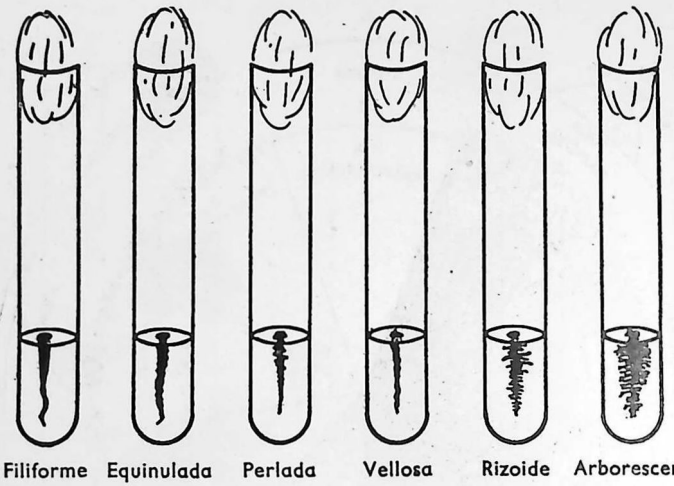


Fig. 94. — Colonias de cultivos por picadura en agar. (Según Thomas.)

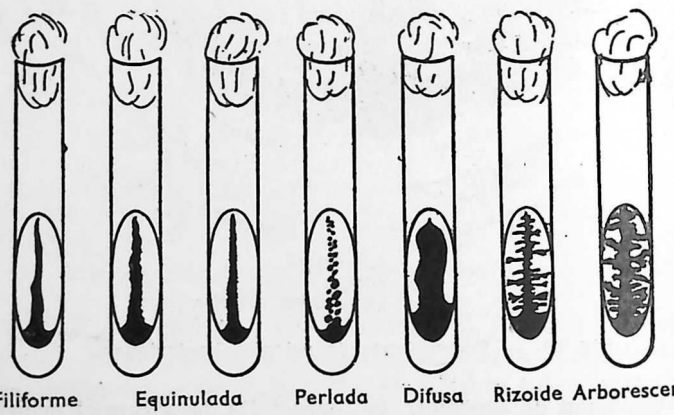


Fig. 95. — Colonias de cultivos en estrías sobre agar. (Según Thomas.)

de los caracteres morfológicos de un microorganismo. En virtud de este cambio de criterio, un principiante descuidado puede creer fácilmente que está observando dos fases en un cultivo, cuando, en realidad, una de ellas es un factor contaminante; y a la inversa, es también fácil que considere un cultivo como compuesto de dos gérmenes distintos, cuando se trata en realidad de diferentes fases de una misma especie.

Diferencias en los métodos de estudio. Para que los resultados de ensayos sean significativos, es necesario indicar el procedimiento empleado. Por ejemplo, no basta hacer constar que un microorganismo produce o no sulfuro de hidrógeno, sino que deben declararse las condiciones en que se ha investigado. Es necesario mencionar la composición

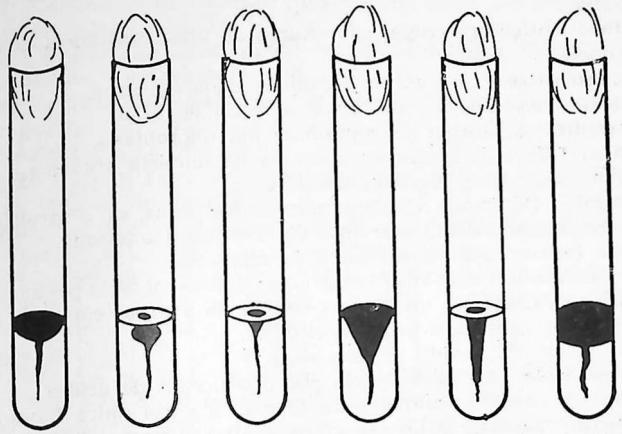


Fig. 96. — Colonias de cultivos por picadura en gelatina. (Según Thomas.)

del medio de cultivo, el indicador incorporado al medio para descubrir el sulfuro de hidrógeno, la temperatura de incubación y lo que ésta dura; de otro modo pueden sobrevenir resultados erróneos.

Glosario de términos empleados en la ficha descriptiva (1)

En la ficha descriptiva se emplean diversos términos científicos para describir las diferentes características de los microorganismos que se desarrollan en distintos medios. A continuación se definen esos términos y otros más.

Acción antigénica: La propia de un antígeno.
Acción diastásica: Conversión de almidón en carbohidratos más sencillos, como dextrina o azúcares, por medio de diastasa.
Adherente: Aplicado a la pared del esporangio, indica que quedan restos del mismo adheridos durante algún tiempo a la endospora.
Aerobio: Que crece en presencia de oxígeno libre; *aerobio estricto*, que crece sólo en presencia de oxígeno libre.
Aglutinina: Anticuerpo capaz de aglutinar suspensiones de bacterias.
Anaerobio: Que crece a cubierto de oxígeno libre; *anaerobio estricto*, que sólo crece en esas condiciones; *anaerobio facultativo*, que crece en presencia o en ausencia de oxígeno.

(1) Tomado del prospecto I del «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Society of American Bacteriologists, Biotech Publications, Geneva, N. Y. 1948.

Anillo: Vegetación adherida al vidrio por el borde de la superficie del líquido de cultivo.
Anticuerpo: Substancia específica producida por un animal en respuesta a la introducción de un antígeno.
Antígeno: Substancia que, introducida en un organismo animal, estimula a éste para producir cuerpos específicos que reaccionan o se unen con ella.
Antitoxina: Anticuerpo capaz de unirse a una substancia tóxica o de destruirla.
Anular concéntrico: Con anillos incluídos unos en otros.
Arborescente: Ramificado, que crece a modo de árbol.
Asépticamente: Al abrigo de contaminación microbiana.
Autotrófico: Capaz de crecer en ausencia de materia orgánica.
Bactericida: Que puede destruir bacterias.
Bacteriostasis: Detención del desarrollo de bacterias, sin destruirlas.
Bipolar: En ambos polos o extremos de la célula bacteriana.
Butiráceo: De consistencia similar a la manteca.
Cadenas: Cuatro o más células bacterianas unidas en serie por sus extremos.
Cápsula: Envoltura de la membrana celular de algunas clases de bacterias.
Citolisina: Anticuerpo que produce citólisis.
Citólisis: Acción disolvente de células.
Coagulación ácida: La de la leche, por producción de ácidos.
Compacto: Se dice del sedimento en forma de masa única bastante tenaz.
Complemento: Substancia no específica similar a una enzima, que se destruye por el calor (a 56° C y más, durante treinta minutos); existe en el suero sanguíneo y es necesaria, en unión de un anticuerpo específico, para producir citólisis.
Crateriforme: Se refiere a la licuación del medio en forma de platillo o copa ancha.
Cromogénesis: Producción de color.
Cuajado: Coagulación de la leche por obra del cuajo o de enzimas similares; se distingue de la coagulación ácida por no intervenir ácidos en ella.
Diftérico: Semejante a la difteria.
Difuso: Se dice del desarrollo que rebasa mucho la línea de inoculación, por ejemplo, varios milímetros o más.
Disociación: Separación de caracteres, refiriéndose, en general, a la variación de fase (véase ésta).
Edema: Acumulación intercelular de líquido en una parte del organismo animal.
Endosporas: Esporas de pared gruesa formadas dentro de las bacterias; por ejemplo, típicas esporas bacterianas como las del *B. anthracis* o el *B. subtilis.*
Endotoxina: Substancia tóxica producida dentro de un microorganismo y no excretada.
Enzima: Fermento químico producido por células vivas.
Equinulado: Espinoso, dicho del desarrollo a lo largo de la línea de inoculación, con márgenes dentados o provistos de púas.
Escamoso: Se refiere al sedimento en forma de hojuelas o escamas separadas en crecido número.
Esporangio: Célula que contiene endosporas.
Estratiforme: Que se licua hacia las paredes del tubo por arriba, y luego hacia abajo, en capas horizontales.

Excéntrico: Ligeramente desviado del centro, entre las posiciones denominadas central y subterminal.
Exógeno: Que se origina fuera del organismo.
Exotoxina: Substancia tóxica excretada por un microorganismo y que se encuentra por ello fuera del cuerpo celular.
Festoneado: Compuesto de cadenas paralelas en líneas onduladas, como en colonias de ántrax.
Filamentoso: Se dice del crecimiento en forma de hilos largos, irregularmente situados o entrelazados.
Filamentos: En morfología bacteriana se refiere a formas semejantes a hilos, por lo general no segmentados; si lo están, los microorganismos se hallan encerrados en una vaina.
Filiforme: En cultivos estriados o por picadura, crecimiento uniforme a lo largo de la línea de inoculación.
Flagelo: Apéndice móvil con aspecto de látigo; órgano de locomoción.
Flictena: Vesícula o tumefacción a modo de ampolla.
Floculento: Que contiene masas coherentes de diversas formas flotando en el campo.
Fluorescente: Que presenta un color con luz transmitida y otro con luz reflejada.
Fosforescente: Que brilla en la obscuridad; fotogénico.
Fusiforme: Más grueso por el centro que por los extremos; con referencia a esporangios, se aplica a las formas denominadas frecuentemente «clostridios».
Gonidio: Espora asexual.
Gonídico: Se refiere específicamente a una fase bacteriana que produce cuerpos semejantes a gonidios.
Granular: Compuesto de pequeños granos.
Grumoso: Que forma grumos o copos; floculento.
Hemolisina: Substancia que produce hemólisis, sola o en presencia de un complemento.
Hemólisis: Acción disolvente de hematíes.
Hemorragia: Derrame de sangre de los vasos.
Hidrólisis del almidón: Destrucción de almidón por efecto de una combinación química con agua; incluye la acción diastática, pero es un término más general.
Histólisis: Destrucción de tejidos.
Inactivar: Destruir el complemento por el calor (a 56° C. durante treinta minutos).
Infundibuliforme: Con figura de embudo o de cono invertido.
Intraperitoneal: Dentro del peritoneo.
Intravenoso: En el interior de una vena.
Iridiscente: Que presenta colores irisados a la luz reflejada.
Lesión: Daño local o cambio morboso de estructura.
Lobulado: Que tiene lóbulos o expansiones redondeadas.
Mazudo: Con forma de maza o clava.
Mellado: Con muescas irregulares.
Membranoso: Que se desarrolla en capa delgada, coherente como una membrana.
Metabolito: Substancia producida por metabolismo.
Micelioideo: Colonia con el aspecto filamentoso radiado de las de mohos.
Microaerófilo: Que crece sobre todo en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno.

Mucoideo: De aspecto mucoso, con referencia específica a una fase bacteriana de desarrollo pecinoso.
Napiforme: Indica licuación en forma de nabo.
Ondulado: Que presenta aspecto sinuoso.
Ontogénico: Relativo a la historia de la vida de un individuo.
Opalescente: De color blanco lechoso con matices, como en el ópalo.
Opaco: Que no deja pasar la luz.
Papilar: Se refiere al crecimiento salpicado de prominencias semejantes a pezones.
Parásito: Que se nutre a expensas de un animal o vegetal viviente, que le sirve de huésped; no siempre es patógeno.
Patógeno: Parásito que ocasiona enfermedad al huésped.
Película: Vegetación bacteriana, extendida en capa continua o discontinua sobre el líquido de cultivo.
Peptonización: Solubilización de leche coagulada por obra de enzimas peptonizantes.
Per os: Por la boca.
Perfilado: Con superficie irregular, suavemente ondulada, como la de un mapa en relieve.
Peritrical: Distribución de los flagelos por toda la superficie de un organismo.
Perítrico: Con flagelos distribuídos por toda la superficie.
Perlado: En cultivos por picadura o en estrías, colonias separadas o semiconfluentes a lo largo de la línea de inoculación.
Persistente: Que perdura muchas semanas o meses.
Precipitina: Anticuerpo capaz de precipitar proteínas solubles.
Pulvinado: En forma de cojín.
Puntiforme: Muy pequeño, pero perceptible a simple vista; de menos de 1 mm de diámetro.
Quebradizo: Seco y friable bajo la aguja de platino.
Realzado: Vegetación gruesa, con bordes abruptos o escalonados.
Reducción: Pérdida de oxígeno o su equivalente, en un compuesto químico; adición de hidrógeno o su equivalente. Refiérese a la conversión de nitrato en nitrito, amoníaco o nitrógeno libre, así como a la decoloración del tornasol.
Rizoide: Vegetación irregularmente ramificada, con aspecto de raíces, como la del *B. mycoides*.
Rugoso: Con surcos o arrugas.
Saculado: Licuación cilíndrica tubular, en forma de saco alargado.
Saprófito: Que vive en materia orgánica descompuesta, a falta de organismo vivo, o sea no autotrófico ni parásito.
Sensibilizar: Hacer sensible una proteína.
Sepsis: Estado de infección.
Sinergia: Acción cooperativa de dos organismos, traducida en un resultado final que ninguno de ellos podría producir solo.
Subcutáneo: Bajo la piel.
Subterminal: Situado hacia el extremo de la célula, entre las posiciones denominadas excéntrica y terminal.
Suero inmune: Humor animal que contiene un anticuerpo.
Temperatura máxima: Límite superior de la de desarrollo.
Temperatura mínima: Límite inferior de la de desarrollo.
Temperatura óptima: La más favorable para el desarrollo.
Termófilo: Que crece mejor a temperaturas elevadas (50° C o más).
Tóxico: Venenoso.

Transitorio: Que dura pocos días.
Translúcido: Que deja pasar luz, pero sin hacer completamente visibles los objetos situados en el lado opuesto.
Trituración: Reducción a partículas diminutas en un mortero.
Truncado: De bordes abruptos, rectos.
Turbio: Nebuloso u opacificado, con grumos ligeros.
Úlcera: Llaga abierta.
Vaina: Cubierta semejante a una cápsula, pero en torno a un organismo filamentoso.
Variación de fase: Separación de una especie en razas o cepas de caracteres algo distintos.
Velado: Delgado, muy extendido, a manera de velo.
Velloso: Con apéndices cortos y gruesos, parecidos a pelos; entre papilar y filamentoso.
Virulencia: Grado de patogenicidad (referido a infecciones).
Viscoso: Vegetación que se adhiere a la aguja al retirar ésta; o sedimento que al agitar asciende en remolino coherente.

Para más información sobre el uso de las fichas, consúltese en «Manual of Methods for Pure Cultur Study of Bacteria», editado por el Comité de Técnica Bacteriológica.

REFERENCIAS

Comité de Técnica Bacteriológica: «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Geneva, N. Y., Biotech Publication, 1948.
Johnstone, K. I.: A simple technique for the cultivation of organisms from single cells, *J. Path. Bact.*, **55**: 159, 1943.

CAPÍTULO VIII

EFECTO DEL AMBIENTE SOBRE LAS BACTERIAS

Es bien sabido que las actividades vitales de un organismo están condicionadas por su ambiente; a cualquier variación en éste corresponde otra en las características morfológicas y fisiológicas de los organismos. Las bacterias se adaptan con rapidez a tales cambios, y por eso pueden resistir grandes variaciones del medio circundante, a diferencia de las células de plantas y animales superiores. Conociendo los diferentes factores físicos que regulan la supervivencia y la multiplicación, se puede aumentar, disminuir o anular totalmente la actividad bacteriana.

Las bacterias se multiplican normalmente por escisión binaria o transversal, y puede hacerse variar ampliamente el ritmo de esta reproducción. Cualquier alteración del intervalo entre dos divisiones celulares consecutivas (lapso generativo) indica mudanza de uno o varios factores ambientes.

El tiempo que tardan en sucumbir las bacterias por obra de agentes físicos está en relación logarítmica con el número de las que sobreviven. Esto significa que el proceso de desinfección no es repentino, sino gradual, y que el número de microorganismos destruídos por unidad de tiempo es mayor al principio y disminuye cada vez más al proseguir la acción. Si se marcan los números de supervivientes por unidad de tiempo y se traza la curva que los une, se verá que ésta es poco pronunciada; en cambio, inscribiendo con relación al tiempo los logaritmos de tales números, los puntos forman una línea recta (pág. 231). Ésta es una regla general aplicable a todos los agentes empleados para destruir organismos monocelulares.

Rahn (1945*a*), en sus estudios sobre destrucción de bacterias, concluye lo siguiente:

> Puede obtenerse un orden logarítmico letal solamente si la bacteria muere por la reacción de una sola molécula. Esta conclusión es absoluta. El orden logarítmico letal es enteramente imposible si hay que inactivar más de una molécula para producir la muerte de la célula... Se logra una aproximación al orden logarítmico si la muerte se produce por inactivación

de muy pocas moléculas, pero si éstas son más de 4 ó 5, el orden no es logarítmico, ni mucho menos. Esto elimina la degeneración de enzimas o del citoplasma como causa de muerte, siempre que impere el orden logarítmico, pues no parece posible que la inactivación de muy pocas moléculas, entre numerosas idénticas, puede matar al organismo; y probablemente excluye también la rotura de la membrana celular como causa de muerte, pues ello requeriría la inactivación de un número considerable de moléculas antes de que el daño se hiciera irreparable.

Veamos ahora cuál es la definición de muerte para un bacteriólogo: una bacteria está muerta cuando ha perdido su capacidad de reproducción. La división celular está vinculada a la división de cromosomas; éstos contienen los genes, y se sabe que la inactivación de ciertos genes causa «mutaciones letales», es decir, impide a la célula multiplicarse. Si bien no se han encontrado todavía de manera definida cromosomas ni genes en las bacterias, estos organismos poseen sin duda algún mecanismo hereditario y unidades de herencia. Por regla general, en una célula diploide hay dos genes de la misma clase, y uno sólo en una célula haploide. Según Fricke y Demerec (1937), «podemos suponer que un gen contiene alrededor de 2500 átomos..., lo cual corresponde a un diámetro medio aproximado de 25 Å». Éste es el tamaño de una molécula muy pequeña de proteína; por consiguiente, un gen constaría de una o dos moléculas nada más. Un gen es diferente de todos sus congéneres y tiene su propio ritmo de desnaturalización; si se desnaturaliza un gen vitalmente esencial y la célula no puede seguir dividiéndose, la bacteria queda estéril, es decir, muerta, según la definición bacteriológica.

Pero esta explicación, o sea que la «muerte» de las bacterias proviene de la inactivación de un gen (Rahn, 1934), es correcta sólo para la definición bacteriológica de muerte. Jordan (1940) definió la muerte bacteriana como «mutación letal». Los copiosos datos que han proporcionado los rayos Roentgen respecto a las mutaciones y a los efectos mortales de estos rayos señalan resueltamente que los genes constituyen la parte más sensible de la célula. Con frecuencia, aunque no se adviertan inmediatamente otros efectos de la irradiación en las plantas o animales sometidos a la misma, se ha provocado esterilidad, o, si los genes afectados son menos esenciales, la descendencia es anormal en algún sentido.

EFECTO DE LA TEMPERATURA BAJA

Las bacterias pueden vivir dentro de una amplia escala de temperaturas, pero la zona en que pueden prosperar y desarrollar sus actividades vitales está comprendida entre 0° y 90°C.

En términos generales, las bacterias mueren lentamente a temperaturas de 0° a 5°C, por encima del punto de congelación. Sin embargo, se han dado a conocer algunas excepciones. Campbell y Reed (1947) prepararon diez cultivos a partir de una digestión ácida (pH 5) de caseína conservada a 4°C y apreciaron la presencia de cuatro especies de bacterias. Seis de los cultivos eran de *Proteus ichthyosmius*, dos de *Pseudomonas schuylkilliensis*, uno de *P. fluorescens* y uno de *Lactobacillus leichmanii*.

Cuando el agua que rodea una suspensión se convierte en hielo, el agua del interior de las células se congela probablemente también; en ese estado cesa toda actividad metabólica. Hilliard y Davis (1918) comprobaron que todas las células de una suspensión de *Salmonella typhosa* quedaban destruídas por efecto de cinco congelaciones alternadas con licuaciones. En cambio, una suspensión de los mismos gérmenes, congelada a —1°C y conservada a esta temperatura durante cinco días, presentaba muchas células viables.

La causa más corriente de muerte por congelación es probablemente una lesión producida por cristales de hielo. Las bacterias congeladas mueren muy despacio; hay microorganismos que sobreviven así años enteros, y no ofrece garantías la esterilización de alimentos, agua u otros líquidos por este medio.

Luyet y Gehenio (1940) observaron que la congelación rápida de bacterias a temperaturas muy bajas, por ejemplo, mediante inmersión en aire líquido, resultaba ser bastante innocua. Durante la congelación, el agua no se convierte en cristales de hielo, sino en una substancia vítrea amorfa. Si se vitrifican células sin que se formen cristales de hielo, pueden mantenerse a temperaturas bajas durante largos períodos de tiempo. Al fundirse lentamente, el agua puede transformarse en cristales de hielo y matar las bacterias; pero si la fusión es rápida, a veces no se forman esos cristales, y las bacterias no mueren.

Sherman y Naylor (1942) informaron que células jóvenes de *Escherichia coli* conservadas a 1°C se mantenían fisiológicamente jóvenes a lo largo de un período experimental de 36 días; tales células morían con más rapidez que las más maduras. En cambio, células jóvenes de *Streptococcus lactis*, conservadas a 1°C, envejecían progresivamente y mostraban las propiedades de células maduras al cabo de una semana; por su capacidad de envejecer a 1°C, resultaban más viables que las células maduras.

Shock por frío. Las bacterias jóvenes pueden ser sensibles a descensos bruscos de temperatura. Si se enfrían rápidamente de 45° a 10°C, hasta 95 % de ellas pueden morir, en tanto que un enfriamiento gradual apenas les produce daño. Las células viejas son mucho menos sensibles a estos enfriamientos súbitos. No se conoce la causa de muerte por shock de frío.

Véase información complementaria en Weiser y Osterud (1945) y Weiser y Hargiss (1946).

EFECTO DEL CALOR

Cada microorganismo tiene una temperatura máxima, otra mínima y otra óptima para su desenvolvimiento.

Temperatura máxima de desarrollo. Esta temperatura máxima se puede definir como la más alta compatible con el crecimiento y la

reproducción, si los demás factores del medio se mantienen constantes. Los organismos psicrófilos, o que crecen a temperaturas bajas, no se desarrollan bien a la del ambiente. Los saprófitos mesófilos, o que viven con preferencia sobre materia orgánica en descomposición, se acomodan a un máximo de 30°C, aproximadamente. La mayoría de las formas

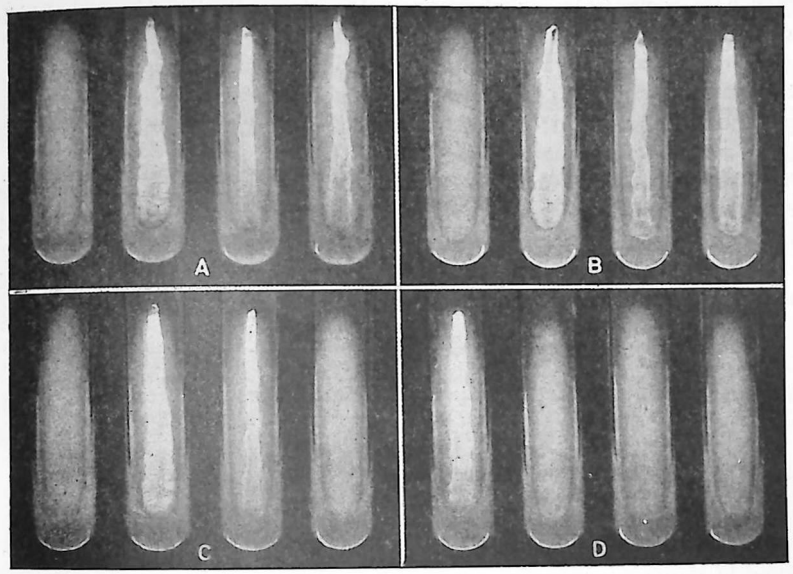


Fig. 97. — Efecto de la temperatura de incubación sobre el desarrollo. De zquierda a derecha, en cada ilustración: *Bacillus viridulus, B. subtilis, Escherichia coli y Flavobacterium brunneum.* Cada serie de tubos se incubó a las siguientes temperaturas: *A*, 15° C; *B*, 25° C; *C*, 37° C; *D*, 55° C.

patógenas para la especie humana viven entre 40° y 50°C; las bacterias termófilas pueden desarrollarse a temperaturas de 60° a 70°C, e incluso más altas.

Temperatura óptima de desarrollo. Es la más favorable para la actividad vegetativa. Para los organismos psicrófilos no llega a 20°C; estos microbios se encuentran en aguas frías de lagos y manantiales, y en aguas salinas conservadas a bajas temperaturas. El grupo comprende muchas de las bacterias productoras de pigmentos.

Los organismos mesófilos prefieren temperaturas de 18° a 45°C; los saprófitos mesófilos se desarrollan sobre todo entre 18° y 25°C, y los parásitos mesófilos se acomodan a la temperatura del huésped.

La temperatura óptima de las bacterias termófilas varía considerablemente; para muchas de ellas se aproxima a 55°C. Se encuentra en el suelo, el estiércol, los excrementos, la materia orgánica en descom-

posición, etc. Por su gran resistencia al calor son causa de graves trastornos en la industria conservera.

En la figura 97 se expone el efecto de diversas temperaturas de incubación sobre el desarrollo de *Bacillus viridulus, B. subtilis, Escherichia coli* y *Flavobacterium brunneum.*

Temperatura mínima de desarrollo. La temperatura mínima es la más baja compatible con el crecimiento y la multiplicación, y también varía cuando se altera un factor ambiente, o más de uno.

Un microorganismo se multiplica con extraordinaria lentitud a la temperatura mínima; al descender la temperatura del punto óptimo al mínimo, el ritmo de reproducción disminuye progresivamente y cesa por completo por debajo de ese punto mínimo.

Zona de temperaturas de desarrollo. Esta zona es la de los grados comprendidos entre las temperaturas mínima y máxima de desarrollo; para unos gérmenes es muy estrecha, y muy amplia para otros.

He aquí las relaciones de temperatura entre las tres clases de microorganismos enumeradas:

	Mínima °C	Óptima °C	Máxima °C
Psicrófilos	0	15	30
Mesófilos	5-25	18-45	30-50
Termófilos	25-45	55	60-90

Punto térmico letal. El punto o índice térmico letal puede definirse como la temperatura a que muere un organismo sometido durante diez minutos a ciertas condiciones prefijadas. Como los microorganismos sujetos a esas condiciones desfavorables no mueren todos en el mismo lapso, parece más apropiado hablar de «zona térmica letal».

Al determinar una zona térmica letal deben tenerse en cuenta los siguientes factores: 1.°, humedad del medio; 2.°, agua contenida en los microorganismos; 3.°, concentración de hidrogeniones del medio; 4.°, composición de éste; 5.°, edad de las células; 6.°, presencia o ausencia de esporas en cultivos de gérmenes esporógenos, y 7.°, temperatura de incubación de cultivos de repuesto. Si cambia uno de estos factores, o más de uno, también se altera la zona térmica letal.

Humedad del medio. — La muerte de bacterias por el calor se atribuye a coagulación de las proteínas del protoplasma. Dentro de ciertos límites, a una proporción mayor de agua en un medio corresponde una temperatura bactericida más baja; el calor húmedo es más eficaz que el seco para esterilizar. La albúmina de huevo seca se puede calentar hasta que se descompone sin coagulación apreciable. Al aumentar la proporción de humedad, la temperatura de coagulación desciende progresivamente, como puede verse en la tabla 11.

TABLA 11. — RELACIÓN ENTRE LA HUMEDAD Y TEMPERATURA DE COAGULACIÓN EN LA ALBÚMINA DE HUEVO

Proporción de agua %	Temperatura de coagulación °C
50	56
25	74-80
18	80-90
6	145
0	160-170

Agua contenida en los microorganismos. Yesair, Bohrer y Cameron (1946) señalaron que micrococos húmedos o secos, calentados en medio húmedo, son poco resistentes. Si se calientan en grasa húmeda, su resistencia aumenta; la de micrococos secos calentados en grasa seca era excepcionalmente elevada, casi tanto como la obtenida en condiciones de esterilización seca.

Infieren de ello que los micrococos secos pueden sobrevivir a la esterilización en condiciones corrientes y que el mecanismo de protección grasa en los alimentos parece basarse en la ausencia localizada de humedad.

Resultados similares comunica Jensen (1942), quien descubrió que micrococos desecados, suspendidos en manteca húmeda, sobreviven sólo 15 minutos a 100° C, pero en manteca seca se requirió un período de 50 minutos a 115° C para lograr igual resultado.

Concentración de hidrogeniones del medio. El pH del medio tiene un importante influjo sobre el número de supervivientes. La mayoría de los microorganismos se destruyen con más facilidad en soluciones ácidas o alcalinas que en un medio neutro; en general, a mayor acidez o alcalinidad corresponde una zona térmica letal más baja. Los gérmenes ácidorresistentes constituyen excepción, pues sobreviven al calor en medio ácido durante períodos suficientes para matar las células calentadas en un medio ligeramente alcalino. Como los microorganismos están protegidos por una cápsula cérea (pág. 57), parece razonable sostener que esta cubierta se destruye en medio alcalino, y las células se hacen así más vulnerables. La prueba debe efectuarse en medio neutro.

Composición del medio. La composición del medio o substrato influye mucho en los resultados obtenidos respecto a la zona térmica letal. Los medios que contienen proteínas o albuminoides muy concentrados suelen elevar la temperatura necesaria para destruir bacterias, pues estas substancias forman una película en torno a los gérmenes y los protegen contra influencias desfavorables.

La composición del medio empleado para cultivos de repuesto es asimismo de gran importancia. Curran y Evans (1937) y Nelson (1943) demostraron que el número de células tratadas capaces de desarrollo dependía en alto grado de la composición del medio empleado para subcultivo. Stern (1942) llegó a una conclusión similar sobre el tiempo requerido para la germinación de esporas de varios organismos putrefactivos y termófilos anaerobios.

Edad de las células. También influye en el índice térmico letal la edad de las células. Las viejas son más resistentes a los factores del medio que las muy jóvenes. Para los ensayos deben utilizarse cultivos de 24 horas.

Presencia o ausencia de esporas. Las bacterias no esporógenas y las

formas vegetativas de las esporógenas son generalmente destruídas por el calor húmedo a temperaturas de 60° a 70° C; las esporas resisten hasta 100° C o más. Al determinar la zona térmica letal de un germen productor de esporas debe concretarse si existen éstas en el cultivo.

Según Curran (1952), la resistencia de las esporas varía mucho de una especie a otra y también dentro de una misma especie o de un conjunto determinado de esporas, y es independiente de la exuberancia de desarrollo o de esporulación.

Las esporas de *Clostridium botulinum* son las que más resisten al calor recién formadas, mientras que en otras especies se alcanza la máxima resistencia pasado cierto período de maduración. Entre las bacterias esporógenas aerobias, las de temperatura más alta de desarrollo son las que suelen mostrar mayor resistencia al calor.

La naturaleza de los componentes del medio nutritivo es importante. Esporas de *Bacillus subtilis* producidas en infusiones de vegetales presentan gran resistencia al calor, mientras que es mucho menor la de esporas formadas en ciertas digestiones; las esporas de *Cl. botulinum* engendradas en un medio que contenga ciertos ácidos grasos son más resistentes al calor que las producidas en medios de los cuales se han extraído previamente tales ácidos. Los medios carentes de determinados iones metálicos esenciales, como magnesio, calcio y hierro, dan esporas de escasa resistencia térmica.

Las esporas presentan su máxima resistencia al calor cuando se producen a la temperatura óptima de desarrollo; cualquier desviación del punto óptimo da origen a esporas menos termorresistentes. El pH del medio afecta la resistencia de las esporas, que muestran estabilidad máxima en el punto neutro o cerca del mismo; en substratos fuertemente ácidos o alcalinos la resistencia al calor mengua materialmente. La sal, a concentraciones débiles, aumenta la resistencia de especies mesófilas aerobias y anaerobias al calor, pero a más de 8 % disminuye esta resistencia; en cambio, basta 1 % de sal para reducir la de algunos tipos termófilos.

La concentración de humedad en el medio influye mucho en la resistencia de las esporas al calor. Generalmente basta el calor húmedo a 115° C durante 20 a 30 minutos para esterilizar esporas, mientras que la esterilización seca requiere 160 a 180° C durante una hora. La presencia de materia orgánica en el medio aumenta la termorresistencia de las esporas, y también puede alterarla la adición de vitaminas. Con 100 partes por millón de ácido ascórbico (vitamina C) agregadas a una solución tope de fosfato neutro, se aumenta la resistencia de esporas de una especie de *Clostridium*. Las esporas que sobreviven a un tratamiento térmico sucumben más fácilmente al aplicarlo de nuevo que las no tratadas.

Sugiyama (1951) hizo saber que las esporas de *Cl. botulinum* producidas a 37° C son más resistentes que las desarrolladas a 24, 29 ó 41 C.

La resistencia térmica de esporas suspendidas en diferentes concentraciones de sacarosa aumenta con el grado de concentración de este producto; en sacarosa al 50 % la resistencia de las esporas al calor aumenta casi en el acto y se mantiene elevada durante muchas horas.

Temperatura de incubación de cultivos de repuesto. Williams y Reed (1942) hallaron que las temperaturas de incubación de 24 y 27° C eran más favorables para el desarrollo de esporas calentadas de *Cl. botulinum* que la de 37° C, y algo más que la de 31° C. Igualmente comprobaron que un anaerobio no identificado se desarrollaba mejor a 27° C que por encima de esta temperatura.

Éstos son sólo unos pocos de los factores que han mostrado influjo sobre la resistencia térmica de las esporas bacterianas. A menos que se indiquen las condiciones de la prueba, las zonas o índices térmicos letales obtenidos serán de utilidad dudosa.

Resistencia térmica de células y esporas bacterianas. La resistencia térmica de esporas y células vegetativas de diferentes especies o cepas de una especie determinada varía dentro de amplios límites y no guarda relación entre esporas y células. Williams (1948) y Williams y Zimmerman (1951) han informado que la escasa resistencia de las células vegetativas puede ir asociada a una gran resistencia de las esporas, y en cultivos de esporas vegetativas muy resistentes puede haber esporas que no lo sean.

Davis y Williams (1948) observaron que la resistencia térmica de esporas de *Bacillus globigii (B. subtilis)* se puede aumentar mediante selección de supervivientes de suspensiones expuestas al calor durante un lapso suficiente para destruir la mayoría de las esporas contenidas en ellas.

En cambio, Desrosier y Esselen (1951) no lograron aumentar la termorresistencia de las esporas de un anaerobio putrefactivo seleccionando supervivientes.

Schneiter y Kolb (1948) ensayaron la resistencia al calor de esporas viejas y jóvenes de 6 cepas de *Bacillus anthracis*, 7 cepas de *B. cereus* y 4 cepas de *B. subtilis*. Los cultivos se calentaron a 100°C durante períodos de uno a treinta minutos, y se comprobó que las esporas de los 11 microorganismos no patógenos eran, en general, más resistentes al calor que las de *B. anthracis*.

Período térmico letal. Al determinar la zona térmica letal se mantiene constante el tiempo y se varía la temperatura. Para hallar el período o tiempo térmico letal de un microorganismo se mantiene constante la temperatura y se determina el tiempo necesario para destruir todas las células.

Las zonas y los períodos térmicos letales son de gran utilidad en bacteriología aplicada, y sobre todo en la industria conservera, pues ayudan a los técnicos a determinar las temperaturas y los tiempos requeridos para manipular alimentos enlatados.

Lo corriente es aislar el germen o los gérmenes que estropean una determinada clase de producto alimenticio y determinar sus zonas o períodos térmicos letales en condiciones ambientes similares. Los resultados obtenidos sirven de guía para hallar la temperatura y el tiempo convenientes en la elaboración de conservas.

En las figuras 98 y 99 se representan las zonas térmicas letales de las especies *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus*.

Véase más información en Gordon y Smith (1949), Mattick y Hiscox (1945) y Rahn (1945b).

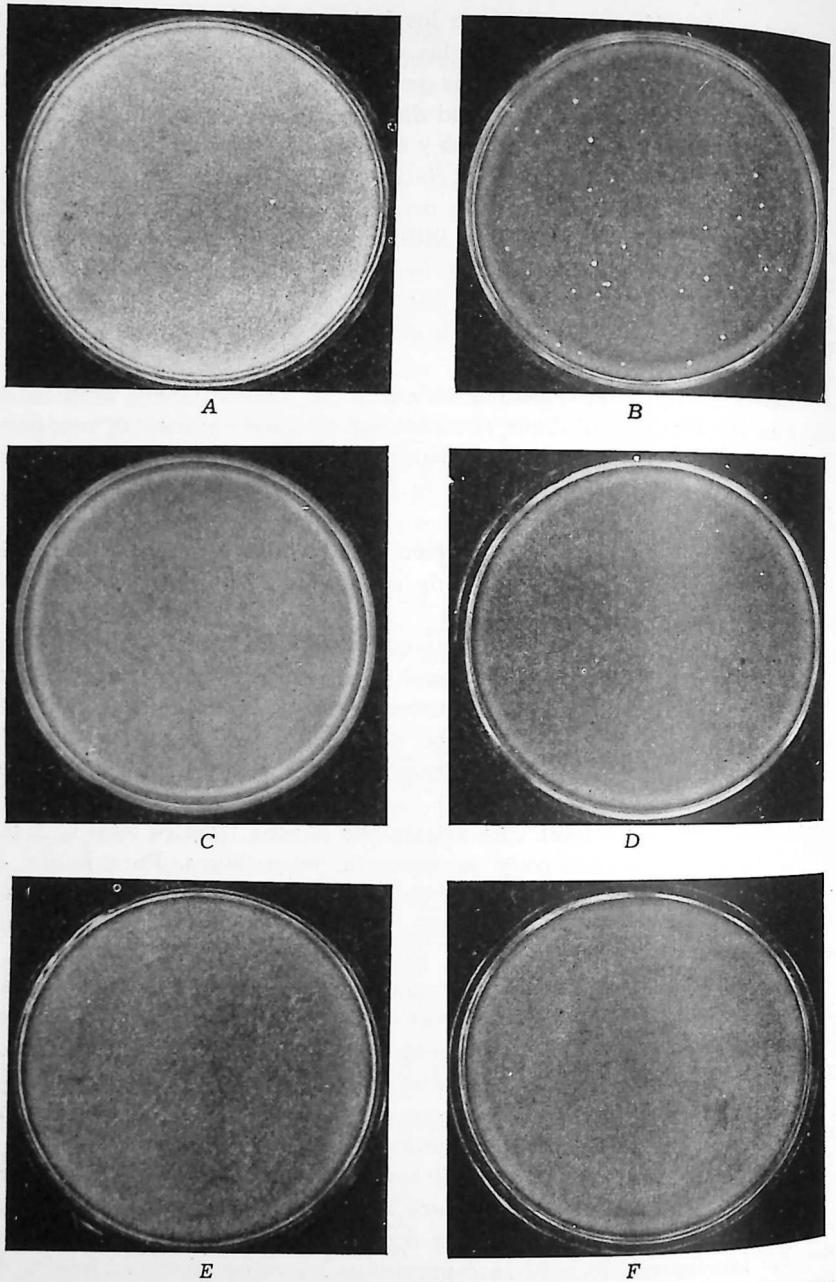


Fig. 98. — Zona térmica letal de la *Serratia marcescens*. Seis tubos, cada uno con 1 ml de cultivo, se calentaron, durante diez minutos, a las siguiente temperaturas: *A*, 50° C; *B*, 55° C; *C*, 60° C; *D*, 65° C; *E*, 70° C; *F*, 75° C. Los contenidos de los tubos se vertieron en placas de Petri y se mezclaron con agar fundido.

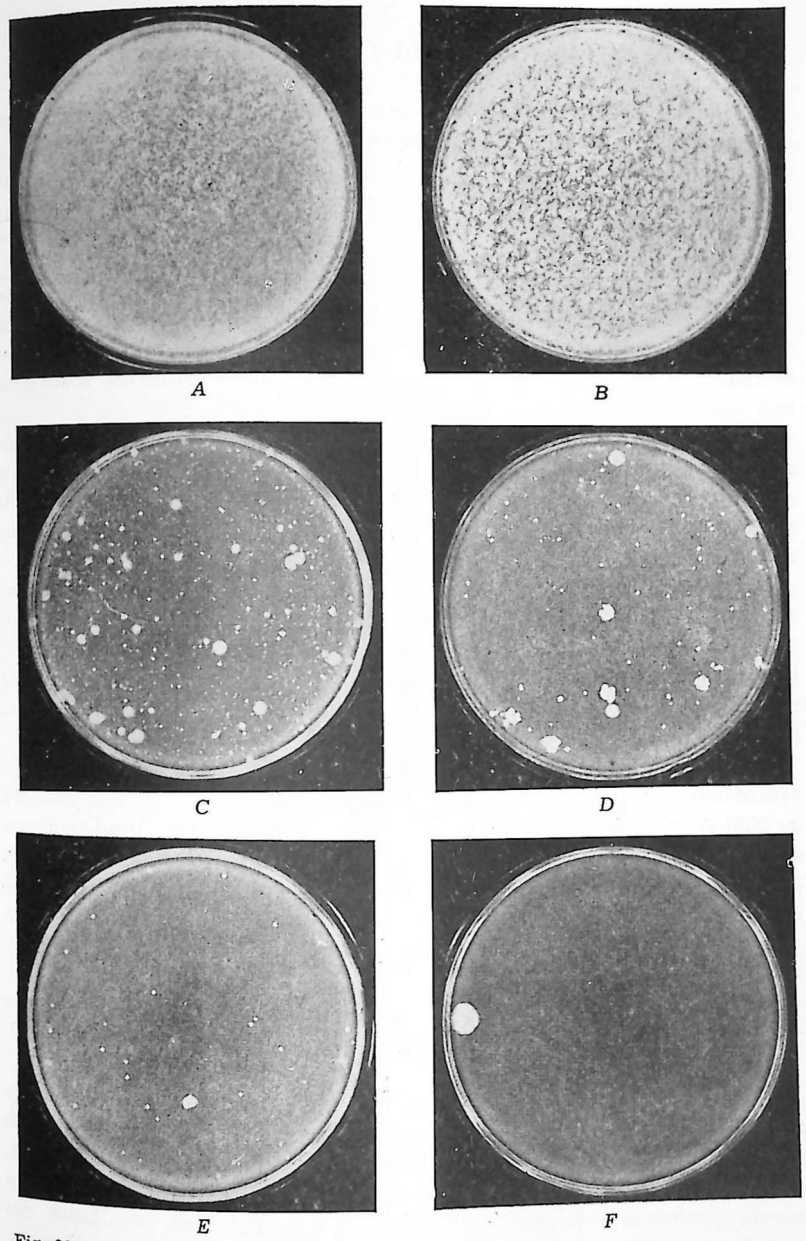


Fig. 99. — Zona térmica letal de *Bacillus cereus*. Seis tubos, cada uno con 1 ml de cultivo, se calentaron, durante diez minutos, a las siguientes temperaturas: *A*, 75° C; *B*, 80° C; *C*, 85° C; *D*, 90° C; *E*, 95° C; *F*, 100° C. Los contenidos de los tubos se vertieron en placas de Petri y se mezclaron con agar fundido.

EFECTO DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

Algunas bacterias sulfurosas elaboran un pigmento conocido por bacterioclorofila, que parece desempeñar en ellas una acción semejante a la de la clorofila de las plantas; estos microorganismos aprovechan los rayos luminosos. Pero la mayoría de las bacterias no poseen pigmento fotosintético, ni pueden utilizar la luz solar como fuente de energía; la luz ultravioleta es perjudicial para ellas.

Las lámparas germicidas comúnmente empleadas irradian la mayor parte de su energía a 2537 Å, pero los rayos más eficaces son los de 2650 Å de longitud de onda. Tales rayos pueden destruir una célula, retardar su desarrollo o cambiar sus atributos hereditarios mediante una mutación de genes.

Las radiaciones sólo son eficaces cuando se absorben. Los rayos son absorbidos por ácidos nucleicos, substancias que con proteínas forman nucleoproteínas, y se encuentran en los cromosomas de la substancia nuclear, así como en el citoplasma, donde forman corpúsculos metacromáticos (pág. 77).

La mayoría de las proteínas disueltas muestran bandas ostensibles de absorción en la región ultravioleta. Blundell, Erf, Jones y Hoban (1944) informaron que los rayos ultravioleta ejercen una acción bactericida insignificante sobre bacterias suspendidas en sangre; las proteínas hemáticas absorben los rayos luminosos e impiden que lleguen a las bacterias.

Smithburn y Lavin (1939) irradiaron el germen de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis,* con dosis subletales de luz monocromática de 2537 Å, y comprobaron que este microorganismo perdía gradualmente su virulencia, sin ser destruído. Privado de virulencia, aún era capaz de producir inmunidad manifiesta, en tanto que los gérmenes destruídos por los mismos rayos luminosos no proporcionaban una inmunidad mensurable. Sin embargo, estos organismos aún poseían propiedades ácido-resistentes.

Hercik (1937) observó que se necesitaba doble cantidad de energía incidente para destruir esporas de *Bacillus megatherium* que para aniquilar las células vegetativas.

Sharp (1939) sembró en placas de agar cultivos de varias especies de bacterias no esporíferas y un cultivo que contenía esporas y células vegetativas de *B. anthracis.* Inmediatamente después de trazar las estrías, se irradiaron las placas con rayos de 2537 Å hasta reducir a 10 % los microorganismos supervivientes (90 % destruídos). Los resultados demuestran que las esporas de *B. anthracis* requieren aproximadamente una exposición dos veces mayor que las células vegetativas para conseguir la misma reducción proporcional.

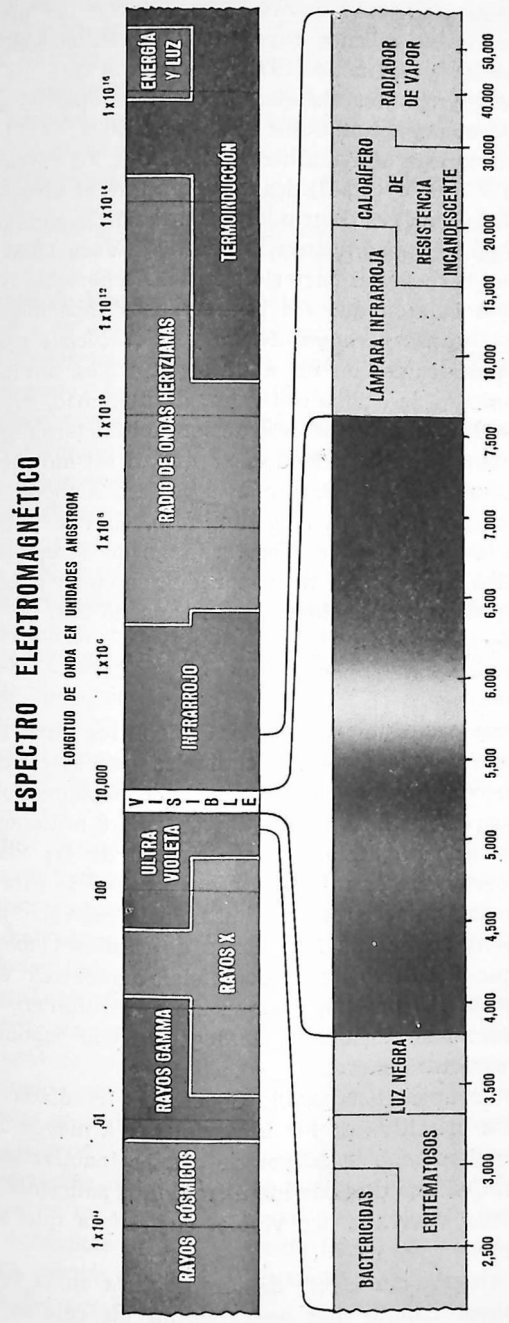


Fig. 100. — Diagramas de espectros. Una unidad Ångström, empleada para expresar la longitud de onda de radiaciones luminosas y ultravioleta, es igual a 1 diezmillonésima de milímetro. (Con licencia de Westinghouse Electric Corporation.)

Se han tratado asimismo esporas de mohos con luz ultravioleta y resultan sensibles a los mismos rayos que ejercen acción tóxica con bacterias. Hollaender y Emmons (1939) informaron que las esporas de *Trichophyton mentagrophytes* aisladas de casos de «pie de atleta» quedaban destruídas por rayos luminosos de 2537 a 2650 Å.

Virus y bacteriófagos son también sensibles a los rayos luminosos. Jungeblut (1937) y Toomey (1937) descubrieron que el virus de la poliomielitis (parálisis infantil) es destruído por la luz de la zona ultravioleta. Resultados semejantes comunicaron Levaditi y Voet (1935) con referencia al virus del herpes y al bacteriófago del *Escherichia coli*. Kendall y Colwell (1940) señalaron que los bacteriófagos específicos de varias razas de *E. coli*, *Shigella paradysenteriae* y *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* quedaban destruídos en un minuto por rayos luminosos procedentes de una lámpara de cuarzo con vapor de mercurio, cuya superficie se hallaba a 1 cm de distancia. La destrucción del bacteriófago se impide mezclando íntimamente partículas de éste en un mismo medio con los ingredientes del caldo, o interponiendo el último a modo de pantalla entre el bacteriófago puro y el foco luminoso. Greene y Babel (1948) han comunicado la destrucción del bacteriófago de *Streptococcus lactis* mediante lámparas ultravioleta de vapor de mercurio a baja presión, que emitían 85 % de sus radiaciones en la zona de 2537 Å.

Se encontrará más información en Luckiesh, Taylor, Knowles y Leppelmeier (1949).

Fotorreactivación de bacterias irradiadas con luz ultravioleta. Kelner (1949) demostró que las bacterias «muertas» por efecto de la luz ultravioleta podían restituirse a una forma viable exponiéndolas a la luz corriente. Una suspensión de *E. coli*, que contenía 8 millones de células por milímetro, se irradió hasta que el número de las viables quedó reducido a 100 bacterias por mililitro. Una porción de esta suspensión irradiada se expuso durante treinta minutos a la luz solar intensa y se valoró seguidamente; contenía 2 millones de células viables por mililitro, mientras que el cultivo irradiado inicial, conservado en la obscuridad, dió solamente 100 bacterias por unidad de volumen. Como otros organismos proporcionan resultados análogos, puede suponerse que el fenómeno tiene carácter general.

El grado de recuperación posible de células irradiadas parece depender de la dosis primitiva de luz ultravioleta; a mayor dosis corresponde una proporción también mayor de células inactivadas que no es posible reanimar. Con una dosis de luz ultravioleta suficiente es probable que ninguna célula vuelva a ser viable, cualquiera que sea la dosis de luz reactivante.

También se observa un efecto de temperatura en la fotorreactivación. Ésta es mayor cuanto más se calientan las células durante su exposición a la luz visible, hasta una temperatura de 45 a 50°C, pasada la cual el calor les era nocivo.

La fotorreactivación disminuye asimismo la frecuencia de varios tipos de especies mutantes, originadas por la luz ultravioleta.

Queda por averiguar si la luz ejerce su efecto anulando la mutación después de producida, o evitándola al estorbar algún proceso iniciado por la luz ultravioleta.

Más información proporcionan Heinmets y Taylor (1951), Johnson, Flagler y Blum (1950), Kelner (1951*a*, *b*, 1953), Novick y Szilard (1949).

Protección de bacterias contra los efectos de la radiación. Thompson, Mefferd y Wyss (1951) han comprobado que la presencia de piruvato en una suspensión bacteriana preservaba las células de la acción letal y mutagénica de los rayos ultravioleta. Tras una exposición prolongada a estos rayos, las soluciones de piruvato se vuelven tóxicas y provocan mutaciones; la adición del piruvato después de exponer las células, o su presencia en el medio de cultivo, no modifica la respuesta biológica a las radiaciones.

Irradiación de medios de cultivo. Las observaciones reseñadas se limitan a la influencia de las radiaciones lumínicas sobre microorganismos y sus esporas. Se ha demostrado que los medios de cultivo expuestos a la luz ultravioleta resultan menos adecuados para el desarrollo bacteriano. Bedford (1927), después de una serie de experimentos, llegó a la conclusión de que la irradiación de medios de cultivo producía peróxido de hidrógeno, cuya presencia en ellos originaba una acción tóxica sobre las bacterias; la concentración de peróxido en los medios de cultivo depende de la longitud de onda de los rayos luminosos y del período de exposición.

Resultados similares han comunicado Wyss, Clark, Haas y Stone (1948), quienes comprobaron que el efecto tóxico del caldo irradiado podía anularse agregando la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

Aplicaciones industriales. Los rayos ultravioleta se emplean en la industria para destruir bacterias, levaduras y mohos en diversos productos alimenticios, como azúcar, carnes y artículos de panadería. Es corriente encontrar esporas de *Bacillus stearothermophilus* en el azúcar, y también puede ocasionar cuantiosas pérdidas en muchos otros alimentos. Las esporas se destruyen por irradiación de los cristales de azúcar.

Arnold y Garrett (1943) observaron que las lámparas de luz ultravioleta, cuyas radiaciones corresponden principalmente a una estrecha faja de 2537 Å en promedio, destruyen con seguridad bacterias desarrolladas en la superficie de utensilios de la industria lechera, tales como botellas, cazos, vasijas y cubas de pasteurizar.

Luckiesh, Kerr y Knowles (1947) informaron que las lámparas ger-

micidas de vapor de mercurio a baja presión destruían bacterias contenidas en el agua. Recomendaban su aplicación industrial para el tratamiento de agua potable.

Muchas salas de hospital y de operaciones son irradiadas con objeto de esterilizarlas o de disminuir notablemente el número de los microorganismos del aire en su interior. El saneamiento del aire es muy similar al del agua; se propone esencialmente lo mismo, esto es, hacerlo más respirable en espacios cerrados, de acuerdo con circunstancias especiales, y descartar la posibilidad de que los gérmenes del aire produzcan infecciones clínicas. En las salas de operaciones, lo que interesa ante todo es reducir el riesgo de que los microorganismos patógenos del aire

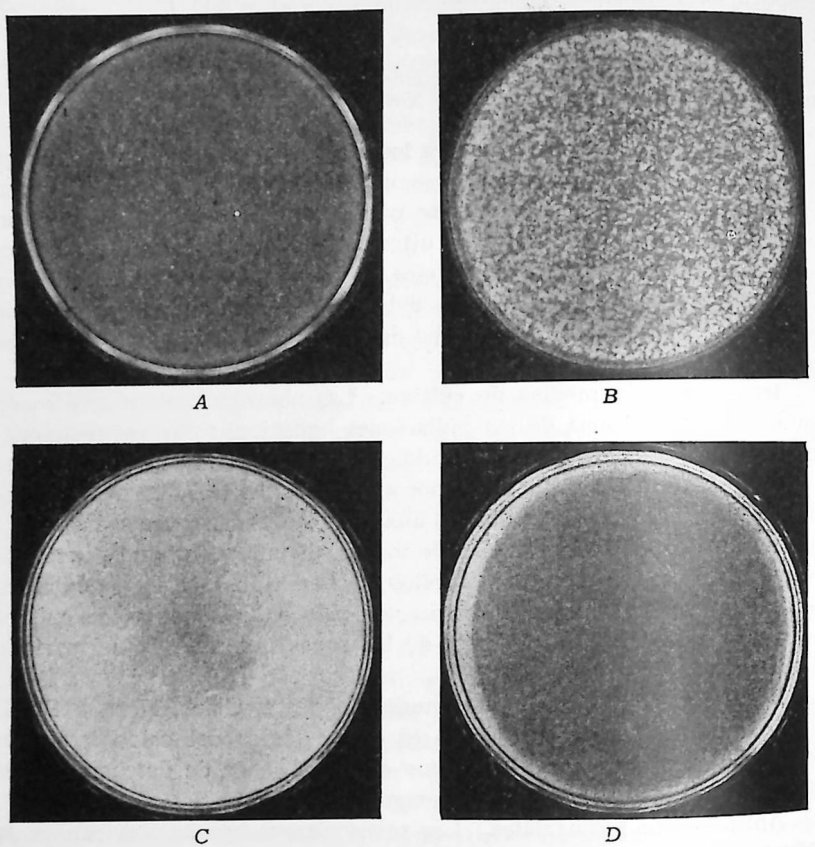


Fig. 101. — Efecto de la luz ultravioleta. *A*, *Bacillus subtilis* expuesto a una lámpara de esta luz durante una hora; *B*, durante dos horas. Como el cultivo contenía numerosas esporas, fué necesaria una exposición más prolongada para conseguir una esterilización perfecta. *C*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* al cabo de una hora de exposición; *D*, al cabo de dos horas, completamente esterilizado ya.

se depositen sobre incisiones abiertas e instrumentos, o en las manos de operadores o auxiliares, de donde puede pasar a aquéllas (páginas 534 y s.).

En la figura 101 se expone el efecto de la luz ultravioleta sobre el desarrollo de gérmenes de *Bacillus subtilis* y *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*.

Más información se encuentra en Hollaender (1943), Luckiesh, Taylor y Kerr (1944), Miller y Schad (1944), y Rahn (1945b).

EFECTO DE LA PRESIÓN OSMÓTICA

Puede definirse la osmosis como una difusión especial entre dos flúidos separados por una membrana permeable, con tendencia a igualar las condiciones reinantes a ambos lados de tal membrana.

Se llama «presión osmótica» el desequilibrio que da origen a los fenómenos de difusión y osmosis, por ejemplo en una solución en que existan diferencias de concentración.

Plasmólisis. La rapidez con que el agua entra en las células y sale de ellas depende en parte de la relación que existe entre las concentraciones de electrólitos dentro y fuera de la membrana celular, sobre la que ejerce cierta presión la mayor parte del contenido de la célula. Si se sumerge un microorganismo en una solución de presión osmótica más elevada, la célula perderá agua, hasta que se establezca un equilibrio entre las presiones osmóticas dentro y fuera de ella. Si la diferencia inicial entre estas dos presiones es suficientemente grande, la membrana citoplasmática se contraerá con los elementos del citoplasma y se agrupará en el centro de la célula; se dice entonces que ésta se ha plasmolizado, y el proceso se denomina «plasmólisis». La soución del exterior es hipertónica respecto a la del interior de la célula.

Plasmoptisis. Sumergiendo un microorganismo en una solución de presión osmótica inferior, penetra agua en la célula, hasta que se equilibran las presiones osmóticas interior y exterior. Cuando la diferencia entre ambas es suficiente al principio, la membrana celular se rompe y deja escapar el contenido de la célula; ésta se ha plasmoptizado, ha experimentado «plasmoptisis». En este caso, la solución exterior es hipotónica respecto al líquido intracelular.

Soluciones isotónicas. Si son iguales las concentraciones de iones y moléculas dentro y fuera de la membrana celular, no habrá diferencia entre las presiones osmóticas respectivas; el contenido celular no se contrae ni se dilata. Ambas soluciones se califican entonces de isotónicas entre sí.

Para observar cualquier efecto tóxico sobre bacterias es necesario que aumente mucho la presión osmótica de la solución que las contiene.

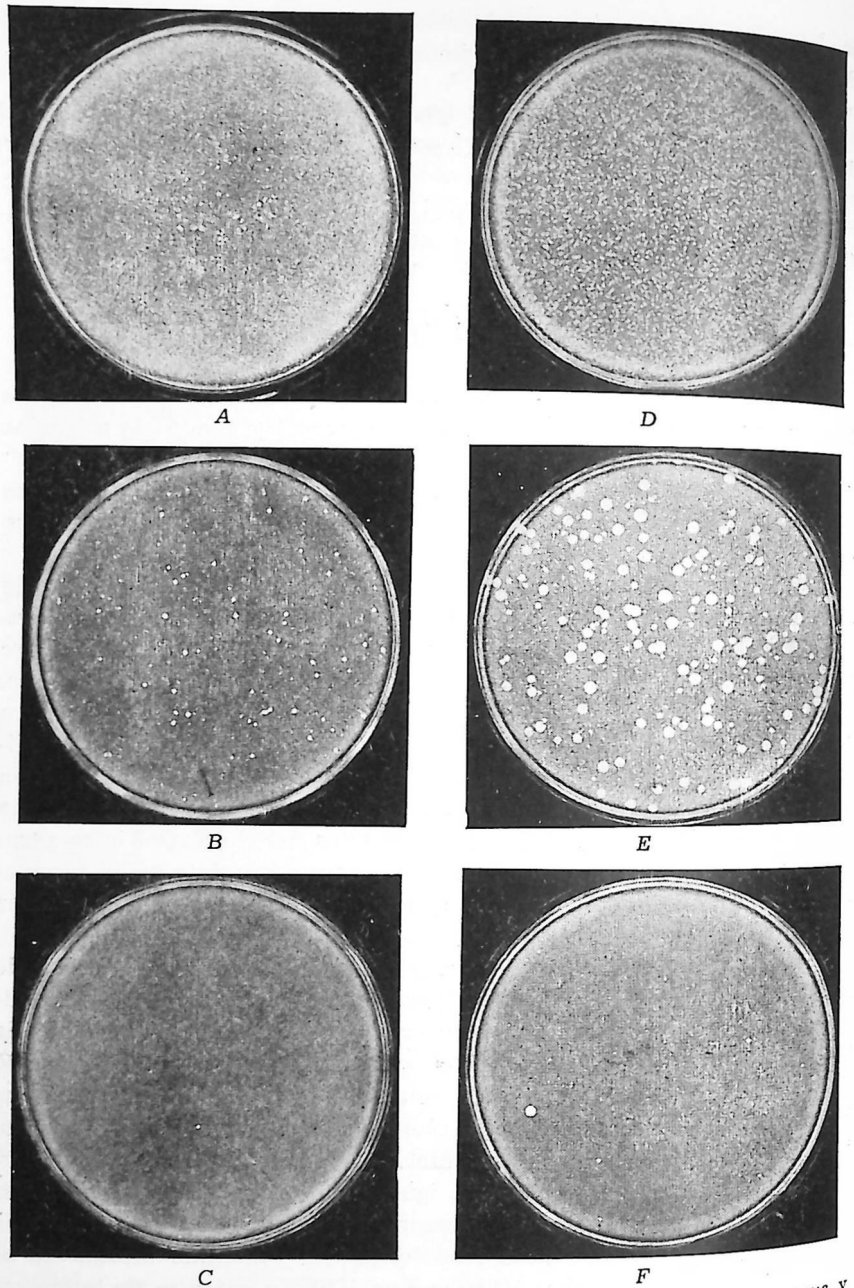


Fig. 102. — Efecto de la presión osmótica. *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* y *Escherichia coli* mantenidos en una solución de cloruro sódico al 30 %, mezclados luego con agar fundido y vertidos en placas, *A*. *M. pyogenes* var. *aureus* vertido inmediatamente; *B*, el mismo a las 24 horas; *C*, el mismo a las 48 horas; *D*, *E. coli* vertido inmediatamente; *E*, el mismo a las 24 horas; *F*, el mismo a las 48 horas.

En este aspecto, las bacterias difieren considerablemente de las células de plantas y animales superiores, que son muy sensibles a cambios relativamente pequeños de la concentración iónica del medio exterior.

Las presiones osmóticas elevadas tienen aplicación práctica para preservar del ataque de hongos algunos alimentos. Se hace uso de este principio en la conservación de mermeladas, jaleas y leche condensada, por adición de azúcar, y en la de carnes y pescados, mediante el empleo de sal (fig. 102).

Bacterias marinas. La mayoría de las bacterias del agua del mar difieren de las de agua dulce en que pueden soportar concentraciones mucho mayores de sal (ZoBell y Feltham, 1933; ZoBell, 1941, 1942). ZoBell y Feltham comprobaron que menos de 10 % de las bacterias aisladas de agua del mar eran capaces de multiplicarse en medios nutritivos de agua dulce, y aun era inferior la proporción en que podían reproducirse en medios preparados con agua de mar sin diluir las especies aisladas de agua dulce.

ZoBell y Michener (1938) aclimataron bacterias marinas a soluciones hipotónicas, diluyendo gradualmente el medio salobre a cada nueva siembra de los cultivos. De 12 especies aisladas, la mayoría llegaron a aclimatarse a medios con 25 a 30 % de agua de mar; por debajo de esta concentración se hizo muy difícil y pesado el desarrollo de los gérmenes. Excepto tres, todos los cultivos originales conservados en la nevera sobre agar y agua de mar sin diluir se reprodujeron al trasladarlos a un medio con agua dulce; los otros tres lo hicieron en un medio con 10 % de agua salada. Los cultivos viejos de repuesto se adaptaron a soluciones hipotónicas mejor que otros cultivos de los mismos gérmenes aclimatados gradualmente a concentraciones cada vez menores de medio salobre.

Esta observación parece discrepar de las opiniones admitidas respecto a la adaptabilidad de los microorganismos a cambios de ambiente; pero, pensándolo mejor, han de tenerse en cuenta otros factores para interpretar correctamente los hechos. Está bien demostrado que las bacterias jóvenes son más sensibles a condiciones adversas de ambiente que las viejas (Sherman y Albus, 1923, y otros). Los cultivos gradualmente aclimatados a concentraciones decrecientes de agua de mar tienden a mantener los gérmenes en estado físico joven; en cambio, los cultivos originales de repuesto envejecen físicamente y se hacen menos sensibles a las alteraciones del medio, y por eso pueden adaptarse mejor a condiciones poco propicias.

Véase más información en Orskov (1948).

INFLUENCIA DE LA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Se ha comprobado que la presión hidrostática ejerce un efecto manifiesto sobre el desarrollo bacteriano. ZoBell y Johnson (1949) estudiaron tal acción experimentando con especies representativas de bacterias y levaduras mesófilas terrestres de los géneros *Alcaligenes, Bacillus, Clostridium, Escherichia, Micrococcus, Mycobacterium, Proteus, Pseudomonas, Sarcina, Serratia, Streptococcus, Hansenula, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Sporobolomyces* y *Torula*. Según estos autores, a 30° C se desarrollan los microorganismos terrestres abundantemente en 48 horas, a la presión normal, pero no a 600 atm. (633 Kg por cm^2); algunas de las bacterias quedaron esterilizadas bajo esta presión en el curso de la incubación. El desarrollo de la mayoría de las especies se retarda visiblemente con una presión hidrostática de 400 atm., y los recuentos en placa denotan que los gérmenes crecen más despacio y mueren antes a 300 atm. que a la presión normal.

En cambio, especies marinas, en particular *Bacillus submarinus* y *B. thalassokoites*, aislados de capas profundas con una presión aproximada de 500 atm., crecieron fácilmente a 600 atm. y a temperaturas de 30 y de 40° C. Otras especies recogidas cerca de la superficie del mar resultaron intermedias, o más similares a las formas terrestres por su sensibilidad a la presión. La especie *Pseudomonas xanthrochrus* se desarrolló entre 400 a 600 atm., a 40° C, pero no pudo hacerlo a la presión normal y la misma temperatura.

En general, el retardo de la presión se advierte más a temperaturas bajas que a las altas. El efecto evidente de estas últimas es opuesto a la acción dilatoria de la presión hidrostática.

En comunicaciones posteriores, Johnson y ZoBell (1949 *a*, *b*) hacen saber que esporas de *Bacillus subtilis*, suspendidas en una solución salina atemperante (tope) de pH 7, pierden poco a poco su viabilidad a 25° C, y esta pérdida se acelera con una presión hidrostática de 600 atmósferas. A 92,5 ó a 93,6° C, suspensiones correspondientes se vuelven pronto menos viables, pero esta reducción se retarda mediante esa misma presión.

Se encuentra información acerca del efecto de la presión hidrostática sobre ciertas enzimas en Johnson y Eyring (1948).

CONSERVACIÓN DE BACTERIAS

Los microbios desecados no pueden reproducirse, pues esta función requiere absolutamente humedad. Cuando los microorganismos se desecan van muriendo gradualmente a un ritmo que depende de varios factores; la desecación rápida no destruye bacterias tan fácilmente como la lenta. La causa de la muerte no se conoce con exactitud; puede ser la degeneración de las proteínas protoplasmáticas o la destrucción de las enzimas esenciales, etc.

La proporción de supervivientes durante la desecación puede oscilar dentro de amplios límites, según las especies, la edad del cultivo, la superficie en que se desequen las células, la temperatura aplicada y la composición del medio en que los gérmenes estén suspendidos.

Las bacterias cultivadas en caldo, leche u otros líquidos albuminosos sobreviven bastante bien a la desecación. Se supone que las proteínas del medio preservan las células, actuando como coloides protectores que hacen el proceso menos brusco; en cambio, las bacterias suspendidas en agua ó solución salina perecen fácilmente al desecarlas.

Las esporas resisten mejor la desecación que las células vegetativas que las originan, y pueden soportar durante largo tiempo condiciones adversas. De manera análoga, los microorganismos encapsulados son más resistentes a la desecación que los que no producen cápsulas; el depósito mucilaginoso que los rodea sirve de capa protectora y disminuye la rapidez con que pierden agua.

Las bacterias desecadas soportan mejor los factores de destrucción que cuando están húmedas. Se necesitan temperaturas mucho más altas para coagular el plasma de microorganismos parcialmente desecados que para conseguir igual efecto con células en condiciones normales. Probablemente, el calor no puede coagular el protoplasma de bacterias bien desecadas, y esto explica la necesidad de emplear temperaturas más altas en el esterilizador de aire seco que en el autoclave para esterilizar instrumentos y utensilios de vidrio. Las esporas bacterianas desecadas son también más resistentes a condiciones adversas que las mantenidas en estado húmedo.

La muerte de las bacterias por obra del calor seco se atribuye a oxidación; el protoplasma seco no se coagula a 100° C, y las enzimas retienen su actividad. El coeficiente de mortalidad aumenta con la temperatura, simplemente por hacerse más rápida la oxidación.

En las figuras 103 y 104 se expone el efecto de la desecación a 37° C sobre la supervivencia de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Para más información véanse Rahn (1945b) y Watts (1945).

Cultivos de repuesto. Las bacterias para uso docente se conservan, por lo general, en cultivos de agar inclinado, con excepción de ciertos gérmenes patógenos que requieren la adición de suero, sangre u otros humores orgánicos; bacterias anaerobias que se desarrollan bien en carne picada; estreptococos patógenos que prefieren un medio semisólido; ciertos microbios del suelo que requieren medios inorgánicos especiales, etc. Los catabolitos tóxicos segregados por microorganismos se

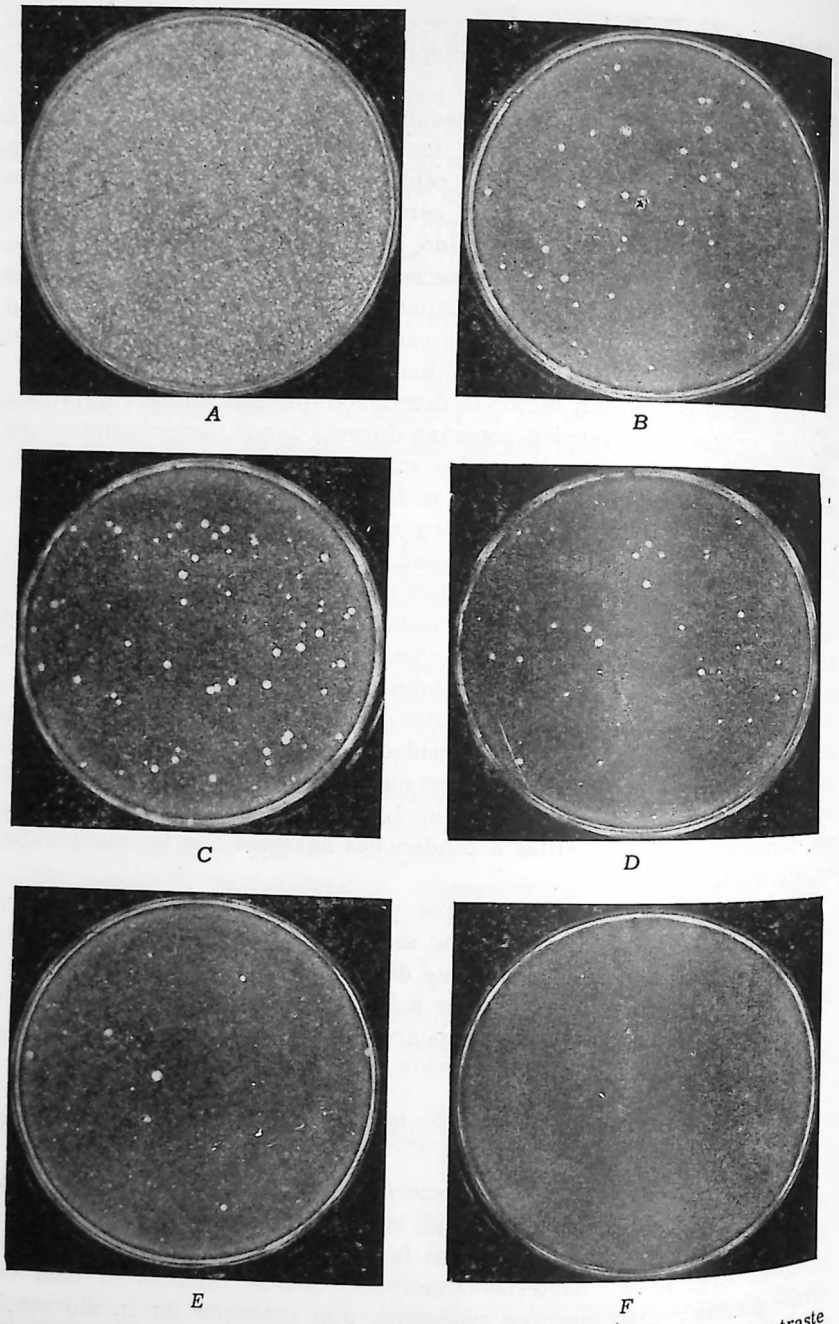


Fig. 103. — Efecto de la desecación sobre gérmenes de *Escherichia coli*. *A*, contraste (testigo), no desecado; *B*, desecado 24 horas a 37° C; *C*, desecado 48 horas; *D*, desecado 72 horas; *E*, desecado 96 horas; *F*, desecado 216 horas.

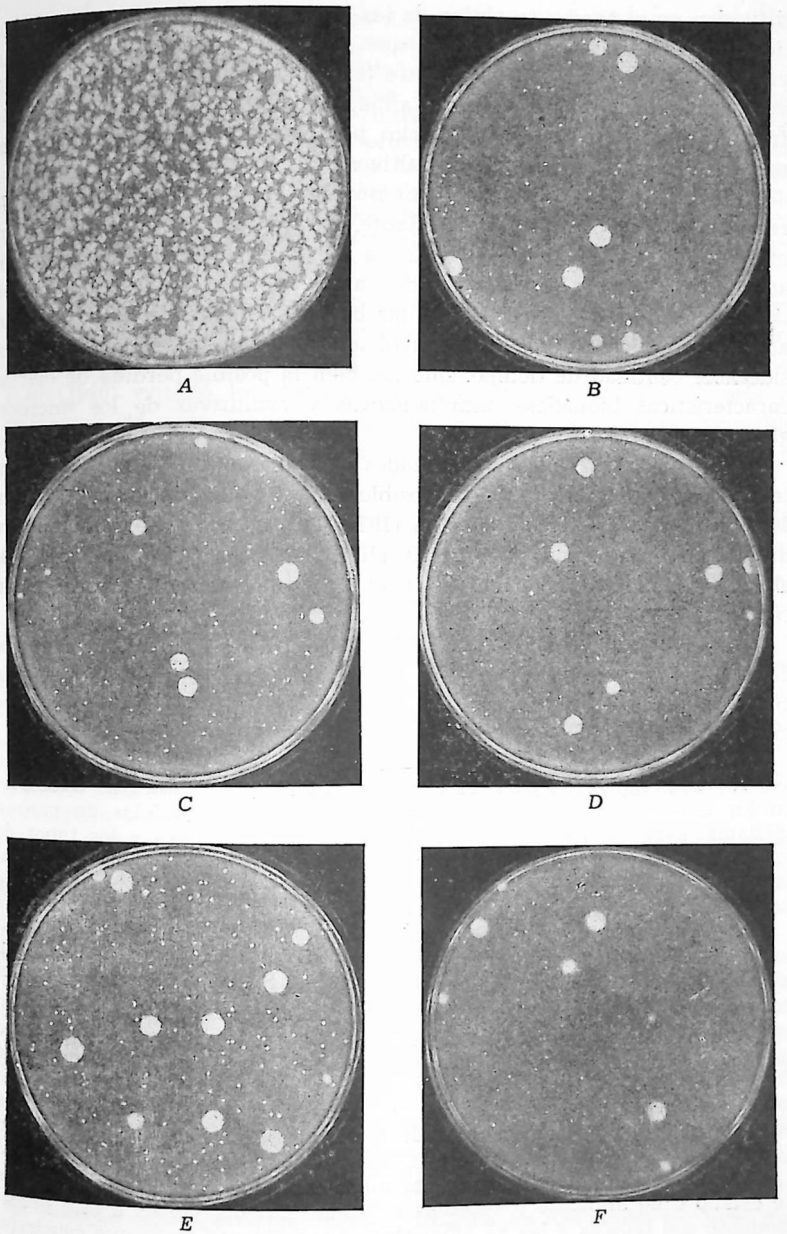


Fig. 104. — Efecto de la desecación sobre *Bacillus subtilis*. *A*, contraste (testigo), no desecado; *B*, desecado 24 horas a 37° C; *C*, desecado 48 horas; *D*, desecado 72 horas; *E*, desecado 96 horas; *F*, desecado 216 horas. El germen produce esporas que no se destruyen en el lapso indicado.

difunden en el agar y se alejan de las bacterias, que por esta propiedad del agar sobreviven más tiempo que en medios líquidos, donde están en continuo contacto con los detritos tóxicos disueltos en ellos. Los cultivos en agar se tienen prevenidos almacenándolos en un local o armario fresco y oscuro, a fin de emplearlos para efectuar siembras en el momento oportuno; se denominan cultivos de repuesto.

El mantenimiento de un gran número de cultivos bacterianos de repuesto exige una atención constante, para evitar que se pierdan gérmenes. Con este fin, lo corriente es preparar resiembras en medios adecuados a intervalos determinados, antes de que los substratos primitivos se deshidraten demasiado y las bacterias lleguen a destruirse por acumulación de desechos del metabolismo. Esto supone, no sólo una considerable cantidad de tiempo, sino también la posible pérdida de ciertas características biológicas, inmunológicas y evolutivas de los microorganismos.

Son varios los métodos empleados para conservar bacterias y mantenerlas lo más íntegramente posible en su estado primitivo. Según Morton y Pulaski (1938) y Morton (1938), todos estos métodos se pueden dividir en dos grupos; en uno de ellos, las bacterias se conservan al abrigo de una desecación lenta; en el otro se conservan por desecación rápida.

Conservación al abrigo de la desecación lenta. Todos los métodos de este grupo tratan de conservar los cultivos aplicando algún tipo de cierre hermético a los tubos, para impedir y atenuar la desecación. Los más importantes son:

1.º Impregnar con parafina los tapones de algodón antes de colocarlos en los tubos; los tapones se quitan fácilmente calentándolos un poco a la llama, para fundir la parafina. Otras veces los tapones y los tubos de ensayo se cubren por arriba de cera fundida; pero esto no conviene, pues la cera solidificada es quebradiza y tiene que reemplazarse cada vez que se destapan los tubos.

El taponamiento con parafina o cera presenta inconvenientes: *a)* estos materiales son difíciles de eliminar durante la limpieza. *b)* No preservan los cultivos de contaminaciones por mohos, que dejan a menudo sus esporas en los tapones de algodón. Cuando éstos se cubren de cera o parafina, los humedece la evaporación del agua del medio de cultivo, y el agua no tarda en concentrarse lo suficiente para que germinen las esporas; se desarrollan entonces hifas, que penetran en el medio a través de los tapones. *c)* Muchos gérmenes se disocian cuando se guardan en tubos cerrados y experimentan cambios de forma de las colonias, de virulencia, de especificidad inmunológica, etc.

2.º Cubrir la embocadura de los tubos con papel parafinado, laminillas de estaño o de aluminio o cápsulas de goma. Las objeciones a este procedimiento son iguales a las ya expuestas, especialmente en lo que concierne a contaminaciones por mohos.

3.º Cerrar los tubos de cultivo como si fueran ampollas, fundiendo sus bordes al soplete y estirándolos con pinzas. Los inconvenientes, en este caso, son: *a)* destrucción de tubos de ensayo; *b)* dificultades al abrir las ampollas; *c)* disociación fácil de los cultivos así conservados.

4.º Cubrir los medios de cultivo con una capa de parafina estéril o de petróleo. Para cultivos en caldo se empleará una capa de petróleo hasta de 1 cm de espesor; los cultivos en agar inclinado se incubarán primero hasta que se inicie una proliferación satisfactoria, y se cubrirán luego de petróleo estéril hasta 1 cm de altura sobre la superficie inclinada. Las resiembras se efectúan fácilmente tomando del cultivo una asa cargada, tocando con ésta la pared interior del tubo para desprender el petróleo sobrante, y trazando estrías sobre la superficie del nuevo medio de cultivo.

Habitualmente hay que resembrar cepas recién aisladas de *Neisseria gonorrhoeae* por lo menos dos veces semanales, y otras más viejas, alrededor de una vez por semana, para mantener viables los gérmenes. Hac (1940) estudió los diversos métodos de conservación de más de 400 cepas de este gonococo. Las conservadas con tapones revestidos de parafina estéril permanecieron viables tras resiembras a intervalos de seis y doce meses.

Simmons (1942) ha conservado cultivos de estreptococos β de origen humano, *Corynebacterium diphtheriae,* micrococos y salmonelas bajo petróleo, y comprobado que estos microorganismos seguían siendo viables después de períodos de resiembra de 12 a 24 meses.

Este método posee claras ventajas sobre los ya mencionados: 1.ª, es barato; 2.ª, los cultivos no se evaporan; 3.ª, se evita la disociación; 4.ª, es fácil la resiembra en otros medios; 5.ª, no hacen falta aparatos especiales, como desecadores, bombas de vacío, etc., y 6.ª, los cultivos quedan protegidos contra la contaminación por mohos.

Sea cuál fuere el método empleado de este grupo, ninguna de ellos sirve para conservar bacterias indefinidamente. Todos los microorganismos se van haciendo poco a poco menos viables y finalmente sucumben, de no pasarlos a nuevos medios nutritivos a intervalos determinados.

Véase más información en Hartsell (1953).

Conservación por desecación rápida. Kitasato (1889) observó que el germen del cólera, *Vibrio comma,* sobrevivía más después de desecarlo en un desecador que cuando se hacía esta operación al aire. Posteriormente, muchos investigadores han desecado otros microorganismos en desecador, con resultados análogos.

Shackell (1909) recomendaba la congelación antes de una desecación rápida. Los cultivos pueden congelarse en una mezcla de hielo y sal, o, mejor aún, con dióxido de carbono sólido (nieve carbónica), y luego se desecan al vacío sobre ácido sulfúrico en concepto de desecante. Este método, con sus numerosas modificaciones (Swift, 1937; Flosdorf y Mudd, 1935, 1938, y más recientemente Rayner, 1943; Antoine y Hargett, 1943; Rogers, 1949; Frobisher, Klein y Cummings, 1949; Stein

y Rogers, 1950), se usa ampliamente en la actualidad para conservar bacterias, virus, sueros, toxinas, fermentos y otros productos biológicos.

Stein y Rogers diseñaron un sencillo aparato para la desecación rápida en vacío intenso de suspensiones congeladas de productos biológicos (fig. 105). Consta de los siguientes elementos: 1, ampolla de vidrio

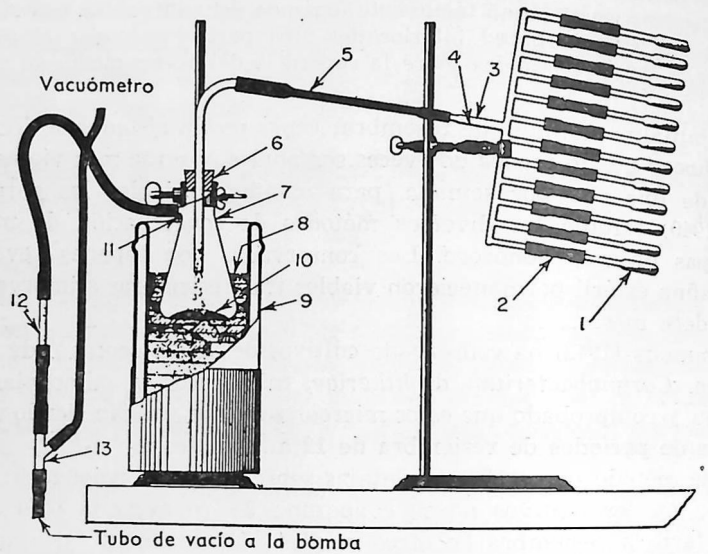


Fig. 105. — Aparato para la desecación rápida en vacío intenso de suspensiones congeladas de materiales biológicos. Descripción en el texto. (Según Stein y Rogers.)

que contiene la suspensión congelada; 2, tubo de goma que empalma las ampollas con la pipeta múltiple de vidrio; 3, pipeta múltiple de vidrio, con doce boquillas; 4, entrada de vapor; 5, tubo de goma; 6, tapón de goma; 7, condensador (matraz filtrante de vidrio Pirex); 8, refrigerante (nieve carbónica y alcohol), a —78° C; 9, cilindro de vacío; 10, vapor congelado; 11, descarga al matraz filtrante; 12, filtro absorbente de algodón en tubo de vidrio, y 13, tubo en T para aplicar el vacuómetro y la bomba de vacío.

Las bacterias se pueden conservar más tiempo por congelación y desecación en vacío que empleando los métodos enumerados en el primer grupo; algunas especies se han mantenido viables, así desecadas, no menos de veinte años. Las bacterias desecadas, además, no experimentan modificaciones apreciables en sus propiedades morfológicas, bioquímicas e inmunológicas, con relación a su estado antes de desecarlas.

Véase más información en Flosdorf (1949), Hutton, Hilmoe y Roberts (1951).

CONCENTRACIÓN DE HIDROGENIONES

Es bien sabido que la concentración de hidrogeniones en medios de cultivo es de primordial importancia para el desarrollo adecuado de bacterias. Algunos microorganismos crecen mejor en medio ácido; otros lo requieren alcalino, y algunos tienen predilección por substratos neutros. Para cada organismo existe una concentración óptima de iones hidrógeno, con la que se reproduce y vegeta en las condiciones más ventajosas; las concentraciones de hidrogeniones por encima de las

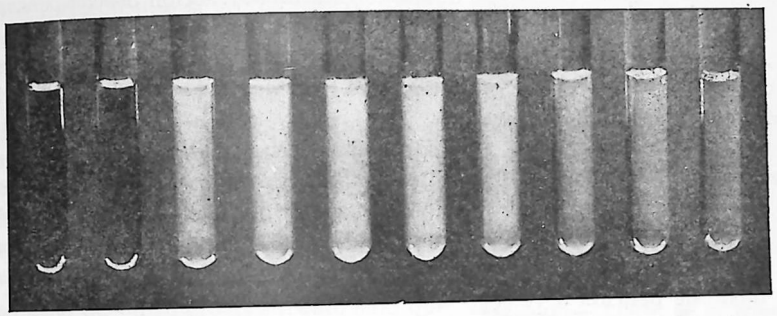


Fig. 106. — Efecto del pH sobre el desarrollo de *Escherichia coli*. De izquierda a derecha, pH 2,8 a 10, a intervalos de 0,8 Tubos 1 y 2, inactividad; tubos 3 a 6 inclusive, enturbiamiento creciente; tubos 7 a 10, enturbiamiento decreciente. El enturbiamiento máximo se ha producido en el tubo 6, con pH 6,8.

cuales cesa el desarrollo de un microorganismo se conocen por valores pH máximo y mínimo, respectivamente. Estos valores o índices son significativos sólo cuando los demás factores del medio se mantienen constantes. Si varía la composición del substrato, la temperatura de incubación o la presión osmótica del medio, aunque sea poco, se alteran también los valores mínimo, óptimo y máximo del pH para un microorganismo. La amplitud entre el valor mínimo y el máximo se conoce por límites o zona de pH de un germen determinado.

Michaelis y Marcora (1912) observaron que el *Escherichia coli* hacía fermentar lactosa, con producción de ácidos, hasta reducir el pH a 5, poco más o menos, lo bastante para detener el desarrollo de los gérmenes, y afirmaron que la concentración final de hidrogeniones en cultivos de *E. coli* era una constante fisiológica. Resultados similares han conseguido otros autores con distintos microorganismos. De todo ello puede deducirse que el crecimiento de cualquier germen fermentativo se detiene al alcanzar una concentración de hidrogeniones bastante definida; el grado último de acidez cambia según las especies. Estas observaciones han servido de base para diferenciar grupos de microorganismos estrechamente afines (pág. 570).

EFECTO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

La tensión superficial puede definirse como la propiedad, derivada de fuerzas moleculares, que existe en la capa superior de todos los líquidos y que tiende a dar al volumen contenido la forma de extensión superficial mínima.

Las moléculas atraen a otras próximas y son atraídas por ellas. Una molécula situada en el seno de un líquido se halla en equilibrio, por ser objeto de atracción igual en todas direcciones horizontales, pero desigual en las verticales, de donde resulta una atracción descompensada hacia el interior del líquido. Esta fuerza resultante alcanza su máximo en la superficie, y la masa de líquido se comporta como si estuviese rodeada por una membrana elástica que la comprime y tiende a reducirla al menor volumen posible.

La composición de la capa superficial de un medio de cultivo inoculado con un microbio puede diferir apreciablemente de la del mismo medio en su conjunto. Por eso, la tensión superficial de los medios de cultivo desempeña un importante papel en el desarrollo de un microorganismo, sobre todo si éste tiende a crecer en la superficie de aquéllos a modo de película o velo.

Estos gérmenes de desarrollo superficial fueron considerados durante algún tiempo como aerobios estrictos. La capa superior, expuesta al aire, les proporcionaba más oxígeno del que podrían obtener de otras más profundas. Pero lo cierto es que las bacterias productoras de película, si bien son aerobias, no lo son con carácter obligado, ya que pueden crecer y reproducirse en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La densidad de las bacterias es poco superior a la del medio en que se desarrollan; si la película que producen algunas, como el *Bacillus subtilis*, sedimenta o se sumerge, no sube de nuevo a la superficie, sino que permanece en el fondo del tubo, y se forma una nueva película superficial, que se mantiene evidentemente en esa posición en virtud de alguna fuerza del medio; esta fuerza se denomina tensión superficial.

La unidad de fuerza en el sistema cegesimal (CGS) de unidades físicas es la dina. Bajo la influencia de esta fuerza, una partícula de 1 g de masa experimenta una aceleración de 1 cm por segundo. La dina equivale aproximadamente a la fuerza ejercida por 1 mg de peso bajo la acción de la gravedad.

La tensión superficial de los medios corrientes de laboratorio varía entre 57 y 63 dinas; la del agua pura es de 73 dinas. Se pueden añadir a los medios de cultivo algunas substancias, con objeto de aumentar su tensión superficial; entre ellas figuran el carbón vegetal y el cloruro cálcico. El carbón vegetal tiene la propiedad de eliminar de los medios de cultivo substancias reductoras de la tensión superficial; ésta se eleva

a veces por la proliferación de bacterias en el substrato. Por el contrario, muchas otras substancias, añadidas a medios de cultivo, disminuyen su tensión superficial; tal ocurre con el alcohol etílico, los jabones, la glicerina y los detergentes sintéticos. Los jabones han sido durante mucho tiempo los únicos productos eficaces en este aspecto, pero van siendo reemplazados poco a poco por detergentes sintéticos o humectantes; estos últimos compuestos se dividen en detergentes aniónicos, catiónicos y no iónicos (pág. 248).

Larson, Cantwell y Hartzell (1919) descubrieron que si se reduce con jabón la tensión superficial de un caldo nutritivo a menos de 40 dinas, y se inocula entonces con *B. subtilis*, este germen da origen a una vegetación difusa, y no a una película superficial. Esto mismo se ha observado en otros gérmenes productores de película; de modo que la formación de ésta no parece guardar relación alguna con las necesidades de oxígeno de un microorganismo, sino que depende exclusivamente de la tensión superficial del medio (fig. 107).

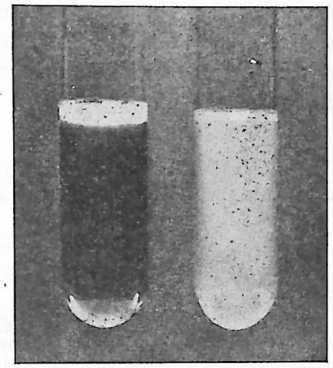


Fig. 107. — Efecto de la tensión superficial sobre el desarrollo de *Bacillus subtilis*. Izquierda: vegetación en caldo nutritivo, limitada casi exclusivamente a la película. Derecha: caldo nutritivo con 0,05,% de ricinoleato sódico para disminuir la tensión superficial; la vegetación se manifiesta por un enturbiamiento uniforme.

La humectabilidad es función de la tensión superficial. Si el medio nutritivo no moja las bacterias, éstas se desarrollan en la superficie y forman una delgada capa; si las moja, en lugar de película se observa un enturbiamiento uniforme del medio. Se ha comprobado que las bacterias productoras de colonias superficiales contienen substancias lipoideas en proporción mayor que los microorganismos desprovistos de esa facultad. El bacilo de la tuberculosis contiene 40 % de substancias grasas, en contraste con un 7 % que se encuentra en gérmenes que no forman velo en la superficie del medio.

Larson y Larson (1922) señalaron que los microorganismos productores de enturbiamiento uniforme pueden desarrollarse en película si se aumenta la proporción de lipoides. El contenido graso del *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* aumenta notablemente cultivándolo en un medio que contenga un carbohidrato o glicerina, ninguno de los cuales fermenta; este germen produce una película superficial muy parecida a la vegetación del bacilo tuberculoso.

Véase información adicional en Larson (1928).

ACCIÓN ANTAGÓNICA DE LOS IONES

Según Winslow y Falk (1923*a*), la *Escherichia coli* se mantiene durante casi 24 horas en agua destilada, con un pH próximo a 6, sin que disminuya de modo apreciable el número de bacterias. En las primeras horas aumenta este número, y con pH 5 es ya sensible la reducción. La viabilidad es menor al ajustar la solución a condiciones más ácidas o alcalinas (tabla 12). La línea gruesa indica la relación entre tiempo y pH que corresponde más de cerca a la reducción en un tercio del número de bacterias.

TABLA 12. — VIABILIDAD DE LA *Escherichia coli* EN AGUA DESTILADA

Horas	Proporción de supervivientes con pH						
	4	5	6	6,5	7	7,5	8
1	87	88	84	92	68	77	79
3	39	71	74	66	54	24	52
6	4	48	64	30	24	8	12
9	1	68	82	7	17	5	12
24	0	6	77	2	23	3	10
Número de experimentos	2	2	4	2	10	2	4

En cambio, una concentración 0,0145 molar de cloruro sódico favorece ostensiblemente la viabilidad de la *E. coli*. En lugar de una disminución ligera, pero manifiesta, en 24 horas, como en agua destilada con pH 6, se observa constancia del número de bacterias. Con NaCl a concentraciones mayores de la indicada, la proporción de gérmenes vivos aumenta paralelamente.

Resultados similares se obtienen substituyendo NaCl por $CaCl_2$. Los microbios se mantienen mejor en presencia de esta sal que en agua destilada sola. En este caso, también un pH 6 parece ser el que más favorece el desarrollo o la conservación de la *E. coli*, y la concentración más conveniente de cloruro cálcico resulta ser 0,00145 molar.

En otra comunicación, Winslow y Falk (1923 *b*) informan que soluciones de NaCl 0,724 M o de $CaCl_2$ 0,435 M, o más concentradas, muestran propiedades tóxicas evidentes sobre *E. coli* con cualquier pH. Sin embargo, en una solución que contenga una mezcla de estas dos sales en proporciones adecuadas, se advierte una acción antagónica, que tiende a proteger las bacterias contra la toxicidad de cada sal por separado (tabla 13). Este fenómeno se designa por acción antagónica de los iones.

TABLA 13. — VIABILIDAD DE LA *Escherichia coli* EN SOLUCIONES DE CLORURO SÓDICO Y CLORURO CÁLCICO, SOLOS O COMBINADOS

Concentración isotónica total*	Concentración molar total	Proporción de bacterias vivas (%) después de 9 horas en			
		NaCl puro	$CaCl_2$ puro	NaCl + $CaCl_2$	Relación Na/Ca
0	0	89	89	89	
1	0,145	82	22		
2	0,290	...	....	41	1:1
3	0,435	55	0+	28	2:1
4	0,580	...	....	40	3:1
5	0,725	46	0+	117	4:1
6	0,870	33	....	30	5:1

* Tonicidad 1 = 0,145 M.

MacLeod y Snell (1950) comprobaron que el zinc era tóxico para el *Lactobacillus arabinosus* y que su toxicidad podía contrarrestarse con manganeso; también se oponen a ella el magnesio, el calcio y el estroncio, pero estos iones no anulan la toxicidad del zinc para el *Leuconostoc mesenteroides*. Los citados autores creen que la toxicidad del zinc para el *L. arabinosus* resultaba de la formación de una zincproteína catalíticamente inactiva a partir de este ion, y de alguna otra normalmente activada por manganeso, magnesio, calcio o estroncio. Estos últimos iones contrarrestan la toxicidad del zinc desalojándolo de la proteína para formar una metaloproteína con actividad catalítica.

Abelson y Aldous (1950) descubrieron que el níquel, el cobalto, el cadmio, el zinc y el manganeso eran tóxicos para la *Escherichia coli* y que la toxicidad de estos cationes disminuía en presencia de abundante magnesio; cuando el medio no contiene este metal, los citados elementos son tóxicos a concentraciones muy bajas.

Una aplicación práctica de este fenómeno consiste en el empleo de una solución fisiológica ideada por Ringer antes de haberse llegado a comprender bien el antagonismo iónico. Ringer demostró que un corazón latiente perfundido con una solución de cloruro sódico al 0,75% cesaba de latir; al añadir a la solución 0,0125 % de cloruro cálcico, el corazón volvía a funcionar, pero no con normalidad. Una adición posterior de cloruro potásico al 0,01 % y un poco de substancia alcalina, como bicarbonato sódico, para ajustar el pH de la solución, hizo reaparecer las contracciones normales. Esta solución es conocida por el nombre de su descubridor; otras soluciones salinas fisiológicas de este tipo son las de Tyrode y de Locke.

ACCIÓN OLIGODINÁMICA DE LOS METALES PESADOS

Naegeli (1893) observó que la plata muy diluída producía un efecto tóxico en ciertos organismos y descubrió que una parte de plata en 100.000.000 de partes de agua mataba algas del género *Spirogyra*. Suponía que la plata, en dilución tan grande, no era capaz de ejercer una acción química sobre organismos vivos; y por eso atribuyó su efecto tóxico a una acción «oligodinámica». Esta palabra se compone de dos voces griegas: ὀλίγος, poco, y δυναμικός, potente, y se aplica a la toxicidad que los metales pesados, en cantidades sumamente pequeñas, desarrollan en organismos vivos.

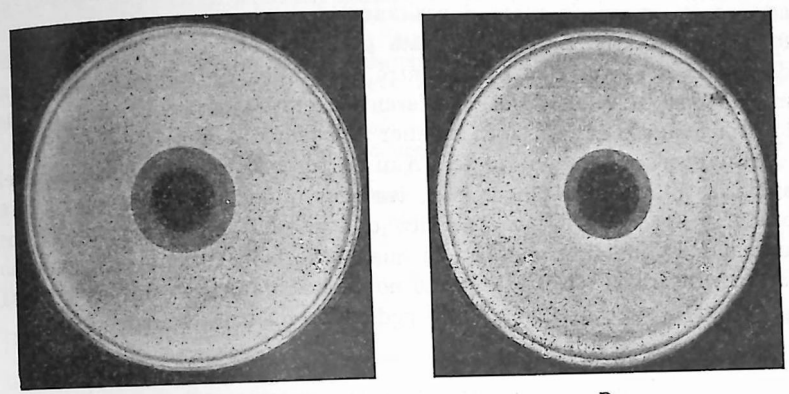
También otros metales son tóxicos para los seres vivientes. El cobre, diluído a razón de 1 parte en 77.000.000 de partes de agua, es tóxico para ciertas algas; las esporas de *Aspergillus niger* no germinan en presencia de 1 parte de plata en 1.600.000 partes de agua. El agua destilada en alambique de cobre resulta tóxica para las bacterias, a causa de los indicios del metal disueltos en ella; la destilada en alambiques de otros metales pesados es asimismo tóxica, pero no tanto, y no precisamente porque la toxicidad del cobre sea mayor, pues probablemente la del mercurio la supera, sino porque el cobre es más soluble en agua que los demás metales tóxicos. En consecuencia, debe evitarse el empleo de alambiques de metal para preparar aguas destiladas con fines biológicos.

ZoBell (1941) descubrió que los recipientes de aleaciones de cobre, zinc, estaño o níquel no servían para conservar muestras de agua de mar con destino a análisis biológicos, a causa de la perniciosa acción oligodinámica de los metales. En ciertas condiciones, la mayoría de las bacterias contenidas en agua de mar murieron en pocos minutos, y el agua misma se hizo bacteriostática por haber estado en contacto con los metales.

Burrows y Hemmens (1943) informaron que bacterias adheridas por frotación a la superficie pulimentada de un cáliz de plata morían rápidamente. Experimentos sobre transmisión de microorganismos de ensayo de una persona a otra por el uso común del cáliz demostraron que aproximadamente 0,001 % de los gérmenes se transferían aun en las condiciones más favorables; en otras similares a las del uso corriente no se advirtió transmisión alguna.

Demostración de la acción oligodinámica. La plata ejerce sobre las bacterias una acción bactericida u oligodinámica muy manifiesta. Esto puede demostrarse colocando en una placa de Petri un trocito de plata metálica o una moneda de plata y vertiendo encima agar fundido en el que se haya sembrado un microorganismo como la *Sarcina lutea* o la

Serratia marcescens. Después de 24 horas de incubación a 37° C, se ve una zona clara en torno al trozo o la moneda de plata; ésa es la zona oligodinámica (fig. 108), por fuera de la cual se encuentra otra más estrecha, donde el desarrollo está activado. Cantidades diminutas de iones metálicos estimulan el crecimiento, mientras que concentraciones mayores producen inhibición o auxostasis. En el resto del agar, el desarrollo es normal. El mismo resultado se obtiene utilizando un trozo o una moneda de cobre, y no de plata.



A B

Fig. 108. — Acción oligodinámica de la plata. *A*, agar inoculado con *Sarcina lutea* y vertido sobre un platillo que contenía una moneda de plata; *B*, agar inoculado con *Serratia marcescens*. La faja circular que rodea inmediatamente la moneda es la zona oligodinámica, circundada a su vez por otra más estrecha de estimulación. En el resto del agar, el desarrollo es normal.

Gibbard (1937), a propósito de la acción de la plata sobre las bacterias, llegó a las siguientes conclusiones generales: 1.ª La amplitud de la zona oligodinámica aumenta al tratar la plata con ácido nítrico y disminuye limpiando el metal con cuidado. 2.ª La plata metálica pura no muestra acción bactericida u oligodinámica, y sus propiedades tóxicas derivan probablemente de iones argénticos procedentes de óxido de plata; si se impide la formación del óxido, no hay acción inhibitoria, como puede comprobarse fundiendo la plata y dejando enfriar una parte de ella en hidrógeno y otra al aire; la plata enfriada en hidrógeno carece de actividad bactericida, mientras que la enfriada al aire la posee en alto grado. 3.ª El nitrato argéntico, el óxido de plata y la plata coloidal dispersada eléctricamente, si se diluyen de modo que contengan el metal a la misma concentración, muestran una acción bactericida semejante. 4.ª Las propiedades bactericidas del nitrato argéntico y del óxido de plata disminuyen mucho en presencia de proteínas, pues se forman proteinatos argénticos que retiran la plata de la solución.

Aplicaciones de la acción oligodinámica. Lisbonne y Seigneurin (1936*a-b*) demostraron que el mercurio podía utilizarse para destruir *E. coli* en el agua potable.

Se ha recomendado la plata para el tratamiento de agua, leche, vinagre, vino, sidra, zumos de fruta, licores, etc. Su aplicación principal parece ser el tratamiento de agua para beber; según Gibbard, se emplean comercialmente con este fin tres métodos corrientes: 1.° Exponer el agua a la acción de plata depositada sobre arena, porcelana u otros materiales sólidos. 2.° Aplicar plata por electrólisis. 3.° Aprovechar la diferencia de f.e.m. que existe entre electrodos de níquel y de plata, mantenidos en el material a diferentes temperaturas. El objetivo de los tres métodos es el mismo: obtener una solución de plata.

Envenenamiento por plata. Aún se discute mucho sobre si en el agua, los alimentos, bebidas, etc., tratados queda suficiente plata para producir envenenamiento argéntico o argirismo en el hombre y los animales. Es importante saber en qué proporción retiene el organismo la plata ingerida; sobre este punto no existen datos disponibles y habrá que trabajar mucho aún antes de poder dar fin a la controversia.

EFECTO DEL SACUDIMIENTO

Se ha demostrado que los microorganismos pueden ser destruídos por una vigorosa agitación.

Curran y Evans (1942) agitaron cultivos bacterianos y suspensiones de esporas con abrasivos tales como cuentas de vidrio, arena y carborundo, y consiguieron disminuir así notablemente la cifra de gérmenes viables. Resultados análogos obtuvieron King y Alexander (1948).

Las células morían al romperse en diminutos fragmentos; las deterioradas no podían recuperarse, de no ser muy ligero el daño. Es razonable suponer que sólo se repongan en caso de mantenerse intacto el núcleo o la substancia nuclear.

REFERENCIAS

Abelson, P. H., y E. Aldous: Ion antagonisms in microorganisms: interference of normal magnesium metabolism by nickel, cobalt, cadmium, zinc, and manganese, *J. Bact.*, **60**: 401, 1950.

Antoine, L. D., y M. V. Hargett: Machine for shell freezing small volumes of biological preparations, *J. Bact.*, **46**: 525, 1943.

Arnold, R. B., y O. F. Garrett: Bactericidal action of radiant energy from special types of lamps on organisms found on dairy utensils and equipmen, *J. Dairy, Sci.*, **26**: 309, 1943.

Bedford, T. H. B.: The nature of the action of ultraviolet light on microorgamisms, *Brit. J. Exp. Path.*, **8**: 437, 1927.

Blundell, G. P., L. A. Erf, H. Jones, y R. T. Hoban: Observations on the effect of ultraviolet irradiation (Knott technic) on bacteria and their toxins, suspended in human blood and appropriate diluents, *J. Bact.*, **47**: 85, 1944.

Burrows, W., y E. S. Hemmens: Survival of bacteria on the silver communion cup, *J. Infectious Diseases*, **73**: 180, 1943.

Campbell, J. J. R., y G. B. Reed: Characteristics of some psychrophilic bacteria, *Can. J. Research, F.*, **25**: 280, 1947.

Curran, H. R.: Resistance in bacterial spores, *Bact. Rev.*, **16**: 111, 1952.

— y F. R. Evans: The influence of enrichments in the cultivation of bacterial spores previously exposed to lethal agencies, *J. Bact.*, **34**: 179, 1937.

— y —: The killing of bacterial spores in fluids by agitation with small inert particles, *ibíd.*, **43**: 125, 1942.

Davis, F. L., Jr., y O. B. Williams: Studies on heat resistance. I. Increasing resistance to heat of bacterial spores by selection, *J. Bact.*, **56**: 555, 1948.

Desrosier, N. W., y W. B. Esselen, Jr.: Attempts to increase the heat resistance of the spores of a putrefactive anaerobe by selection, *J. Bact.*, **61**: 541, 1951.

Flosdorf, E. W.: «Freeze-Drying», Nueva York, Reinhold Publishing Corp., 1949.

— y S. Mudd: Procedure and apparatus for preservation in «Lyophile» form of serum and other biological substances, *J. Immunol.*, **29**: 389, 1935.

— y —: An improved procedure and apparatus for preservation of sera, microorganisms, and other substance—the Cryochem process, *ibíd.*, **34**: 469, 1938.

Fricke, H., y M. Demerec: The influence of wave-length on genetic effects of X-rays, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **23**: 320, 1937.

Frobisher, M., Jr., G. C. Klein, y M. M. Cummings: Preservation of mycobacteria by desiccation in vacuo, *Am. Rev. Tuberc.*, **60**: 621, 1949.

Gibbard, J.: Public health aspects of the treatment of water and beverages with silver, *Am. J. Pub. Health*, **27**: 122, 1937.

Gordon, R. E., y N. R. Smith: Aerobic spore-forming bacteria capable of growth at high temperatures, *J. Bact.*, **58**: 327, 1949.

Greene, G. I., y F. J. Babel: Effect of ultraviolet irradiation on bacteriophage active against *Streptococcus lactis*, *J. Dairy Sci.*, **31**: 509, 1948.

Hac, L. R.: Preservation of cultures of *N. gonorrhoeae*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**: 381, 1940.

Hartsell, S. E.: The preservation of bacterial cultures under paraffin oil, *Applied Microbiol.*, **1**: 36, 1953.

Heinmets, F., y W. W. Taylor, Jr.: Photobiological studies on *Escherichia coli* at low temperature, *J. Bact.*, **62**: 477, 1951.

Hercik, F.: Action of ultraviolet light on spores and vegetative forms of *B. megatherium* sp., *J. Gen. Physiol.*, **20**: 589, 1937.

Hilliard, C. M., y M. A. Davis: The germicidal action of freezing temperatures upon bacteria, *J. Bact.*, **3**: 423, 1918.

Hollaender, A.: Effect of long ultraviolet and short visible radiation (3500 to 4900 Å.) on *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **46**: 531, 1943.

— y C. W. Emmons: The action of ulraviolet radiation on dermatophytes. I. The fungicidal effect of monochromatic ultraviolet radiation on the spores of *Trichophyton mentagrophytes*, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **13**: 391, 1939.

Hutton, R. S., R. J. Hilmoe, y J. L. Roberts: Some physical factors that influence the survival of *Brucella abortus* during freeze-drying, *J. Bact.*, **61**: 309, 1951.

Jensen, L. B.: «Microbiology of Meats», Champaign, III., The Garrard Press, 1945.

Johnson, F. H., y H. Eyring: The fundamental action of pressure, temperature, and drugs on enzymes as revealed by bacterial luminescence, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **49**: 376, 1948.

—, E. A. Flager, y H. F. Blum: Relation of oxygen to photoreactvation of bacteria after ultraviolet radiation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**: 32, 1950.

— y C. E. ZoBell: The retardation of thermal disinfection of *Bacillus subtilis* spores by hydrostatic pressure, *J. Bact.*, **57**: 353, 1949*a*.

— y —: The acceleration of spore disinfection by urethan and its retardation by hydrostatic pressure, *ibíd.*, **57**: 359, 1949*b*.

Jungeblut, C. W.: Effect of ultraviolet irradiation on poliomyelitis virus in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **37**: 160, 1937.

Kelner, A.: Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation, *J. Bact.*, **58**: 511, 1949.

Kelner, A.: Revival by ligth, *Sci. American*, pág. 22, mayo 1951*a*.
—: Action spectra for photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Echerichia coli* and *Streptomyces griseus*, *J. Gen. Physiol.*, **34**: 835, 1951*b*.
—: Growth, respiration, and nucleic acid synthesis in ultraviolet-irradiated and in photoreactivated *Escherichia col*, *J. Bact.*, **65**: 252, 1953.
Kendall, A., y C. A. Colwell: The effect of ultraviolet radiation upon bacteriophage, *Quart. Bull. Northwestern Univ. Med. School*, **14**: 15, 1940.
King, H. K., y H. Alexander: The mechanical destruction of bacteria, *J. Gren. Microbiol.*, **2**: 315, 1948.
Kitasato, S.: Die Widerstandfähigkeit der Cholerabakterien gegen das Eintrocknen und gegen Hitze, *Z. Hyg.*, **5**: 134, 1889.
Larson, W. P.: The effect of the surface tension of the menstruum upon bacteria and toxins. De «The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology», ed. por E. O. Jordan y I. S. Falk, Chicago, University of Chicago Press, 1928.
—, W. F. Catwell, y T. B. Hartzell: The influence of the surface tension of the culture medium on the growth of bacteria, *J. Infectious Diseases*, **25**: 41, 119.
Larson, L. W., y W. P. Larson: Factors governing the fat content of bacteria and the influence of fat on pellicle formation, *J. Infectious Diseases*, **31**: 407, 1922.
Levaditi, C., y G. Voet: Comportement du bactériophage et du virus herpétique à l'égard du rayonnement total de la lampe à mercure, *Compt. rend. Soc. biol.*, **120**: 638, 1935.
Lisbonne, M., y R. Seigneurin: Action bactéricide du mercure sur le *Bacterium coli* dans l'ean en écoulement continu, *Compt. rend. Soc. Biol.*, **122**: 8, 1936*a*.
— y —: Sur l'action bactéricide du mercure, *Compt. rend.*, **202**: 169, 1936*b*.
Luckiesh, M. ,G. P. Kerr, Jr., y T. Knowles: Killing bacteria in water under pressure, *Gen. Elec. Rev.*, **50**: 16, 1947.
—, A. H. Taylor, y G. P. Kerr: Germicidal energy, *ibid.*, **47**: 7, 1944.
—, —, T. Knowles, y E. T. Leppelmeier: Inactivation of molds by germicidal ultraviolet energy, *J. Franklin Inst.*, **248**: 311, 1949.
Luyet, B. J., y P. M. Gehenio: Life and death at low temperatures, Monograph 1, *Biodynamica*, 1940.
MacLeod, R. A., y E. E. Snell: The relation of ion antagonism to the inorganic nutrition of lactic acid bacteria, *J. Bact.*, **59**: 783, 1950.
Mattick, A. T. R., y E. R. Hiscox: Some observations on the resistance of microorganisms to heat, and related phenomena, *Proc. Soc. Appl. Bact.* (Extr.), 1945.
Michaelis, L., y F. Marcora: Die Säureproduktivität des *Bacterium coli*, *Z. Immunitätsforsch.*, Abt. I, Orig., **14**: 170, 1912.
Miller, C. P., y D. Schad: Germicidal action of daylight on meningococci in the dried state, *J. Bact.*, **47**: 79, 1944.
Morton, H. E.: The preservation of bacterial cultures. II. Summary of methods, *Am. J. Clin. Path.*, **8**: 243, 1938.
— y E. J. Pulaski: The preservation of bacterial cultures. I. *J. Bact.*, **35**: 163, 1938.
Nelson, F. E.: Factors which influence the growth of heat-treaed bacteria, *J. Bact.*, **45**: 395, 1943.
Novick, A., y L. Szilard: Experiments on light reactivation of ultraviolet inactivated bacteria, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **35**: 591, 1949.
Orskov, S. L.: Experiments on active and passive permeability of *Bacillus coli communis*, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **25**: 277, 1948.
Rahn, O.: Chemistry of death, *Cold Spring Harbor Symposia Quan. Biol.*, **2**: 70, 1934.
--: Injury and death of bacteria by chemical agents, *Biodynamica*, 1945*a*.
—: Physical methods of sterilization of microorganisms, *Bact. Rev.*, **9**: 1, 1945*b*.
Rayner, A. G.: A simple method for the preservation of cultures and sera by drying, *J. Path. Bact.*, **55**: 373, 1943.
Rogers, L. A.: An apparatus for the desiccation of cultures, *J. Bact.*, **57**: 137, 1949.
Schneiter, R., y R. W. Kolb. Heat resistance studies with spores of *Bacillus anthracis* and related aerobic bacilli in hair and bristles, *Pub. Health Reports, Suppl.* 207, junio 1948.
Shanckell, L. F.: An improved method of desiccation with some applications to biological problems, *Am. J. Physiol.*, **24**: 325, 1909.

Sharp, D. G.: The lethal action of short ultraviolet rays on several common pathogenic bacteria, *J. Bact.*, **37**: 447, 1939.
Sherman. J. M., y W. R. Albus: Physiological youth in bacteria, *J. Bact.*, **8**: 127, 1923.
— y H. B. Naylor: Ageing without reproduction and the viability of young bacterial cells at low temperatures, *ibid.*, **43**: 749, 1942.
Simmons, R. T.: A note on the preservation of certain bacterial cultures under paraffin oil, *Med. J. Australia*, pág. 283, 7 marzo 1942.
Smithburn, K. C., y G. I. Lavin: The effects of ultraviolet radiation on tubercle bacili, *Am. Rev. Tuberc.*, **39**: 782, 1939.
Stein, C. D., y H. Rogers: Recovery of viable microorganisms and viruses from vapors removed from frozen suspensions of biologic material during lyophilization, *J. Vet. Research*, **11**: 339, 1950.
Stern, R. M.: Comparative studies of the growth of *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium sporogenes* in various anaerobic media, *J. Bact.*, **43**: 38, 1942.
Sugiyama, H.: Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*, *J. Bact.*, **62**: 81, 1951.
Swift, H. F.: A simple method for preserving bacterial cultures by freezing and drying, *J. Bact.*, **33**: 311, 1937.
Thompson, T. L., R. B. Mefferd, Jr., y O. Wyss: The protection of bacteria by pyruvate against radiation effect, *J. Bact.*, **62**: 39, 1951.
Toomey, J. A.: Inactivation of poliomyelitis virus by ultraviolet irradiation, *Am. J. Diseases Children*, **53**: 1490, 1937.
Watts, P. S.: The effect of humidity on the survival of dried cultures of *Streptococus agalactiae*, *J. Path. Bact.*, **57**: 191, 1945.
Weiser, R. S., y C. O. Hargiss: Studies on the death of bacteria at low tempetures. II. The comparative effects of crystallization, vitro-melting, and devitrification on the mortality of *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **52**: 71, 1946.
— y C. M. Osterud: Studies on the death of bacteria at low temperatures. I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*, *ibid.*, **50**: 413, 1945.
Williams, O. B.: Studies on spore formation and spore resistance, *Texas Rep. Biol. Med.*, **6**: 405, 1948.
— y J. M. Reed: The significance of the incubation temperature of recovery cultures in determining spore resistance to heat, *J. Infectious Diseases*, **71**: 225. 1942.
— y C. H. Zimmerman: Studies on heat resistance. III. The resistance of vegetative cells and spores of the same organism. *J. Bact.*, **61**: 63, 1951.
Winslow, C.-E. A., y I. S. Falk: Studies on salt action. VIII. The Influence of calcium and sodium salts at various hydrogen-ion concentrations upon the viability of *Bacterium coli*, *J. Bact.*, **8**: 215, 1923*a*; IX. The additive and antagonistic effects of sodium and calcium chlorides upon the viability of *Bacterium coli*, *ibid.*, **8**: 237, 1923*b*.
Wyss, O. J. B. Clark, F. Haas, y W. S. Stone: The role of peroxide in the biological effects of irradiated broth, *J. Bact.*, **56**: 51, 1948.
Yesair, J., C. W. Bohrer, y E. J. Cameron: Effect of certain environmental conditions on heat resistance of micrococci, *Food Research*, **11**: 327, 1946.
ZoBell, C. E.: Apparatus for collecting water samples from different depths for bacteriological analysis, *J. Marine Research*, **4**: 173, 1941.
—: Bacteria of the marine world, *Sci. Monthly*, **55**: 320, 1942.
— y C. B. Feltham: Are there specific marine bacteria?, *Proc. 5th Pacific Sci. Cong.*, **3**: 2097, 1933.
— y F. H. Johnson: The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria, *J. Bact.*, **57**: 179, 1949.
— y H. D. Michener: A paradox n the adaptation of marine bacteria to hypotonic solutions, *Science*, **87**: 328, 1938.

CAPÍTULO IX

ESTERILIZACIÓN

Puede definirse la esterilización como una destrucción completa de todos los gérmenes vivos contenidos en un producto, o una eliminación de los mismos, mediante calor, filtración u otros medios físicos o químicos.

Los tubos de ensayo, matraces, botellas, etc., taponados, así como las placas o platillos de Petri, deben esterilizarse antes de usarlos, a fin de destruir todos los microorganismos vivos adheridos a las superficies internas. Las pipetas se colocan en recipientes y se calientan, para destruir todos los gérmenes que las contaminen. De igual modo, los medios de cultivo se han de esterilizar primero con el mismo propósito, pues no podrían estudiarse especies bacterianas aisladas o cultivos puros en objetos de vidrio o medios nutritivos impurificados con otros microbios. Una vez esterilizados, el material de vidrio y los medios de cultivo pueden mantenerse así por término indefinido, preservándolos de toda contaminación del exterior.

Los procedimientos usuales para esterilizar materiales de laboratorio se valen del calor. En bacteriología, los microorganismos vivos se destruyen mediante esterilizadores térmicos de tres tipos: 1.º, esterilizador de aire caliente; 2.º, esterilizador de Arnold, y 3.º, autoclave.

Esterilizador de aire caliente. Es una estufa de aire seco (fig. 109), con tres paredes y dos cámaras de aire. Las paredes exteriores están revestidas de una gruesa capa de asbesto, para reducir la radiación del calor. Por los lados y detrás, entre las paredes exterior y media, corre un colector de mechero múltiple; las corrientes de convección describen un circuito completo a través del espacio intermural y del interior de la estufa, y los productos de la combustión salen por un orificio de la parte alta del aparato.

El esterilizador de aire caliente trabaja a una temperatura de 160° a 180°C, durante hora y media. Si la temperatura rebasa los 180°C, pueden chamuscarse los tapones de algodón; por eso hay que vigilar bien el termómetro al principio, hasta que se regule el aparato a la temperatura deseada. Tal vigilancia se hace innecesaria si se utiliza un regulador de temperatura.

Esta estufa se emplea para esterilizar cualquier material de vidrio para laboratorio, como tubos de ensayo, pipetas, placas de Petri y matraces. Sirve asimismo para esterilizar otros efectos e instrumentos de laboratorio que no se quemen a temperaturas tan altas; pero nunca se aplicará a la esterilización de medios de cultivo, pues los líquidos se evaporarían hasta sequedad.

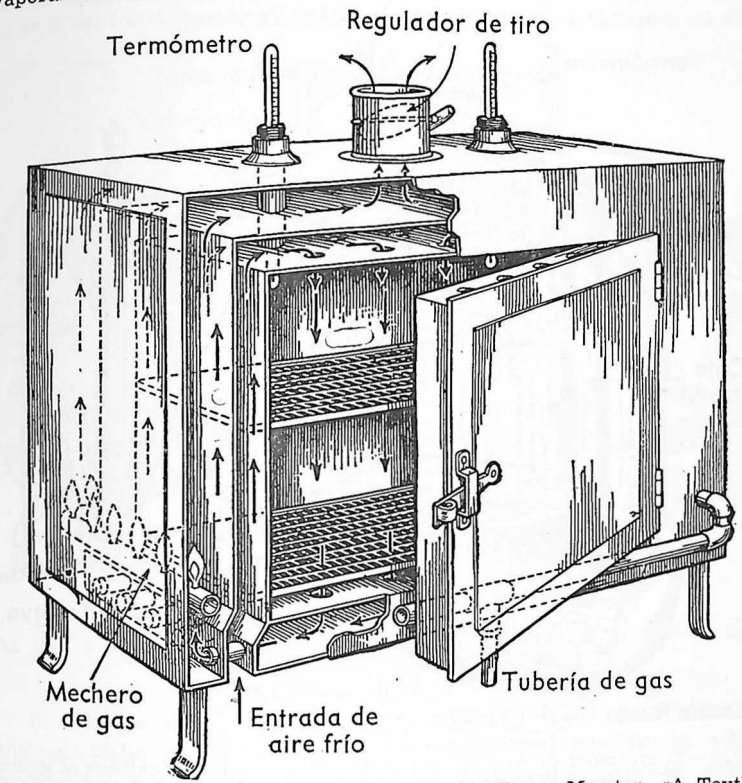


Fig. 109. — Esterilizador de aire caliente. (De Belding y Marston, «A Textbook of Medical Bacteriology», D. Appleton-Century Company.)

Esterilizador de Arnold. Es bien sabido que el calor húmedo resulta más eficaz que el calor seco para destruir gérmenes, y ello se achaca a las siguientes causas: 1.ª, el calor húmedo es más penetrante, y 2.ª, los microorganismos mueren, al parecer, por coagularse las proteínas de su protoplasma. Al aumentar en éste la proporción de agua, las proteínas se coagulan a una temperatura más baja.

El aparato de Arnold emplea como esterilizante vapor de agua en circulación (fig. 110). Se caracteriza por poseer una base de evaporación rápida, que recibe automáticamente agua de un depósito abierto, a través de pequeños orificios. Se aplica calor a la base, y como sólo

contiene una delgada capa de agua, ésta se evapora muy pronto; el vapor sube por un conducto central a la cámara de esterilización.

Para esterilizar se emplea corriente de vapor a unos 100°C, durante veinte minutos o más, por tres días consecutivos. El lapso de calefacción depende de la naturaleza de los materiales en tratamiento y del tamaño del recipiente. El agar, por ejemplo, ha de estar totalmente fundido antes de empezar a contar el período de calefacción.

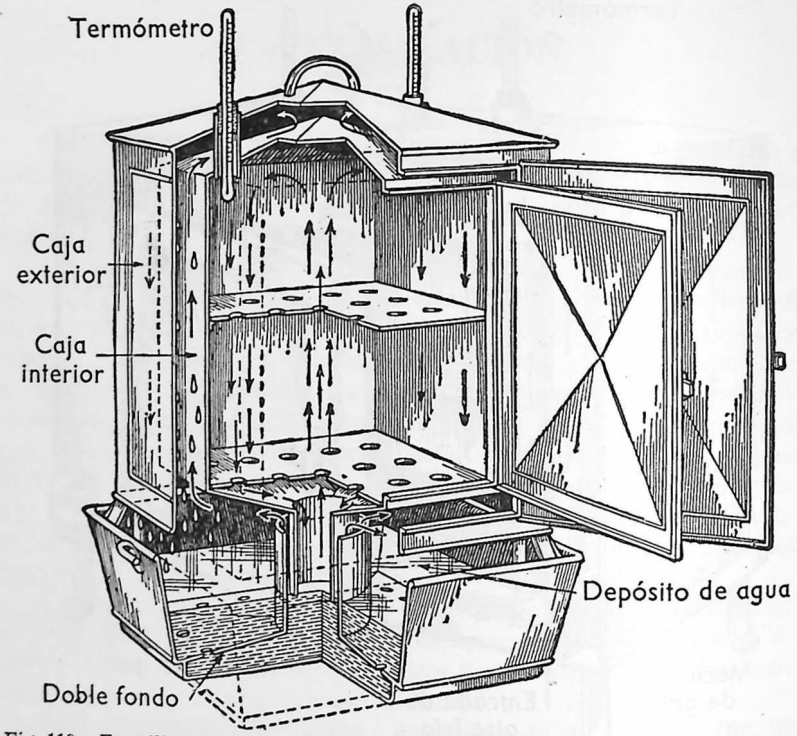


Fig. 110.—Esterilizador de Arnold. (De Belding y Marston, «A Textbook of Medical Bacteriology», D. Appleton-Century Company.)

Debe recordarse que una temperatura de 100°C durante veinte minutos no basta para destruir esporas. Ha de ser mucho más alta para esterilizar bien en un solo tiempo relativamente breve.

Este método se funda en el principio de que el primer período de calefacción destruye todos los microorganismos vegetativos presentes. Al cabo de 24 horas, en un medio favorable y templado, si hay esporas, éstas germinarán y se convertirán en células vegetativas, las cuales se destruyen mediante un segundo calentamiento. A veces, no todas las esporas pasan a la forma vegetativa antes de este segundo período de calefacción, y por eso se aplica otro de 24 horas para asegurarse de que no queda ninguna sin transformar.

Es fácil ver que, si no germinan las esporas, el método no servirá para esterilizar. Esto puede obedecer a las siguientes causas: 1.ª Que el medio no sea adecuado para tal germinación; por ejemplo, el agua no es ambiente favorable para el crecimiento de bacterias, y por eso no deja que las esporas se transformen en células vegetativas. 2.ª Que haya esporas de bacterias anaerobias, las cuales no germinan en un medio que esté en contacto con el oxígeno atmosférico.

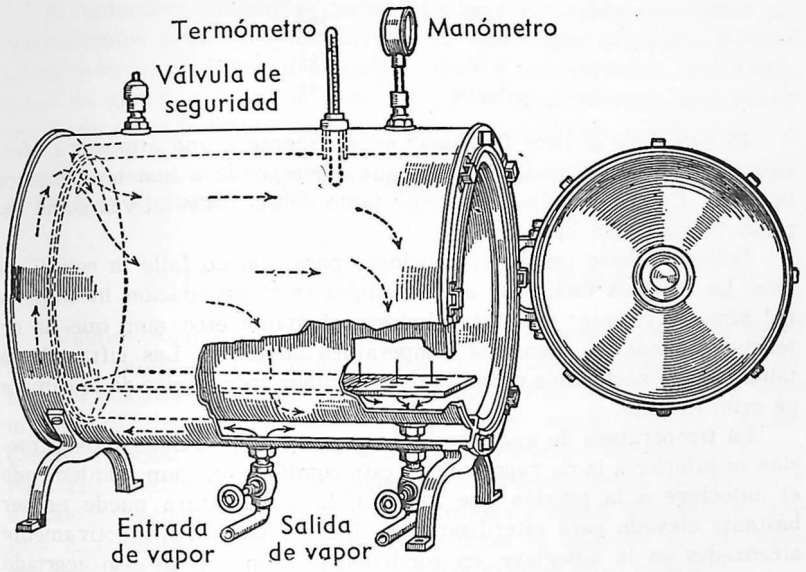


Fig. 111. — Autoclave. (De Belding y Marston, «A Textbook of Medical Bacteriology», D. Appleton-Century Company.

El aparato de Arnold se emplea principalmente para esterilizar gelatina, leche y medios carbohidratados. Con temperaturas altas o exposiciones prolongadas, en él se hidrolizan o descomponen carbohidratos y se impide la solidificación de gelatina, con lo que tales medios se hacen inservibles.

Autoclave. El autoclave es un recipiente cilíndrico de metal, con dobles paredes, salvo por delante (fig. 111), y construído para resistir hasta una presión de vapor no inferior a 4 atmósferas.

Se funda en que el agua hierve a unos 100°C, según la presión atmosférica, pues al subir ésta aumenta la temperatura. Por consiguiente, si la presión de vapor en el recipiente cerrado se eleva al doble de la atmosférica, la temperatura subirá hasta unos 120°C; en la tabla 14 se expone la relación entre presiones y temperaturas.

TABLA 14

Presión absoluta en atmósferas	Temperatura en °C
1	100
1,23	105
1,46	110
1,72	115
2,02	120
2,36	125
2,75	130
3,19	135
4	144

El autoclave se hace funcionar generalmente a una atmósfera efectiva por espacio de media hora, lo que corresponde a una temperatura de 119,6° C, suficiente para destruir tanto células vegetativas como esporas en una sola operación.

Deben tomarse ciertas precauciones para que no falle la esterilización. La máxima fuente de contratiempos es la evacuación incompleta del aire del recinto; no basta observar el manómetro, sino que ha de tenerse además en cuenta la temperatura adecuada. Las cifras de la tabla 14 son exactas sólo cuando se ha evacuado todo el aire de la cámara de esterilización.

La temperatura de una mezcla de vapor y agua a determinada presión es inferior a la de vapor solo, y esto significa que, aun manteniendo el autoclave a la presión que interesa, la temperatura puede no ser bastante elevada para esterilizar bien. Las temperaturas efectivamente alcanzadas en la autoclave, en condiciones ordinarias de uso acertado o desacertado, según Underwood (1934), se exponen en la tabla 15.

TABLA 15. TEMPERATURAS CON VARIOS GRADOS DE EVACUACIÓN DE AIRE

Presión manométrica		Evacuación				
Lib./pulg.²	Kg./cm²	Total, vapor puro	Dos tercios	Mitad	Un tercio	Nula
5	0,3515	109° C	100° C	94°	90°	72°
10	0,7030	115	109	105	100	90
15	1,0546	121	115	112	109	100
20	1,4061	126	121	118	115	109
25	1,7577	130	126	124	121	115
30	2,1092	135	130	128	126	121

Otra precaución importante es la de que el vapor se introduzca bien en los materiales sometidos a esterilización, pues de otro modo será dudosa la eficacia de ésta. Supongamos que interesa esterilizar algodón encerrado en un frasco. Si se tapa éste con un tapón de goma, el vapor no llegará al algodón, y el resultado será igual que con un esterilizador de aire caliente mantenido a unos 120° C durante media hora; ya hemos visto que esto es insuficiente para destruir esporas en una estufa de ese tipo. En cambio, tapando la boca del frasco con una o dos capas de muselina o gasa, que dejen paso al vapor, el algodón quedará esterilizado.

El autoclave se emplea para esterilizar los caldos corrientes sin carbohidratos y los medios nutritivos de agar, agua destilada, solución salina normal, cultivos desechados, medios contaminados, delantales, tubos de goma, guantes de goma, etc. Éste es el aparato esterilizador empleado en la industria de conservas alimenticias.

Otros pormenores se encontrarán en los informes de Hoyt, Chaney y Cavell (1938), y de Underwood (1937).

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN

Algunas soluciones no pueden esterilizarse por el calor sin experimentar profunda alteración en sus propiedades físicas y químicas. El calor coagula fácilmente el suero en los medios de cultivo, y si éstos lo contienen en suficiente cantidad, pasan del estado líquido a sólido. Ciertas soluciones salinas fisiológicas que contienen bicarbonato sódico inestable se estropean al calentarlas; el bicarbonato pierde con facilidad dióxido de carbono y se convierte en carbonato sódico, mucho más alcalino. Las enzimas y las toxinas bacterianas en solución se destruyen con facilidad por el calor. Podrían citarse muchos otros ejemplos.

Las preparaciones que contienen productos sensibles al calor se esterilizan mejor por filtración. Los filtros empleados con este objeto son, entre otros, los de porcelana, de Berkefeld, de Mandler, de yeso, de vidrio poroso, de asbesto, y membranas de colodión o ultrafiltros.

Filtros de porcelana o bujías de Chamberland. Consisten en unos cilindros huecos de porcelana sin barnizar, con un extremo cerrado; se componen de silicato de alúmina hidratado o caolín, con adición de arena de cuarzo, y la mezcla se calienta a temperatura bastante baja para evitar la vitrificación. Estos filtros se preparan con distintos grados de porosidad, desde L1 hasta L13; las bujías de poros más finos llevan esta última marca, y la primera corresponde a las de poros más grandes. La finura de los poros es inversamente proporcional a la velocidad de filtración. Las bujías L1 y L2 se destinan a filtraciones previas, encaminadas a separar partículas gruesas y bacterias grandes; la L3 sirve probablemente para toda clase de filtraciones bacterianas. En la figura 112 se expone un método apropiado para montar una bujía de Chamberland.

Filtros de Berkefeld. La tierra de infusorios o kieselguhr constituye un sedimento de fino polvo silíceo, generalmente blanco, integrado total o principalmente por restos de diatomeas; también se conoce por tierra silícea o harina fósil.

Los filtros de Berkefeld se fabrican en Alemania. Se preparan mezclando con cuidado tierra de diatomeas purificada con asbesto y materia orgánica, prensando la mezcla en cilindros y desecándolos. Los cilindros o bujías se calientan en horno a unos 2000° C, para ligar los materiales, y luego se moldean en máquinas, en las formas y dimensiones adecuadas.

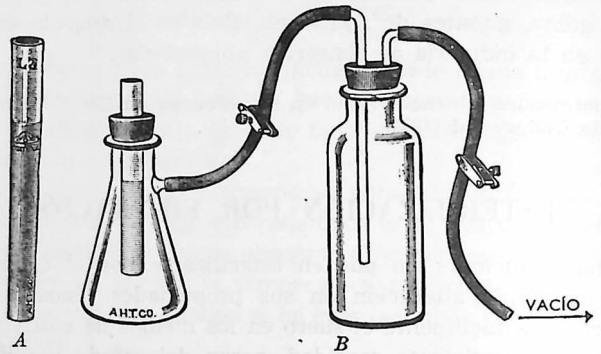


Fig. 112. — *A*, filtro de Chamberland-Pasteur; *B*, bujía montada en un matraz y dispuesta para filtrar. (Con licencia de A. H. Thomas Company.)

Se gradúan, según el tamaño relativo de sus poros, en W (fino), N (normal) y V (grueso). Esta graduación depende de la velocidad del agua filtrada a una determinada presión constante.

Filtros de Mandler. Son similares a los de Berkefeld, pero se fabrican en Norteamérica. Se componen de 60 a 80 % de tierra de infusorios, 10 a 30 % de asbesto y 10 a 15 % de yeso, proporciones que varían según el tamaño de poros deseado. Los ingredientes se mezclan con agua, se someten a fuerte presión y se cuecen en hornos a una temperatura de 980° a 1650°C, para trabar bien los materiales.

Los filtros terminados se prueban conectando un tubo a su boquilla, sumergiéndolos en agua y haciendo llegar aire comprimido a su interior. Un manómetro marca la presión al aparecer las primeras burbujas de aire en el agua, fuera del cilindro. Cada filtro lleva grabada la presión de aire obtenida al probarlo.

En la figura 113 se expone un montaje conveniente de aparato para filtrar líquidos con una bujía de Mandler o de Berkefeld, recomendado por Mudd (1927). El manómetro señala la reducción de presión; el líquido que se ha de filtrar se vierte en el manguito, y el filtrado se recoge en una vasija graduada, de donde es posible retirarlo en condiciones asépticas. Puede interrumpirse la filtración cuando convenga,

deteniendo la bomba de vacío y abriendo la llave del frasco intermedio de seguridad, para igualar la presión.

Filtros de yeso. Estos filtros se parecen por su forma a los de Berkefeld y Mandler, pero se componen principalmente de yeso o sulfato cálcico, con algo de carbonato cálcico (creta) y óxido de magnesio. Es probable que el yeso sirva de aglutinante de la creta y que esta última sea el elemento activo de absorción del filtro (Kramer, 1927).

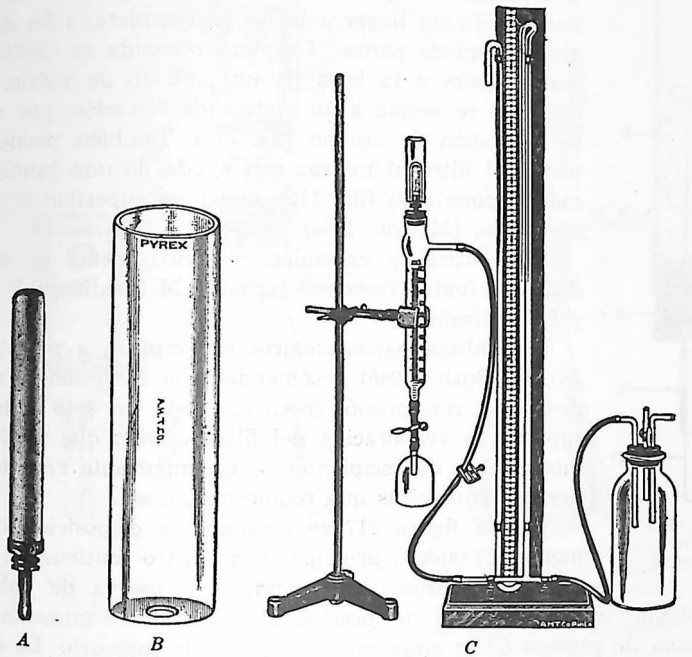


Fig. 113. — *A*, filtro de Berkefeld; *B*, manguito de vidrio para uso con filtros de Berkefeld o de Mandler; *C*, disposición adecuada del filtro para su empleo. (Con licencia de A. H. Thomas Company.)

Los filtros de yeso tienen sobre los de otros tipos ya estudiados la ventaja de que pueden prepararse fácilmente en el laboratorio con materiales baratos. Se montan en matraces y se trabaja con ellos del mismo modo que con bujías de Berkefeld o de Mandler.

La figura 114 muestra un sencillo método para su preparación. En un extremo de un trozo de tubo de vidrio grueso *B* se encaja un tapón de goma *A* con un solo agujero, a través del cual se pasa un tubo de vidrio *C*, que contiene una varilla de vidrio *D*, bien ajustada. Se prepara una pasta con 75 g de yeso (que contiene 2'5 % de carbonato cálcico), 25 g de óxido de magnesio y 75 g de agua. La pasta *E* se vierte

en el tubo de vidrio *B* y se deja fraguar; después se retira la varilla de vidrio *D* y queda en el centro del filtro un agujero para dar paso al filtrado.

Filtros de vidrio poroso. Los filtros de esta clase se preparan aglutinando vidrio finamente pulverizado en forma de discos en un molde apropiado (Morton y Czarnetzky, 1937). El vidrio en polvo se calienta a una temperatura que baste justamente para transformar las partículas de una masa coherente compacta, pero sin llegar a la fusión completa, a fin de que el disco quede poroso. La placa obtenida se suelda cuidadosamente a la boca de un embudo de vidrio, y el conjunto se acopla a un matraz de filtración, por medio de un tapón de caucho (fig. 115). También puede acoplarse el filtro al matraz con ayuda de una juntura de vidrio esmerilado (fig. 116), que hace superfluo el tapón de caucho (Morton, 1944).

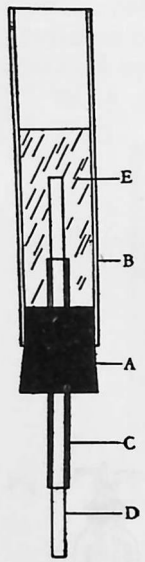


Fig. 114
Filtro
de yeso.

Los filtros se expenden en cinco grados de porosidad: EC (extragrueso), C (grueso), M (mediano), F (fino) y UF (ultrafino).

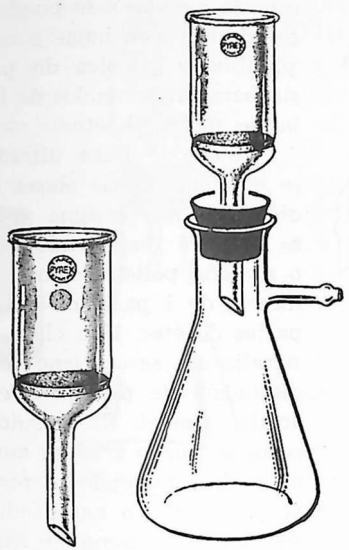
Los filtros bacteriológicos se emplean a presión reducida. Bush (1946) recomendaba la filtración a través de vidrio con presión positiva; esto no sólo reduce o suprime la evaporación del filtrado, sino que facilita el intercambio de recipientes, muy importante en filtraciones bacteriológicas que requieren asepsia.

En la figura 117 se expone una disposición conveniente. El cuerpo principal *B* del filtro contiene un disco de vidrio poroso; un escudo *A* preserva de polvo el recipiente, y una columna de presión *C* lleva una espita. En otra columna de presión *C'* se aloja un manómetro de mercurio. La espita de *C (C')* permite retener la presión después de desconectar el aparato de la provisión de aire comprimido. Una pera ordinaria basta para producir presiones hasta de 450 mm de mercurio, por lo menos. Lubricando bien las junturas de vidrio esmerilado y manteniendo bien unidas las partes con fuertes tiras o resortes de goma, el aparato conservará esta presión durante días enteros.

Filtros de asbesto o amianto. El mejor filtro conocido, que emplea asbesto como material filtrante, es el de Seitz (fig. 118). El asbesto, prensado en discos de poco espesor, se sujeta bien entre dos cercos lisos de metal, por medio de tres abrazaderas de rosca. El líquido que interesa filtrar se vierte en la vasija de metal en que se aloja el disco de asbesto, y la solución se hace salir por medio del vacío. Los discos filtrantes retienen eficazmente bacterias y otras partículas materiales. Al final de la operación se reemplaza el disco de asbesto por otro nuevo y se esteriliza

todo el aparato. Esto hace el filtro de Seitz muy conveniente, pues no requiere limpieza previa.

Una modificación del filtro de Seitz, que utiliza fuerza centrífuga en vez de succión o presión, es la propuesta por Boerner (fig. 119). El filtro consiste en un cilindro y una especie de embudo con vástago, que sujeta la placa filtrante sobre un disco de tela metálica. El cilindro se introduce a rosca en el embudo, con la placa filtrante comprimida entre ambos.



A *B*

Fig. 115. — *A*, filtro de vidrio poroso; *B*, filtro acoplado a un matraz, en disposición de filtrar.



Fig. 116 — Filtro de vidrio poroso, acoplado a un matraz mediante una juntura de vidrio esmerilado. (Con licencia de Corning Glass Works.)

El conjunto encaja exactamente en la embocadura de un tubo metálico de centrífuga de 15 ml, con el cuello granuloso del embudo apoyado sobre el borde del tubo de metal. El filtrado se recoge en un tubo de vidrio, dentro del recipiente. El filtro sirve también para filtrar en vacío del modo habitual, insertando el vástago a través de un tapón de caucho encajado en un matraz de filtración.

Webb, Irish y Lyday (1944) comprobaron que los líquidos de loción a través de filtros de Seitz se hacían más alcalinos. Las curvas de valoración de los filtrados indicaban la presencia de una base débil, probablemente magnesio, o una substancia atemperante de pH básico. El material alcalino soluble podría eliminarse probablemente elaborando mejor el asbesto antes de preparar los filtros.

La composición de los filtros de Seitz se estudia en Webb (1946).

Ultrafiltros. Por ultrafiltración se entiende generalmente la separación de partículas coloides de sus disolventes, y de cristaloides por medio de filtros gelatinosos denominados ultrafiltros (Bechhold, 1926). Los primeros filtros gelatinosos se componían de gelatina y ácido silícico, pero se han reemplazado por membranas y saquitos de colodión, o por colodión depositado sobre un soporte poroso. Éste puede ser papel de filtro en hojas o cartuchos, platillos y crisoles de porcelana sin barnizar, embudos de Buchner, bujías filtrantes, etc.

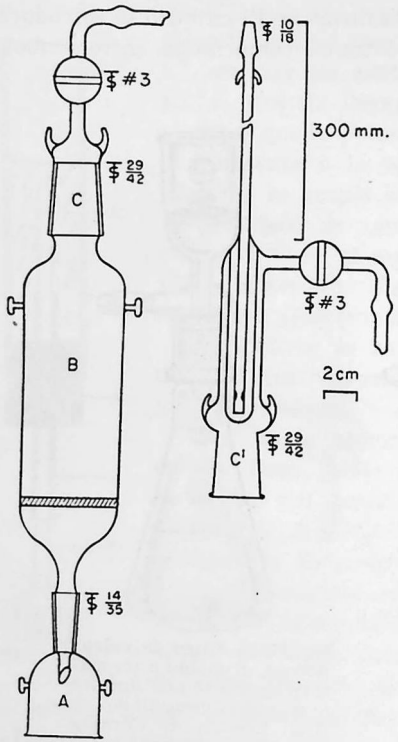


Fig. 117. — Disposición de un filtro bacteriano para filtración con presión positiva. (Según Bush.)

Colodión. Para ultrafiltración se emplean varias clases de colodión. La más antigua y conocida se prepara disolviendo piroxilina o algodón pólvora soluble en una mezcla de 1 parte de alcohol y 3 partes de éter. Una clase más generalizada se obtiene mediante disolución de piroxilina en ácido acético glacial. El tamaño de los poros se puede graduar aumentando o disminuyendo la proporción de piroxilina, o agregando diversos líquidos, como etilenglicol o glicerina, al colodión en alcohol-éter. Elford (1931) recomendaba un nuevo tipo de colodión para preparar una serie sucesiva de filtros, que denominaba membranas de «gradocol». Los filtros se obtienen incorporando una cantidad determinada de alcohol amílico o colodión en alcohol-éter, y añadiendo luego porciones graduadas de agua o de ácido acético, para aumentar o disminuir la permeabilidad de los filtros. Como las membranas así preparadas son muy fuertes, no es necesario depositar el colodión sobre un soporte de estructura porosa.

Los saquitos o cartuchos se pueden obtener vertiendo el colodión en un tubo de ensayo o vaso de precipitados, que se invierte y se hace girar continuamente, para que escurra el exceso y quede una capa delgada y uniforme. Se sumerge luego el tubo o el vaso en agua fría, para coagular el colodión. Después de arrastrar por lavado la mayor parte del disolvente, es posible desprender el cartucho del molde de

vidrio y retirarlo. Se preparan membranas de colodión en hojas cortando los saquitos en sentido transversal por su extremo y luego a lo largo.

Las membranas con papel de filtro como material poroso de soporte se hacen habitualmente de colodión acético; el tamaño de los poros de estas membranas depende de la consistencia del colodión, que, si es

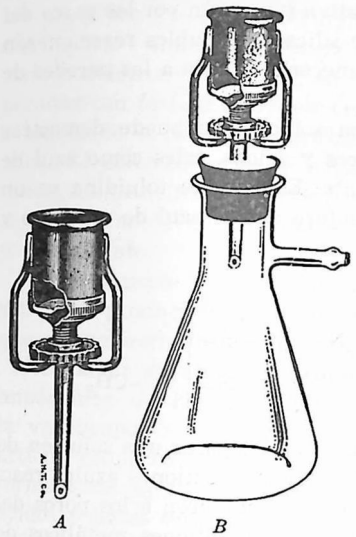


Fig. 118. — *A*, filtro de Seitz con el filtro de asbesto colocado; *B*, filtro montado en un matraz y en disposición de filtrar. (Con licencia de A. Thomas Company.)

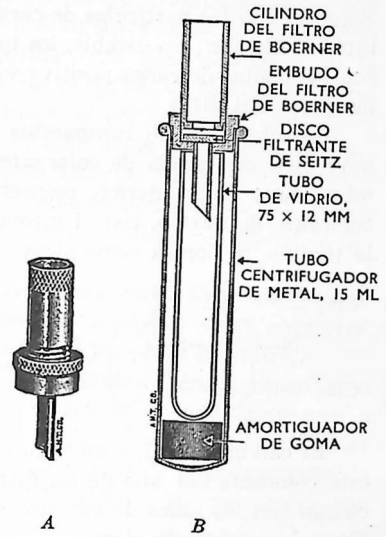


Fig. 119. — *A*, filtro centrífugo de Boerner; *B*, filtro de Boerner montado en un tubo metálico de centrífuga, con tubo colector de vidrio dentro. (Con licencia de A. H. Tromas Company.)

espeso, da poros más finos que otro menos denso. Es sencillo preparar una serie graduada de filtros; el substrato de papel da a las membranas una solidez tal, que en ciertas condiciones soportan una presión de 20 atm. o más.

Los filtros de colodión se usan mucho para aislar virus ultramicroscópicos y determinar sus diámetros.

Véase más información en Heckly y Watson (1951).

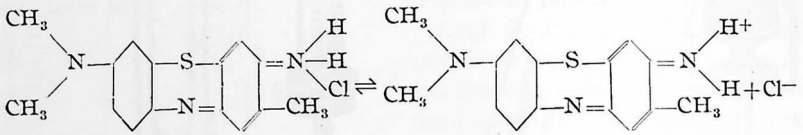
Carga eléctrica de los filtros. Al filtrar soluciones de enzimas, toxinas, cuerpos inmunizantes (amboceptores), virus, etc., suele perderse una parte del material activo. Si éste no se halla muy concentrado, se puede retirar por completo de la solución.

Los filtros de porcelana (Chamberland), tierra de infusorios (Berke-

feld, Mandler), vidrio sinterizado y asbesto (Seitz) se componen principalmente de silicatos metálicos y llevan cargas eléctricas negativas.

Los cationes metálicos (Mg^{++}, Al^{+++}, Ca^{++}, etc.) o iones positivos son más solubles que los aniones de silicato o iones negativos y más propensos a disolverse. Cuando se filtra un líquido, las partículas de carga positiva reaccionan con los iones de silicato negativos, y las de carga negativa, con los iones de metal positivo; como éstos son solubles, reaccionarán con las partículas de carga negativa y pasarán por los poros del filtro al filtrado; en cambio, los iones de silicato insolubles reaccionarán con partículas de carga positiva y permanecerán fijados a las paredes de los poros del filtro.

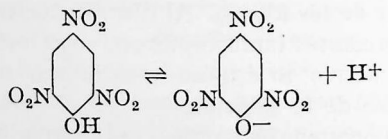
La adsorción de compuestos de una solución se puede demostrar muy bien con ayuda de colorantes básicos y ácidos, tales como azul de toluidina y ácido pícrico, respectivamente. El azul de toluidina es un colorante de tiazina, con el mismo cromóforo que el azul de metileno y la tionina. Se ioniza como sigue:



El catión es azul, e incoloro el anión cloro. Al pasar una solución de este colorante por uno de los filtros de silicato, los cationes azules reaccionan con los iones de silicatos negativos y se adhieren a los poros del filtro. Los iones de cloruro se combinan con los cationes metálicos de los silicatos, para formar cloruros solubles de metales y pasar al filtrado. Si la solución contiene más colorante del necesario para reaccionar con todos los iones de silicato retenidos en los poros del filtro, el exceso atravesará éste y comunicará color azul al filtrado, pero si la cantidad de azul de toluidina es insuficiente para neutralizar todos los iones de silicato, se retira todo el colorante de la solución, y el filtrado será incoloro. Sin embargo, la reacción es reversible, pues el paso de agua destilada a través del filtro saturado de colorante da color azul al filtrado.

Si se emplea una solución de colorante ácido en vez de azul de toluidina básico, el resultado será muy distinto. El material del filtro no adsorbe el colorante, que atravesará los poros y llegará al filtrado.

El ácido pícrico o trinitrofenol es un colorante ácido en el que actúan de cromóforo los grupos nitro. Se ioniza como sigue:



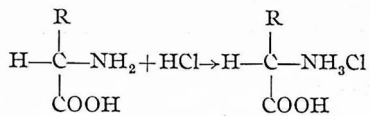
En este caso, el catión es incoloro, y amarillo el anión. Al filtrar una solución del colorante por uno de los filtros de silicato, éste no adsorberá nada del mismo, pues el intercambio de iones se traduce en la formación de picratos solubles, que pasan al filtrado.

Michaelis (1925) descubrió que los filtros de colodión no son ionogénicos, pero llevan también una carga negativa, que se suponía procedente de la adsorción de iones negativos. Elford (1933) comprobó que las proteínas, en soluciones ajustadas a diversos valores pH con ácido clorhídrico e hidróxido sódico, se adsorbían con más intensidad en la zona isoeléctrica (pág. 226); en cambio, las proteínas en soluciones atemperadas con fosfato $M/15$, en vez de ajustar el pH con ácido clorhídrico e hidróxido sódico, son adsorbidas en el lado ácido de la zona isoeléctrica. El colodión cargado negativamente adsorbe entonces con preferencia las proteínas de carga positiva. Este autor deducía que este efecto se halla probablemente relacionado con alguna influencia específica del ion de fosfato.

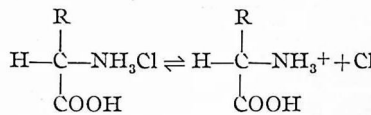
Por su parte, los filtros de yeso poseen una carga eléctrica positiva y pueden producir compuestos insolubles con aniones o iones negativos, que permanecen adsorbidos en las paredes de los poros del filtro.

Carácter anfótero de proteínas y aminoácidos. Una característica importante de las proteínas y los aminoácidos es que contienen a la vez grupos ácidos (COOH) y básicos (NH_2); en soluciones ácidas actúan como bases, y en las básicas como ácidos. Representando la fórmula de un aminoácido por $R \cdot CHNH_2 \cdot COOH$, las reacciones con ácidos y bases serán:

Con un ácido,

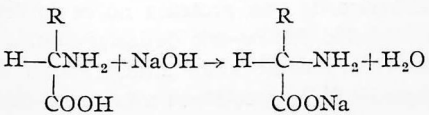


Esto da, al ionizarse,

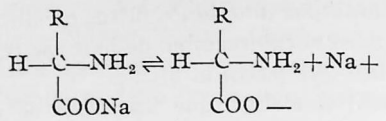


El ácido reacciona con el grupo básico amino. La molécula de aminoácido lleva una carga eléctrica negativa, y por ello se conduce como una base.

Con una base,

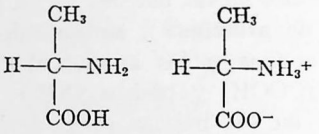


que, al ionizarse, da



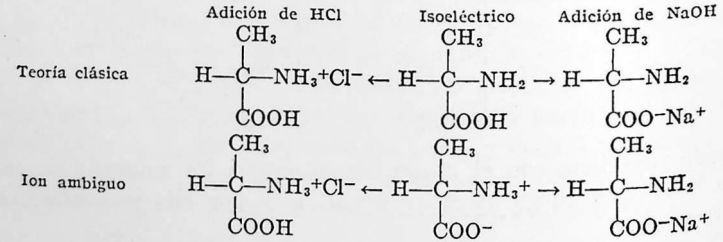
La base reacciona con el grupo carboxilo. La molécula de aminoácido posee una carga eléctrica negativa, y por ello se comporta como un ácido. Los compuestos de este tipo capaces de reaccionar con ácidos y bases reciben el nombre de anfóteros.

Punto isoeléctrico. De acuerdo con la teoría clásica, se supone que los cuerpos anfóteros se disocian en iones por encima y por debajo de un valor pH conocido por punto isoeléctrico, que se ha definido como aquel en que la ionización del compuesto anfótero es mínima, expresada en pH. A este concepto se opone la hipótesis, más reciente, del ion ambiguo («zwitterion»), según la cual el punto isoeléctrico es aquel en que la ionización llega al máximo. La diferencia entre las dos teorías se expresa en las siguientes fórmulas de la alanina isoeléctrica:



I. Teoría clásica II. Ion ambiguo

La fórmula I representa una molécula sin disociar como ácido o base; su neutralidad se supone resultante de la ausencia de disociación. La fórmula II es asimismo neutra, pero su neutralidad se atribuye a ionización completa de los grupos ácido y básico. Prescindiendo de cuál de las dos teorías sea justa, los resultados de la adición de un ácido o una base son los mismos en ambos casos.



El punto isoeléctrico de una proteína no es forzosamente el punto neutro (pH 7). En realidad, la mayoría de las proteínas estudiadas tienen puntos isoeléctricos en el lado ácido de la neutralidad. He aquí los puntos isoeléctricos de algunas de las proteínas más corrientes:

	Punto isoeléctrico (pH)
Caseína (proteína de la leche)	4,7
Albúmina de huevo	4,6
Gelatina	4,7
Hemoglobina	6,8
Seroalbúmina	4,7
Seroglobulina	5,6

Conocer los puntos isoeléctricos es importante al filtrar soluciones que contengan proteínas, aminoácidos, toxinas bacterianas, enzimas, virus, antitoxinas, etc. Si una solución es ácida respecto a su punto isoeléctrico, su componente activo funcionará como base y tiene una carga eléctrica positiva. La filtración de tal solución por un filtro de silicato, que tiene una carga negativa, tendrá por efecto la adsorción total o parcial del componente activo en las paredes de los poros del filtro; para evitarlo, sería necesario emplear un filtro que, como el de yeso, posea una carga positiva, o cambiar la reacción de la solución que ha de filtrarse.

El ajuste de la solución hacia el lado ácido o básico del punto isoeléctrico sólo es posible siempre que al cambiar el pH de la misma no se destruya el producto activo. Después de filtrar, el pH del filtrado deberá reajustarse dentro de la zona óptima de pH del referido producto; pero si éste es muy sensible a pequeños cambios de pH, deberá escogerse un filtro que tenga una carga eléctrica apropiada.

Limpieza de filtros. Todos los filtros se deben limpiar después de usarlos, o se desecharán para emplear otro nuevo. Las membranas de colodión y los filtros de yeso se preparan con facilidad, y los discos de asbesto de Seitz pueden adquirirse; estos filtros sirven para una sola vez. En cambio, los de porcelana, tierra de infusorios o vidrio sinterizado son demasiado caros para reemplazarlos tan a menudo, pero se limpian con facilidad.

Para limpiar filtros de porcelana se ponen en una mufla y se eleva la temperatura hasta el rojo; así se quema la materia orgánica retenida en los poros y se restituye el filtro a su estado primitivo.

Los filtros de Berkefeld y de Mandler se limpian poniendo las bujías en un soporte metálico especial, conectado a un grifo de agua, la cual atraviesa el filtro en sentido inverso, de dentro a fuera, hasta eliminar de los poros toda substancia extraña. Los albuminoides o cuerpos equivalentes retenidos en los poros de los filtros se coagulan fácilmente por el calor durante la esterilización y atascan la bujía, que en estas condiciones resulta inútil.

Los filtros obstruídos se pueden limpiar de diversos modos, pero probablemente mejor por succión continua, o mediante una solución muy concentrada de Clorox o análoga, durante cinco a quince minutos

(Vaisberg, 1938). Este tratamiento disuelve rápidamente la materia coagulada y permite utilizar de nuevo el filtro. Hace falta lavar bien para eliminar todo indicio de la solución oxidante.

Los filtros de vidrio blando pueden limpiarse con ácido sulfúrico concentrado que contenga nitrato sódico; el ácido enérgico no tarda en oxidar y disolver la substancia orgánica. Los últimos indicios de ácido desaparecen lavando a conciencia.

Esterilización de filtros. Excepto las membranas de colodión, los diversos filtros se montan en sus respectivos soportes, se envuelven en papel y se esterilizan en autoclave. No puede aplicarse calor seco, pues destruiría los tapones de goma de los matraces.

Dado que las soluciones ácidas de colodión son estériles, no es necesario esterilizar las membranas en que se usa papel como substrato poroso, si al prepararlas se observan las debidas precauciones asépticas.

REFERENCIAS

Bechhold, H.: Ultrafiltration and electro-ultrafiltration. De «Colloid Chemistry», ed. por J. Alexander, vol. I, Nueva York, Reinhold Publishing Corporation, 1926.

Bush, M. T.: Glass bacteriological filters arranged for positive pressure, *J. Bact.*, **51**: 531, 1946.

Elford, W. J.: A new series of graded collodion membranes suitable for general bacteriological use, especially in filterable virus studies, *J. Path. Bact.*, **34**: 505, 1931.

—: The principles o ultra-filtration as applied to biological studies, *Proc. Roy. Soc. (London)*, series B, **112**: 384, 1933.

Heckly, R. J., y D. W. Watson: An improved ultrafiltration apparatus, *Am. Rev. Tuberc.*, **63**: 718, 1951.

Hoyt, A., A. L. Chaney, y K. Cavell: Studies on steam sterilization and the efects of air in the autoclave, *J. Bact.*, **36**: 639, 1938.

Kramer, S. P.: Bacterial filters, *J. Infectious Diseases*, **40**: 343, 1927.

Michaelis, L.: Contribution to the theory of permeability of membranes for electrolytes. *J. Gen. Physiol.*, **8**: 33, 1925.

Morton, H. E.: The use of «Pyrex» brand fritted filters in bacteriological work, *J. Bact.*, **46**: 312, 1943.

—: An new style assembly for fritted filters, *ibíd.*, **47**: 379, 1944.

— y E. J. Czārnetzky: The application of sintered (fritted) glas filters to bacteriological work, *ibíd.*, **34**: 461, 1937.

Mudd, S.: An improved arrangement for bacteria-retaining filters, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **25**: 60, 1927.

—: Filters and filtration. De «Filterable Viruses», ed. por T. M. Rivers, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1928.

Underwood, W. B.: «Texbook of Sterilization», Erie, Pa., American Sterilizer Company, 1934.

—: «Some Features Relating to Pressure Steam Sterilization of Media and Solutions of Particular Interest to the Laboratory Technician», Erie, Pa, American Sterilizer Company, 1937.

Vaisberg, M.: Method for clearing coagulated serum blocked Berkefeld filters, *J. Lab. Clin. Med.*, **23**: 542, 1938.

Webb, H. B.: Composition of Seitz filter pads, *Am. J. Clin. Path.*, **16**: 442, 1946.

—, O. J. Iris, y V. I. Lyday: Effect of Seitz filtration upon pH, *J. Bact.*, **48**: 429, 1944.

CAPÍTULO X

DESINFECCIÓN Y DESINFECTANTES

Se entiende generalmente por desinfección la destrucción de bacterias mediante productos químicos. En la descripción del proceso se emplean diversos términos: germicida, bactericida, antiséptico, desinfectante, viricida, agente bacteriostático y esterilización, y de ello deriva una gran confusión en cuanto a su significado exacto, pues la interpretación vulgar no siempre coincide con las definiciones científicas. Se consideran correctas las siguientes:

Germicida. Al principio se aplicó el término a cualquier agente destructor de gérmenes patógenos. Hoy se llaman así los que destruyen bacterias, pero no esporas, sean éstas patógenas o no.

Bactericida. Se dice de cualquier agente que destruya bacterias, pero no esporas. En la práctica, bactericida es sinónimo de germicida, si bien debe limitarse, en rigor, al exterminio de bacterias.

Antiséptico. La significación de esta palabra ha originado acaso más confusión que la de cualquiera de las otras. Algunos la identifican con germicida y bactericida; otros aplican el término a los agentes que paralizan la acción bacteriana, ya destruyendo los microorganismos, ya impidiendo su desarrollo y reproducción. Esta palabra debería limitarse a los agentes que evitan o detienen el crecimiento bacteriano, inhibiendo la actividad de los gérmenes o destruyéndolos.

De acuerdo con esta definición, un germicida puede ser también antiséptico, según el factor de la solución, la persistencia de su acción y la naturaleza del microorganismo. Un germicida muy diluído puede inhibir solamente el desarrollo y la multiplicación de bacterias, más bien que destruirlas; y un agente que las mate en un lapso determinado, tal vez no pase de impedir su crecimiento si el tiempo de exposición se abrevia; en el primer caso se clasificará como germicida, y como antiséptico en el segundo. Algunos gérmenes son menos resistentes que otros a los agentes tóxicos, lo cual significa que una substancia puede ser germicida frente a un microorganismo, y antiséptica respecto a otro

distinto. Es indudable que intervienen aquí más factores, aparte los expuestos.

Desinfectante. Esta palabra se ha empleado con bastante imprecisión y definido de varios modos. Hoy se admite generalmente que significa destructor de bacterias patógenas y otros microorganismos activos, pero no de esporas.

Viricida. Se aplica este término a cualquier agente que destruya o inactive virus filtrables. Como la resistencia de los virus a agentes químicos viene a ser análoga a la de las bacterias, la mayoría de los germicidas son también buenos viricidas.

Agente bacteriostático. Esta palabra fué introducida por Churchman (1912, 1928), con ocasión de sus estudios sobre colorantes, para denotar una actividad que, sin destruir forzosamente las bacterias, impide su reproducción. Churchman observó que los colorantes, a ciertas concentraciones, no matan los gérmenes, sino que mantienen en suspenso sus funciones vitales, de suerte que al aumentar la dilución de la mezcla de bacterias y colorantes se reanuda el desarrollo de aquéllas. Se dió a los colorantes el nombre de agentes bacteriostáticos, y el de bacteriostasis al fenómeno. Otros agentes germicidas no colorantes, como los compuestos de mercurio y de plata, muestran igual propiedad y se denominan compuestos bacteriostáticos.

Esterilización. Éste es un término mejor definido, pues significa destrucción completa de todos los microorganismos presentes, incluídas las esporas, y debe emplearse siempre que interese concretar esta acepción.

DINÁMICA DE LA DESINFECCIÓN

Krönig y Paul (1897) parecen haber sido los primeros que señalaron que el proceso de la desinfección no es repentino, sino gradual, y que el número de los organismos destruídos en la unidad de tiempo es mayor al principio y disminuye paulatinamente al avanzar el período de exposición. Si se registra el número de supervivientes por unidad de volumen, con relación al tiempo, los puntos determinan curvas poco pronunciadas. Más tarde, Madsen y Nyman (1907), y Chick (1908, 1910) demostraron que, substituyendo en el sistema de coordenadas los números de bacterias supervivientes por sus logaritmos, se obtiene una línea recta.

Esto indica la figura 120. Se trataron esporas de ántrax con fenol al 5 % y se incubaron a 33 $^1/_3$° C. La línea curva representa las cifras de esporas de ántrax supervivientes por unidad de volumen, y la recta, los logaritmos de sus concentraciones.

El proceso de la desinfección, según los resultados de Chick, parece seguir la ley de acción de masas y desarrollarse conforme a una reacción

monomolecular, o reacción de primer orden, siempre que el desinfectante se halle en gran exceso:

$$-\frac{dN}{dt} = KN \qquad \text{o} \qquad \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{N_1}{N_2} = K$$

don N_1 y N_2 designan el número de bacterias supervivientes por unidad de volumen al cabo de los tiempos t_1 y t_2, respectivamente.

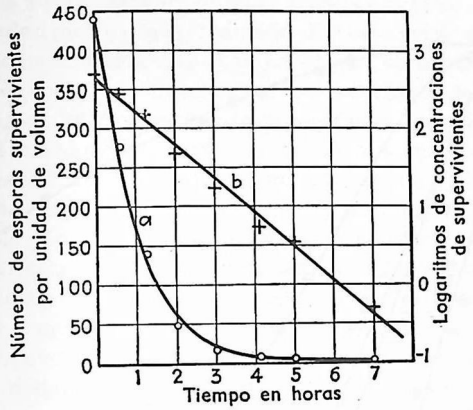


Fig. 120. — Desinfección de esporas de ántrax con fenol al 5 %: *a*, número de supervivientes por unidad de volumen, con relación al tiempo; *b*, logaritmos de concentraciones de supervivientes con relación al tiempo.

Importancia de las curvas logarítmicas de supervivencia. Al destruir bacterias por medio de diversos agentes, cuanto mayor sea el número de células presentes, más tiempo requerirá su esterilización completa. Esto se puede apreciar por el siguiente ejemplo. Supóngase una suspensión que contiene 200.000 microorganismos por milímetro. Si las bacterias se destruyen a razón de 90 % por minuto, el número de supervivientes al cabo de siete minutos será:

200.000 20.000 2.000 200 20 2 0,2 0,02

La última cifra denota que quedan 2 bacterias vivas en 100 ml de suspensión. Si en vez de 200.000 la suspensión contiene sólo 200 microorganismos por milímetro, el tiempo necesario para reducir su número a 2 bacterias por 100 ml será de cuatro minutos nada más:

200 20 2 0,2 0,02

La relación entre los números bacterianos y los tiempos que exige la esterilización completa es de gran utilidad en las industrias conservera y lechera, en bacteriología y en cirugía.

En una serie de investigaciones, Jordan y otros (1944*a-b*, 1945*a-b*, 1946*a-b-c*, 1947*a-b-c*, 1948*a-b-c*), hallaron que el índice de mortalidad de la *Escherichia coli* no era constante, es decir, no seguía el orden logarítmico. Cultivaron los microorganismos en un matraz especial, al que adaptaron un mecanismo automático de jeringa para la adición continua de medio, con un agujero para extraer muestras periódicamente. El cultivo bacteriano se normalizó en cuanto a edad, composición del medio

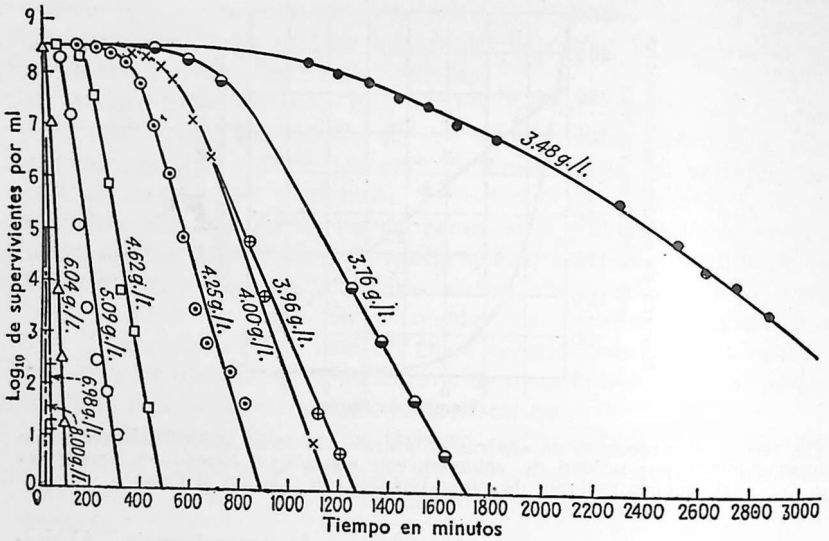


Fig. 121. — Curvas de supervivencia-tiempo resultantes de exponer *Escherichia coli* a diversas contraciones de fenol a 35° C. (Según Jordan y Jacobs.)

y temperatura de desarrollo. A las pocas horas de la inoculación, el total de gérmenes viables llegó a ser de unos 330.000.000 por mililitro, y se mantuvo constante este nivel por la adición continua de caldo a un ritmo prefijado. Después de un período de incubación de 40 horas se añadió al cultivo una concentración conocida de fenol y se retiraron muestras a intervalos definidos, para recuentos en placa. En la figura 121 se expone una serie típica de curvas de supervivencia-tiempo, de la cual resulta que el índice de mortalidad no era constante. Se identificaron bien dos fases: 1.ª, un índice de mortalidad creciente, con transición gradual a una 2.ª fase de índice aproximadamente constante, máximo además para una concentración dada de fenol. Había indicios de que el índice de mortalidad declinaba hacia el final del proceso de desinfección. A la adición de fenol seguía inmediatamente un período de «mortalidad nula», o dilatorio, que fué haciéndose cada vez menor, a medida que se aumentaba gradualmente la concentración de fenol.

AGENTES FÍSICOS

Se incluyen aquí los agentes físicos no estudiados en los capítulos VIII y IX.

Electricidad. Para destruir microorganismos se han empleado corrientes de baja y de alta frecuencia. Prochownick y Spaeth (1890) condujeron una corriente de baja frecuencia a través de suspensiones salinas de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Bacillus subtilis* y *B. anthracis*, con un efecto destructivo muy reducido. En otra serie de experimentos se cubrieron los electrodos con agar en el que se habían sembrado los gérmenes en examen, se sumergieron en soluciones salinas y se hizo pasar la corriente; los microorganismos quedaron destruídos en el ánodo, pero no en el cátodo. Una corriente de 60 mA mataba los gérmenes de *M. pyogenes* var. *aureus* en quince minutos, y una de 230 mA producía el mismo efecto en los de *B anthracis* en 30 minutos. Como los iones de cloro de la solución salina emigraban hacia el ánodo, los mencionados autores dedujeron que la muerte de los microorganismos era consecuencia de la toxicidad del cloro, y no de la corriente eléctrica.

Apostoli y Laquerrière (1890) sometieron a la acción de la corriente eléctrica un cultivo de *B. anthracis*, con los electrodos sumergidos en el mismo a poca distancia. Una corriente de 300 mA destruyó los microorganismos en cinco minutos, mientras que otra de 250 mA no pudo matar todos los gérmenes en el mismo tiempo. A su juicio, la acción destructiva de la corriente dependía más de la intensidad que del período de acción; el efecto letal se producía sólo en el ánodo o polo positivo, y la acción de la corriente provenía de la liberación de ácidos y de oxígeno activo en el propio ánodo.

Beattie y Lewis (1920) emplearon una corriente aproximada de 4000 voltios y 2 amperios durante 4 minutos, y comunicaron la destrucción de más de 99,9 % de los microorganismos contenidos en la leche.

Fabián y Grahm (1933) observaron la destrucción gradual de *Escherichia coli* por exposición a una corriente de alta frecuencia de 10 megaciclos por segundo y 0,8 amp. de intensidad. Sin embargo, esta corriente no pudo destruir en diez horas todos los microorganismos de una suspensión. Una frecuencia de 10 megaciclos corresponde a una longitud de onda de 30 metros, poco más o menos. Gale y Miller (1935) informaron que no les había sido posible destruir *M. pyogenes* var. *aureus*, *Salmonella typhosa*, *Diplococcus pneumoniae* y estreptococos exponiendo sus cultivos a ondas extracortas de 10 metros y 200 vatios, por espacio de una hora, durante tres días consecutivos.

Se han empleado corrientes eléctricas para pasteurizar leche y para destruir gérmenes en aguas de alcantarilla y otras, etc., pero los resultados han sido demasiado inciertos para atribuirles importancia práctica. Por eso han cedido el paso a otros agentes germicidas.

Ondas sónicas y supersónicas. Las ondas sónicas son las de frecuencia audible, de unos 8900 ciclos o períodos por segundo, producidas por un tubo de níquel que vibra en un campo magnético y en resonancia con un circuito oscilante de 2000 voltios. Estas ondas destruyen las bacterias cuando actúan sobre ellas el tiempo necesario. La leche se ha tratado así, con una reducción de 99 % del número de microorganismos vivos tras una exposición de cuarenta a sesenta minutos. Williams y Gaines (1930) emplearon ondas acústicas de alta frecuencia, de unos 8800 ciclos por segundo, y dieron cuenta de la destrucción de células de *Escherichia coli;* según estos autores, los efectos letales de las ondas provienen de una violenta agitación producida dentro de la célula.

Shropshire (1947*a-b*) sometió diversas bacterias a una energía sónica intensa y observó reducción de la turbiedad del líquido, indicio de rotura de las células. Propuso el método para la evaluación turbidimétrica de la disrupción bacteriana.

Al tratar de igual modo agregados o copos de bacterias, la primera alteración óptica perceptible fué un enturbiamiento mayor, proporcionado al ritmo de disgregación de los copos.

Las ondas supersónicas son de frecuencia superior a las acústicas, de 200.000 a 1.500.000 ciclos o períodos por segundo, producidas al conectar un cristal piezoeléctrico con un oscilador de alta frecuencia. Han resultado también capaces de destruir bacterias y otros microorganismos.

Wood y Loomis (1927) emplearon ondas sonoras de alta frecuencia y gran intensidad, engendradas por un oscilador piezoeléctrico de cuarzo a 50:000 voltios y 300.000 vibraciones por segundo. Observaron que se fragmentaban o rompían en pedazos gémenes tales como *Spirogyra, Paramecium,* etc., así como los eritrocitos en suspensión salina. En cambio, las bacterias resistían al tratamiento con ondas sonoras de alta frecuencia y gran intensidad. Harvey y Loomis (1929) observaron que la energía supersónica destruía en hora y media bacterias luminiscentes.

Beckwith y Weaver (1936) trataron una levadura y varias especies de bacterias con ondas supersónicas, e informaron que los microorganismos quedaban destruídos; a su juicio, perecían generalmente aplicando radiación supersónica por un tiempo suficiente. La presencia de proteínas estorbaba la acción de la energía sónica.

Hamre (1949) descubrió que la *Klebsiella pneumoniae* y el *Saccharomyces cerevisiae* eran destruídos por la energía supersónica, que, en cambio, no inactivaba las partículas del virus de la gripe epidémica. Anderson, Boggs y Winters (1948) comprobaron que ciertos bacteriófagos grandes eran sensibles al tratamiento ultrasónico, mientras que los virus compactos pequeños mostraban una resistencia relativa al empuje cortante desarrollado durante la cavitación del líquido en que estaban suspendidos.

Véase más información en Whitney y Russell (1951).

Rayos alfa, beta y gamma. Las enzimas sulfhidrílicas, como la deshidrogenasa y la ureasa glicerofosfóricas, se inactivan, según han demostrado Baron y Dickman (1949), al irradiar soluciones diluídas con dosis pequeñas de rayos alfa de polonio, rayos beta de estroncio y rayos gamma de radio. Los fermentos se reactivaban parcialmente añadiendo glutatión, tras inhibición mediante rayos alfa; esto parece indicar que las radiaciones ionizantes paralizan tales enzimas por oxidación de los grupos sulfhidrilo (—SH), que son esenciales para la actividad fermentativa.

Se encontrará más información en Tarpley y otros (1953).

Electrones. Trump y Proctor (1951) han empleado electrones como factor esterilizante.

Los electrones son partículas elementales minúsculas, con carga eléctrica negativa, que se mueven en torno a protones o núcleos atómicos de carga positiva. Se desprenden fácilmente calentando un filamento de volframio o tungsteno a varios millares de grados centígrados. Cuando sobre tales electrones actúa un campo eléctrico potente entre dos electrodos de metal, se apartan aquéllos aceleradamente del electrodo negativo o cátodo, y adquieren la energía en voltios suministrada por el campo. Los electrones se pueden acelerar a energías de 2, 3, 4 y más millones de voltios.

La penetración de los electrones de intensa energía depende de su tensión y de la densidad del material irradiado. Los electrones acelerados a energías de 2 millones de voltios profundizan en el agua unos 2/3 de centímetro, y esta capacidad penetrante aumenta en proporción directa a la tensión.

Los materiales envasados que contienen productos farmacéuticos, biológicos, etc., se pueden irradiar eficazmente siempre que estén dentro del margen de penetración de los electrones. Al parecer, los rayos no reducen la potencia ni aumentan la toxicidad de los materiales envasados.

El efecto útil de los electrones de gran energía depende de la excitación y ionización de los átomos del germen, traducidas en cambios químicos que acarrean su muerte.

Rayos X o Roentgen. Haberman (1942) trató *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* con rayos Roentgen blandos (>1 Å) y duros (<1 Å). Inscribiendo sobre papel semilogarítmico los logaritmos de los números proporcionales de células supervivientes, con relación al tiempo, se obtenía una línea recta, lo cual significa que los efectos letales de los rayos X dependían del número de bacterias presentes en cualquier momento dado, y en mayor grado de la longitud de onda que de la intensidad. Las ondas cortas eran más destructivas para el *M. pyogenes* var. *aureus* que las ondas largas de igual intensidad.

Los rayos Roentgen destruyen la toxina tetánica y la hemolisina de micrococos (Ephrati, 1948). Al purificar la toxina del tétanos, aumentaba notablemente su sensibilidad a estos rayos. Ciertas proteínas, sus productos de desdoblamiento, aminoácidos reductores, glutationes y los ácidos tioglicólico y ascórbico han resultado eficaces como agentes de protección, mientras que las substancias oxidantes no sirven para el caso. Todas las observaciones confirman la teoría de que el mecanismo de acción de los rayos X sobre la toxina tetánica y la hemolisina de micrococos es indirecto, y que la radiación forma radicales oxidantes activos, los cuales, a su vez, destruyen las toxinas por oxidación.

Barron, Dickman, Muntz y Singer (1949) dieron cuenta de la inactivación de trifosfatasa de adenosina y deshidrogenasas glicerofosfórica y succínica mediante irradiación con pequeñas dosis de rayos Roentgen. Esto se interpretó como efecto de la oxidación de los grupos —SH de las proteínas.

Se ha observado que cuando se reduce la concentración de oxígeno en suspensiones bacterianas disminuye notablemente la sensibilidad de la *Escherichia coli* a los rayos X. Stapleton, Billen y Hollaender (1952) y Burnett, Morse, Burk y Hollaender (1952) señalaron que la adición de piruvato, formiato, succinato, serina, alanina, etanol o hidrosulfito protegía las células contra la acción letal de los rayos X, en virtud de su propiedad de eliminar oxígeno del sistema.

Para más información, véanse Gaden, Henley y Collins (1951), Patt, Smith, Tyree y Straube (1950), Sherman y Chase (1949 *a*-*b*), Smith, Patt, Tyree y Straube (1950).

AGENTES QUÍMICOS

Agua destilada. Parecen discrepar las opiniones acerca de la acción del agua destilada sobre la viabilidad de bacterias y esporas. Koch (1881) informó que las esporas de ántrax podían permanecer vivas más de tres meses en agua destilada y que las células vegetativas eran mucho más sensibles. Algunos autores afirman que la muerte sobreviene en pocas horas, y otros dicen que se necesitan semanas enteras para destruir todos los microorganismos. Esta discrepancia puede obedecer, por lo menos en parte, al recipiente de destilación del agua; ya hemos visto que cantidades insignificantes de algunos iones metálicos ejercen efectos tóxicos sobre las bacterias. Según Wilson (1922), el agua destilada en un alambique de cobre esteriliza en pocas horas una suspensión de *Salmonella aertrycke*.

También se ha expuesto que otra causa de diferencias en los resultados reside en el número de gérmenes inoculados. Ficker (1898) demostró que sembrando 60.000.000 de vibriones de cólera por c. c. en agua destilada, continuaban viables al cabo de varios meses, pero al reducir

la cifra a 10.000 por c. c., todas las bacterias estaban muertas a las dos horas; a su juicio, por inoculación del agua destilada con grandes números de microorganismos, pasan a ella suficientes elementos nutritivos, que la convierten en un medio diluído, carente ya de las propiedades del agua destilada. Otro origen de resultados distintos es tal vez la variación del pH del agua destilada. Winslow y Falk (1923*a*-*b*) ajustaron agua destilada a diferentes concentraciones de iones de hidrógeno y descubrieron que un pH de 6,0 daba la proporción más elevada de gérmenes viables al cabo de nueve horas. Cohen (1922) demostró que estabilizando agua destilada por adición de atemperantes, era mucho mayor la constancia de los resultados. Spangler y Winslow (1943) informaron que morían muy rápidamente células lavadas de *Bacillus cereus* al incorporarlas a agua destilada; no obstante, la adición de NaCl a concentraciones de 0,00001 a 0,3 M preservaba durante algún tiempo los microorganismos de los perniciosos efectos de ese líquido. Otros factores que influyen en los resultados definitivos son indicios de álcali procedentes de vidrio sinterizado, anhídrido carbónico disuelto, separado del aire, la proporción de oxígeno disuelto y la temperatura de incubación. Whipple y Mayer (1906) hallaron que la *Salmonella typhosa* permanecía viable dos meses en agua destilada, en condiciones aerobias, pero sólo cuatro días en un ambiente anaerobio. Houston puso el mismo germen en agua destilada, a diferentes temperaturas; a 0° C vivió ocho semanas, 18° C tres semanas y a 37° C sólo una semana.

Nada prueba que las bacterias propiamente dichas, sembradas en agua destilada, se destruyan por un proceso de plasmoptisis, o sea por absorción excesiva de agua y rotura consigiente de las células, pues éstas resisten demasiado a los cambios de presión osmótica para que pueda suceder tal cosa.

Ácidos. Krönig y Paul (1897) fueron probablemente quienes demostraron por primera vez que el poder germicida de los ácidos guarda proporción con el pH de sus soluciones. Es decir, que un ácido enérgico (HCl, H_2SO_4) es más germicida que otro débil (láctico, acético, benzoico). Wínslow y Lochridge (1906) compararon las concentraciones de HCl y H_2SO_4 necesarias para conseguir en cuarenta minutos una reducción de 99 % o de 100 % de gérmenes de *Escherichia coli* y hallaron que se necesitaba una solución 0,0077 N de HCl, o 0,0096 N de H_2SO_4 para reducir en 99 % el número de tales bacterias. Como el grado de disociación era mayor con HCl que con H_2SO_4, las concentraciones finales de hidrogeniones eran prácticamente iguales.

Pero la concentración de hidrogeniones no explica siempre toda la acción desinfectante de una solución ácida; en algunos casos, ésta depende también del carácter de la molécula. Winslow y Lochridge (1906) indicaron que hacía falta una solución 0,0812 N de ácido acético o 0,0097 N de ácido benzoico para reducir en 99 % el número de *E. coli* en un perío-

do de exposición de cuarenta minutos. La cantidad de hidrógeno disociado en el ácido acético era de 1,2 partes por millón, y sólo de 0,1 parte por millón en el ácido benzoico; en cambio, se necesitaron 7,49 partes por millón de HCl para lograr el mismo resultado. De ello resulta que los ácidos acético y benzoico producen un efecto tóxico, además del de los iones de hidrógeno, y ese efecto puede provenir de la acción adicional de los aniones, de las moléculas no disociadas o de los tres factores en conjunto.

Los ácidos benzoico y salicílico son débiles, se disocian casi por completo en solución neutra o alcalina y apenas lo hacen en una solución fuertemente ácida. Rahn y Conn (1944) observaron que los ácidos benzoico, salicílico y sulfuroso eran casi cien veces más germicidas en soluciones muy ácidas que en soluciones neutras; sólo las moléculas no disociadas desarrollaban efectos germicidas apreciables, apenas esbozados en los iones.

Álcalis. Krönig y Paul (1897) señalaron que la acción desinfectante de los álcalis dependía de la presencia de iones OH^-, y que a mayor grado de disociación correspondía una acción germicida más eficaz. Álcalis especialmente tóxicos para bacterias son KOH, NaOH, LiOH y NH_4OH; de ellos, KOH desarrolla la máxima actividad germicida, en virtud de su mayor grado de disociación, y la mínima es propia del NH_4OH, por ser el menos ionizado.

Se conocen algunas excepciones a la regla anterior. El hidróxido bárico, $Ba(OH)_2$, por ejemplo, está menos disociado que el hidróxido potásico, KOH, pero es mucho más tóxico, por serlo en extremo el ion de bario. La acción combinada de los iones de bario y de oxhidrilo se traduce en un efecto germicida más intenso que el de cualquiera de ellos por separado.

Los hidrogeniones desarrollan un efecto tóxico mayor que un número equivalente de oxhidriliones.

Sales. Se ha demostrado que los cationes ejercen un efecto peculiar y característico sobre la viabilidad de las bacterias; en general, a bajas concentraciones tienden a estimular el crecimiento bacteriano, mientras que a otras más altas se hacen inhibitorios o auxostáticos, y finalmente tóxicos.

Sherman y Holm (1922) hallaron que concentraciones bajas de NaCl aceleraban el desarrollo de *Escherichia coli*, y que el estímulo óptimo se producía a una concentración aproximadamente 0,20 M de la sal. El pH más favorable para el crecimiento, tanto en el medio de contraste como en el salino, se acercaba a 7,8. Resultados análogos comunicaron Winslow y Hotchkiss (1922).

Según Sherman y Holm, *E. coli* sólo se desarrolla por excepción en un medio de peptona al 1 % y de pH 4,8, mientras que lo hace muy bien en el mismo medio después de añadir NaCl hasta obtener una

solución 0,2 M; el NaCl ensanchaba el margen del pH de crecimiento, y esta ampliación se hacía aún más pronunciada sobre el de algunas otras especies de bacterias.

Hotchkiss (1923) estudió el efecto de una serie de sales inorgánicas, en las que se combinaban diferentes cationes con un mismo anión (cloruro), sobre el desarrollo de *E. coli*. Las sales se podrían dividir en dos grupos, a base de su toxicidad: las del grupo primero no permiten crecer *E. coli* a concentraciones de 2 M a 0,05 M; las del segundo impiden el desarrollo a diluciones de 0,01 M a O,00001 M. Aquéllas se encuentran de ordinario en el ambiente del protoplasma y se consideran no tóxicas.

El primer grupo comprende los cloruros de Na, K, Li, NH_4, Sr, Mg, Ca, Ba, Mn, Ti y Sn; el segundo, los cloruros de Ni, Tl, Cu, Fe, Zn, Co, Pb, Al, Ce, Cd y Hg.

Los estudios realizados acerca de los cloruros de Na, K, NH_4 y Li demostraron que el crecimiento máximo se produce a concentraciones 0,25 M de sal, después de un período de incubación de tres días; las concentraciones menores o mayores que la indicada reducían notablemente el crecimiento de los microorganismos. Al cabo de diez días, el máximo era indefinido, porque los gérmenes, a concentraciones menores de 0,25 M, aumentaban poco a poco de número, hasta que su enturbiamiento igualó el producido a la concentración 0,25 M.

En general, las sales divalentes del grupo primero mostraron una toxicidad mayor que las monovalentes. La concentración más favorable al desarrollo oscila entre 0,05 y 0,025 M.

Las sales del segundo grupo resultaron más tóxicas para la *E. coli*. En soluciones más diluídas, algunas de ellas, incluyendo $HgCl_2$, produjeron una acción estimulante definida.

Como ya hemos señalado, las sales estimulantes a grandes diluciones se hacen tóxicas más concentradas; pero los efectos tóxicos se han estudiado mejor. Koch (1881) fué probablemente quien primero indicó que las sales de metales pesados, en particular las de mercurio y plata, resultaban tóxicas a bajas concentraciones para las bacterias. Krönig y Paul (1897) comprobaron que la toxicidad de las soluciones de $HgCl_2$ provenía de la concentración de iones Hg disociados; a mayor concentración de iones Hg libres, más eficacia germicida. Posteriormente, Paul y Prall (1907) llegaron a la misma conclusión: las sales mercuriales de los ácidos orgánicos, por ejemplo, el acetato de mercurio, que se disocian poco, muestran una acción germicida muy inferior.

La toxicidad de las sales de ácidos minerales puede derivar del catión, del anión, de la molécula en conjunto o de los tres factores. Para determinar a cuál de ellos corresponde, se han hecho ensayos combinando un catión con distintos aniones y diversos cationes con el mismo anión.

Winslow y Hotchkiss (1922) probaron algunos cationes con diversas bacterias e informaron que, en general, la toxicidad de los mismos

aumentaba con la valencia. Dispusieron los cationes, por orden creciente de toxicidad, como sigue: K, Na, NH_4, Li, Sr, Mg, Ba, Ca, Mn, Ti^{+++}, Sn, Ni, Ti^{+}, Zn, Cu, Fe^{++}, Fe^{+++}, Co, Pb, Al, Ce, Cd, Hg.

Holm y Sherman (1921) determinaron los índices de crecimiento de *E. coli* en una solución de peptona a la que se habían agregado diversas sales sódicas, y llegaron a la conclusión de que el ion cloruro es el menos tóxico, y el fluoruro el más tóxico. Los iones Cl, I, NO_3, SO_4, PO_4 y lactato aceleraban la proliferación, mientras que la estorbaban los iones oxalato, acetato, citrato y fluoruro.

Diferentes especies de bacterias varían considerablemente de sensibilidad frente a un mismo ion. Eisenberg (1919) demostró que el *B. anthracis* resiste en absoluto la acción de los iones de fluoruro, yoduro y oxalato; el *Corynebacterium diptheriae,* la de teluratos, teluritos, níquel y cobre; la *Salmonella typhosa,* la de las sales de estroncio; el neumococo, la de los ferrocianuros, teluritos, etc. Es decir que los microorganismos se pueden clasificar fundándose en su sensibilidad a los diversos iones.

Al estudiar la acción de los iones sobre las bacterias, interesa además la composición del medio de cultivo. Las sales son más germicidas en agua destilada que en un medio proteinífero, a concentración igual; esto proviene de una reacción química entre sales y proteínas, en virtud de la cual disminuye la concentración de iones en el medio.

Por lo general, los gérmenes grampositivos son más sensibles a diversos iones que las bacterias gramnegativas; y otro tanto cabe decir respecto a la acción de los distintos colorantes (pág. 245).

Mecanismos de acción de las sales. Respecto a la acción de las sales sobre gérmenes vivos, pueden sentarse las siguientes conclusiones:

La mayoría de las sales, muy diluídas, ejercen una acción estimulante sobre las bacterias; en soluciones más concentradas, su efecto es tóxico o germicida.

Cuando se llega a la escala tóxica, el efecto germicida es proporcional a la concentración de la sal.

El efecto tóxico de las sales monovalentes puede neutralizarse añadiendo una sal divalente; de manera análoga, el efecto tóxico de una sal divalente se neutraliza, en la mayoría de los casos, mediante adición de una sal monovalente.

En general, los cationes divalentes son más tóxicos que los monovalentes; los más pesados suelen ser asimismo más germicidas que los de menos peso. Por ejemplo, $HgCl_2$ es más tóxico que $MgCl_2$.

Las sales son más germicidas en agua destilada que en soluciones que contengan proteínas. Esto es probablemente válido para todos los agentes destructores de gérmenes; la substancia orgánica inactiva mucho las sales, tal vez porque se combina con ellas y reduce así la concentración iónica.

Diferentes especies bacterianas varían no poco de sensibilidad a una misma sal. En general, los microorganismos muy afines responden de modo semejante.

Los microorganismos grampositivos son habitualmente más sensibles que los gramnegativos a los efectos tóxicos de las sales.

Los ácidos orgánicos se disocian poco, en comparación con los inorgánicos, a pesar de lo cual hay algunos dotados de enérgica actividad germicida. El efecto tóxico se atribuye a la acción de las moléculas no disociadas, y no a sus iones. Probablemente ocurre lo mismo con la toxicidad de las sales de ácidos orgánicos.

Reductores. Algunos compuestos desarrollan una acción germicida en virtud de su poder reductor; así actúan el ácido sulfuroso, los sulfitos, los compuestos ferrosos y el formaldehido. Este último destruye tanto células vegetativas como esporas; una solución de formaldehido al 5 % (el formol del comercio es una solución de formaldehido gaseoso al 40 % en agua) mata las esporas de ántrax en una a dos horas.

Véase más información en Ingram (1947).

Oxidantes. Los compuestos que ceden oxígeno o son capaces de desprenderlo de otros cuerpos se han empleado como germicidas, y sus efectos tóxicos derivan de un proceso de oxidación. Entre ellos merecen mencionarse el peróxido de hidrógeno, el permanganato potásico, los halógenos (cloro, bromo, yodo) y ciertas combinaciones que los contienen, como el ácido hipocloroso, HOCl, y los hipocloritos; el clorohipoclorito cálcico, o polvos de gas, CaCl (OCl); la cloramina, $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot SO_2NNaCl \cdot 3H_2O$, y la dicloramina, $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot SO_2NCl_2$.

El peróxido de hidrógeno es un oxidante activo, que se descompone fácilmente en agua y oxígeno. La solución comercial de H_2O_2 (al 3 %), o agua oxigenada, se considera capaz de destruir esporas de ántrax en una hora.

El permanganato potásico es un oxidante enérgico, y antes se empleaba mucho para aniquilar bacterias; su actividad aumenta en solución ácida. Según Krönig y Paul, una solución con 1 % de $KMnO_4$ y 1,1 % de HCl en agua destruye las esporas de ántrax en treinta segundos. La sal reacciona pronto con materia orgánica y se convierte en MnO_2 insoluble, colorante pardo; por eso dejó de utilizarse hace tiempo el permanganato como germicida.

Los polvos de gas constituyen probablemente el compuesto oxigenado más importante de los halógenos. Disueltos en agua se descomponen, al parecer como sigue:

$$2\ CaCl(OCl) + 2\ CO_2 + 2\ H_2O \rightleftharpoons CaCl_2 + Ca(HCO_3)_2 + 2\ HClO$$

El HClO se desdobla luego en cloruro de hidrógeno y oxígeno:

$$2\ HClO \rightleftharpoons 2\ HCl + O_2$$

Si se emplea gas cloro, las reacciones son:

$$Cl_2 + H_2O \rightleftharpoons HCl + HClO$$
$$2\ HClO \rightleftharpoons 2\ HCl + O_2$$

Los compuestos que contienen cloro activo ligado a un átomo de nitrógeno, de la fórmula general $R_2{=}N{-}Cl$ y $R{-}N{=}Cl_2$, son también potentes germicidas, con actividad directamente proporcional a la medida en que se desarrollan reacciones de hidrólisis en solución:

$$R_2{=}N{-}Cl + H_2O \rightarrow R_2{=}N{-}H + HClO$$

$$R{-}N{=}Cl_2 + H_2O \rightarrow R{-}N(H)(Cl) + HClO$$

El factor activo es HClO:

$$2\ HClO \rightleftharpoons 2\ HCl + O_2$$

El bromo agregado al agua reacciona del siguiente modo:

$$2\ Br_2 + 2\ H_2O \rightleftharpoons 4\ HBr + O_2$$

o bien

$$Br_2 + H_2O \rightleftharpoons HBr + HBrO$$
$$2\ HBrO \rightleftharpoons 2\ HBr + O_2$$

En comparación con el cloro y el bromo, apenas se hidroliza el yodo en solución ácida; por eso actúa como I_2 molecular o en forma de ion I_3^-, al parecer con la misma eficacia. El mecanismo de acción del yodo se considera diferente del de HClO y HBrO (Fair, Burden, Conant y Morris, 1944).

Beckwith y Moser (1933) hallaron que el cloro, el bromo y el yodo destruyen casi con igual energía la *Escherichia coli*. Tanner y Pitner (1939) informaron que el bromo era eficaz contra microorganismos no esporíparos, particularmente *E. coli* y *Salmonella typhosa*, y en el mismo sentido se han manifestado Hyatt y Piszczek (1943). Gershenfeld y Witlin (1949) han comprobado que soluciones con yodo libre desarrollan contra el *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* una actividad antibacteriana más eficaz que el cloro o el bromo, en presencia y en ausencia de materia orgánica.

Knox, Stumpf, Green y Auerbach (1948) comunicaron que el cloro, a concentraciones bactericidas o menores, inactivaba diversos fermentos sulfhidrílicos y otras enzimas sensibles a la oxidación. La inhibición de enzimas esenciales causa la muerte de las células; la de la oxidación de glucosa corresponde a la proporción de bacterias destruídas. La aldolasa del *E. coli* resulta ser una de las enzimas esenciales de la oxidación de glucosa suficientemente sensibles al cloro para explicar su efecto bactericida.

Fenoles y cresoles. Estos cuerpos, en soluciones medianamente concentradas, son germicidas muy eficaces. El fenol es soluble en agua, pero la mayoría de los otros miembros del grupo apenas lo son; sin embargo, se pueden mantener en suspensión mezclándolos con jabón, y así se obtienen soluciones coloidales.

La emulsificación de desinfectantes poco solubles en agua origina preparaciones germicidas más potentes. Una vez emulsionadas, las partículas de germicida quedan adsorbidas en la superficie del emulsivo (jabón), con lo que aumenta la concentración junto a las bacterias. Los desinfectantes emulsionados son más activos recién preparados; al cabo de unos días, la actividad decrece, probablemente por haber cambiado su estado coloidal. Un desinfectante comercial notable de este tipo es una solución compuesta de cresol, conocida bajo el nombre registrado de Lisol.

Se admite generalmente que los fenoles y cresoles forman con las proteínas proteinatos insolubles, lo cual se traduce en una precipitación de las proteínas del protoplasma. Kojima (1931) opuso la teoría de la coagulación directa de las proteínas bacterianas, por haber comprobado que la concentración de fenol necesaria para destruir las bacterias no llega a coagular la albúmina de huevo. Reichel (1909) suponía que esta acción es más de orden físico que químico, pues el fenol puede disolverse en proteínas coaguladas, lípidos, grasas y en el citoplasma de bacterias; la acción germicida provendría de su facultad de penetrar en la célula como solución coloidal.

Alcoholes. El alcohol absoluto suele no ser germicida, o lo es sólo ligeramente; pero al añadirle agua adquiere ostensiblemente esa propiedad. Su máxima potencia germicida corresponde a una concentración de 70 % en peso (77 % en volumen).

Smith (1947) ha observado que el alcohol es eficaz contra el *Mycobacterium tuberculosis*, que sucumbe en 15 a 30 segundos con alcohol absoluto, y con alcohol etílico al 95 e incluso al 70 %. El de 95 % parece ser el mejor para superficies húmedas; el de 50 % para las secas, y el de 70 % para húmedas y secas.

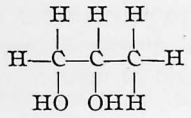
Tanner y Wilson (1943) informaron que la acción germicida de los alcoholes alifáticos aumentaba con el peso molecular hasta el derivado amílico (5 átomos de carbono) y disminuía desde el alcohol octílico al undecílico (11 átomos de carbono). Como la solubilidad de los alcoholes merma al aumentar el peso molecular, no se emplean en general los miembros superiores de la serie como germicidas.

Koch (1881) y Krönig y Paul (1897) demostraron que la adición de alcohol absoluto a cloruro mercúrico reducía grandemente la potencia germicida de este último. Disolviendo $HgCl_2$ en alcohol de 50 %, esta potencia era mayor que la de una solución acuosa de la sal; y lo mismo ocurre con el nitrato argéntico. Como la toxicidad de estas sales es

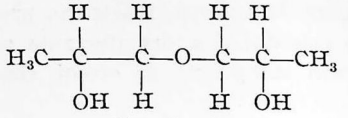
proporcional a la concentración de iones de mercurio o de plata, se necesita agua para la ionización. Otros germicidas, como el fenol y el formaldehido, lo son menos en presencia de alcohol, aun en pequeña cantidad.

Glicoles. Robertson y otros (1948) estudiaron un crecido número de glicoles, en particular los de propileno, dipropileno y trietileno, pues estas substancias poseen ciertas propiedades que las hacen aptas para uso como desinfectantes aéreos en atmósferas ocupadas por seres humanos.

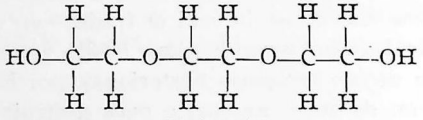
Las fórmulas son:



Propilenglicol



Dipropilenglicol



Trietilenglicol

Los citados autores descubrieron que el efecto letal de los glicoles era muy inferior al de fenoles, halógenos y detergentes. Aun los glicoles de máxima potencia bactericida no fueron capaces de detener el crecimiento de bacterias a concentraciones menores de 3 %, y los menos letales resultaron ativos sólo en soluciones de más del 50 %. Sin embargo, la comparación con alcohol etílico reveló que este compuesto era poco más eficaz para impedir el crecimiento bacteriano que el propilenglicol, el más bactericida de los glicoles no tóxicos.

En general, cuanto mayor es la concentración de glicol, más rápida es la acción bactericida. En solución al 98 %, el propilenglicol y el trietilenglicol mataban en menos de un minuto, y probablemente en pocos segundos. El propilenglicol, a concentraciones de 70 a 80 %, producía igualmente una destrucción rápida y resultó ser el más eficaz de los tres glicoles. La acción del dipropilenglicol era menos regular.

Bazzicalupo, Portella y Contieri (1951) informaron que, en cobayos experimentalmente infectados, el tratamiento subcutáneo con propilenglicol detenía alteraciones tuberculosas extensas y prolongaba el lapso de supervivencia. En el organismo vivo reprimían la tuberculosis tanto como otras substancias de propiedades bacteriostáticas *in vitro*. El poder antituberculoso del propilenglicol *in vivo* era mayor iniciando el tratamiento inmediatamente después de la infección.

Colorantes. Desde hace mucho tiempo se sabe que ciertos colorantes de alquitrán, especialmente los del grupo del trifenilmetano, poseen la propiedad de modificar la viabilidad de las bacterias. Esta acción

se describió primero como bactericida, por creerse que los microorganismos morían al interrumpirse su desarrollo; pero más tarde se vió que algunas veces no morían, sino que dejaban de multiplicarse simplemente. Churchman (1912, 1928) introdujo el término «bacteriostasis» para expresar este fenómeno, y la palabra parece adecuada para describir la acción tóxica de estos compuestos frente a las bacterias.

En la mayoría de los casos, la acción bacteriostática selectiva corre parejas con la reacción de Gram. Esto significa que los microorganismos que toman el gram (gram +) son más sensibles que los gramnegativos a la acción de los colorantes mencionados; y a la inversa, los gérmenes que no toman el gram (gram —) son más resistentes que los grampositivos a la acción referida. El paralelismo entre la acción bacteriostática y la reacción de Gram no se registra en los microorganismos ácidorresistentes *Mycobacterium tuberculosis, M. paratuberculosis, M. avium,* etcétera, que son grampositivos, pero relativamente refractarios a la acción de los colorantes del trifenilmetano.

Al aumentar la alcalinidad de la solución de un colorante básico aumenta su poder bactericida, que disminuye, en cambio, si la alcalinidad se reduce. De manera análoga, cuando aumenta la acidez de un colorante ácido, lo hace también su poder germicida, que asimismo desciende al mermar aquélla.

En la figura 122 se expone el efecto del violeta cristal sobre la *Escherichia coli* y el *Bacillus subtilis*.

Ingraham (1933) creía que el efecto bacteriostático del violeta cristal provenía de su propiedad de equilibrar el potencial de oxidación-reducción en una escala demasiado alta para que las células pudieran multiplicarse. Hoffmann y Rahn (1944) se muestran de acuerdo con Ingraham y, prosiguiendo sus estudios, hallaron que, pasada cierta concentración, el colorante actuaba como cualquier otro germicida; las células morían en progresión logarítmica y proporcionalmente a la concentración del colorante. Éste era más tóxico para células jóvenes que para las viejas, y su toxicidad aumentaba sólo ligeramente al subir el pH. La acción estrictamente germicida derivaba probablemente de la combinación del colorante con ciertos elementos indispensables de la célula. A concentraciones más bajas, el colorante no daba una curva logarítmica de supervivencia y desaparecía la influencia de la edad de la célula, del pH y de la concentración de aquél; es posible que este singular efecto proviniera del desfavorable potencial de oxidación-reducción, compensado por el colorante, el cual producía un período dilatorio anormalmente largo, que aumentaba con la concentración del producto. La longitud de la fase dilatoria era inversamente proporcional al logaritmo del número de células sembradas.

Para más información, véanse Albert (1942), Fischer, Hoffmann, Prado y Boné (1944), y Tilley (1939).

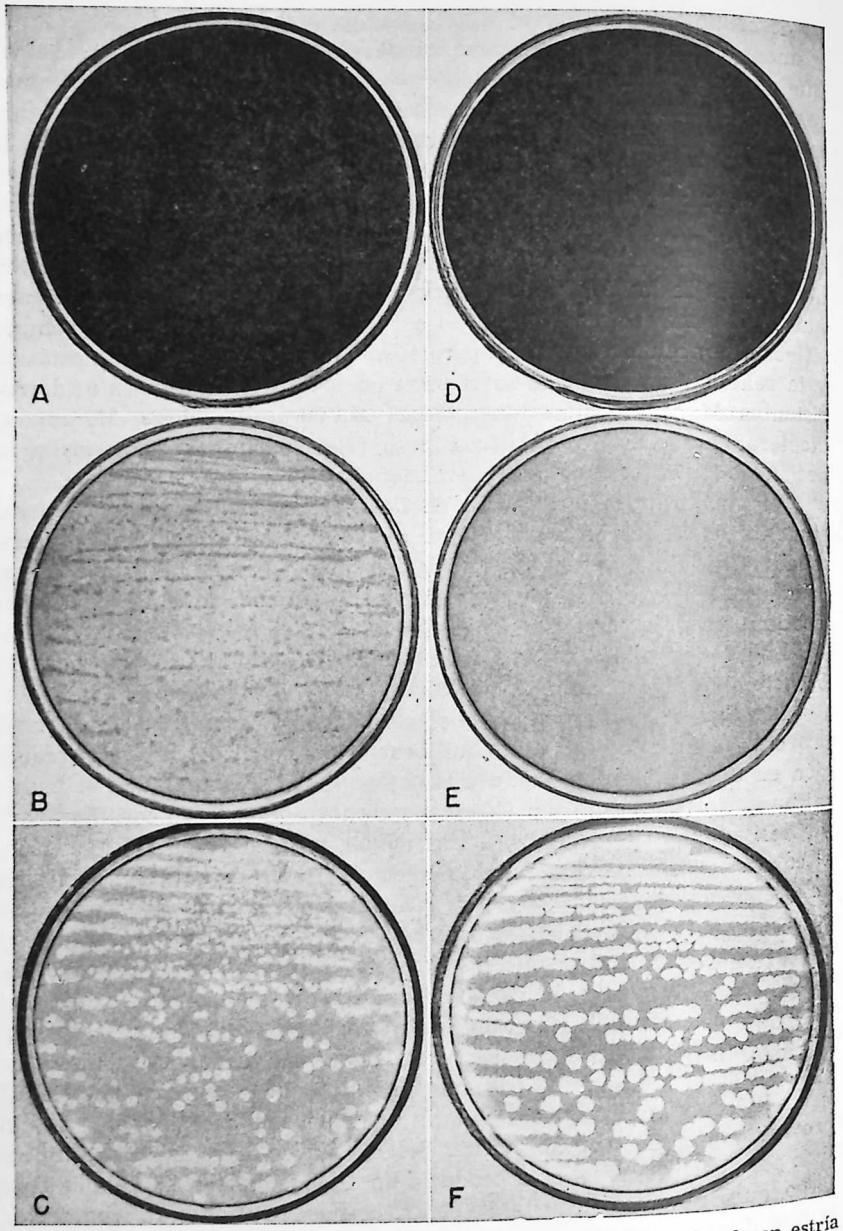


Fig. 122. — Efecto del violeta cristal. *A, B, C, Escherichia coli* sembrada en estría sobre una superficie de agar nutritivo que contiene colorante a concentraciones de 1:5000, 1:100.000 y 1:2.000.000, respectivamente. *D, E, F, Bacillus subtilis*, sembrado en las mismas condiciones. La concentración al 1:5000 de violeta cristal detuvo el desarrollo de ambos gérmenes; la de 1:100.000 paralizó el *B. subtilis* (gram +), pero no la *E. coli* (gram —); la de 1:2.000.000 no fué suficiente para impedir el crecimiento de *B. subtilis*.

Compuestos mercuriales. Los compuestos de mercurio se cuentan entre los primeros empleados para destruir bacterias. De ellos, el cloruro mercúrico (dicloruro de mercurio) se tenía por el más potente de los compuestos germicidas disponibles. Por entonces, Koch (1881) dedujo de sus resultados experimentales que el dicloruro de mercurio era muy eficaz contra el microbio del ántrax, ya que mataba las células vegetativas y las esporas de una sola vez en pocos minutos.

Luego se vió que las bacterias no morían siempre, sino que dejaban de multiplicarse simplemente ante la presencia de indicios del agente químico en el medio; en otras palabras, el mercurio es un factor fuertemente bacteriostático y no mata necesariamente todas las bacterias a las concentraciones ordinarias. Para suprimir la acción bacteriostática del mercurio adherido a las bacterias, y de la pequeña cantidad que pasaba al subcultivo con la resiembra, se utilizó sulfuro amónico, a fin de inactivar el mercurio; así, muchas de las bacterias continuaban viviendo y en condiciones de reproducirse en el subcultivo.

A causa de su acción bacteriostática se emplean, como antisépticos cutáneos, compuestos mercuriales con colorantes u otros radicales orgánicos. Los cuerpos organomercuriales son menos tóxicos e irritantes que los cloruros, yoduros y cianuros de mercurio usados antiguamente.

Morton, North y Engley (1948) han estudiado los organomercuriales metafén, mertiolato y mercurocromo con *Streptococcus pyogenes*, y demostrado que presentaban muchas deficiencias como desinfectantes. Los gérmenes, sumidos en un estado de bacteriostasis por esos agentes, seguían siendo capaces de producir una septicemia funesta cuando se introducen en el organismo animal.

El hecho de que las bacterias sigan siendo infecciosas en estado de bacteriostasis es razón suficiente para tomar precauciones a fin de eliminar el efecto bacteriostático del mercurio durante los ensayos de la actividad germicida de compuestos mercuriales *in vitro*.

Véase más información en Brewer (1948), Kass (1949), Morton, North y Engley (1948).

Compuestos argénticos. Los efectos germicidas y antisépticos de las sales simples de plata (nitrato, citrato, lactato, etc.) se deben a la presencia de iones de plata en disolución.

La plata, como el mercurio, es un metal fuertemente bacteriostático. La acción antiséptica de las combinaciones simples de plata se complica con irritación, dolor, astringencia y causticidad; estos efectos se pueden evitar empleando preparaciones coloidales del metal.

El contraste con las sales argénticas simples, las preparaciones coloidales (proteinato fuerte, argirol, etc.) dan únicamente unos pocos iones libres de plata en disolución. Las soluciones concentradas de productos organoargénticos no precipitan cloruros ni proteínas, ni son

corrosivos, astringentes o irritantes. Sin embargo, los compuestos son germicidas y bacteriostáticos, y esta acción, distinta según el producto, no es proporcional al contenido total en plata, sino a la concentración de iones libres de plata en disolución.

Jabones. Desde los comienzos de la Bacteriología se sabe que los jabones, tanto blandos como duros, son excelentes germicidas.

Los jabones blandos se preparan hirviendo aceites y grasas con hidróxido potásico; para los duros se emplea hidróxido sódico. Los primeros sirven para elaborar jabones líquidos y champúes, y con los segundos se fabrican jabones en polvo, en escamas y en barras o pastillas.

Son varias las características físicas importantes de los jabones. Disueltos en agua, reducen la tensión superficial, forman soluciones coloidales y geles, aceleran la humectación de superficies, dan a la solución un tacto escurridizo y tienen la propiedad de emulsionar y dispersar grasas y suciedad en la solución, lo cual sirve para limpiar.

Para intensificar su utilidad germicida, se han incorporado a los jabones diversos agentes químicos, como fenoles, cresoles, yoduro mercúrico, cloruro mercúrico, metafén, cloramina y hexaclorofén, pero se ha demostrado que la mayoría de estos jabones antisépticos no son más eficaces que los corrientes para destruir bacterias. En realidad, algunas substancias pueden perder sus facultades germicidas en presencia de jabón e incluso mermar las propiedades antisépticas naturales de éstos; por ejemplo, los jabones que contienen cresol y fenol son menos eficaces que el cresol, el fenol o el jabón por separado, a concentraciones iguales.

McCulloch (1940) ensayó la acción de un gran número de jabones comerciales sobre varias cepas de *Streptococcus agalactiae* y extrajo las siguientes conclusiones:

Soluciones de jabones comerciales y jabones en polvo, a 40° C y en presencia de 5 % de leche descremada y 5 % de cultivo de gérmenes en caldo, resultaron ser, entre dos y tres veces, más eficaces que el fenol para matar en un minuto estreptococos de la mastitis, y tan eficaces como 100 partes por millón del más activo germicida, entre varios hipocloritos ensayados.

Un jabón que contenía cresoles no era mejor germicida que los jabones no medicinales, y los jabones con compuestos mercuriales sólo se mostraron algo más activos que los ordinarios.

Soluciones jabonosas, a las concentraciones usualmente conseguidas al frotarse las manos en agua caliente, son eficaces contra los estreptococos de la mastitis.

Véase más información en Blank, Coolidge, Soutter y Rodkey (1950), Fishbien y otros (1945), John (1949), Morton (1944), Nungester, Thirlby y Vial (1949) y Rahn (1945).

Agentes de superficie y detergentes sintéticos. Un agente de superficie tiene la propiedad de orientarse entre dos interficies y hacer más íntimo su contacto recíproco. Si la función del agente es favorecer la

humectación y la penetración, se llama agente de actividad superficial, y si las dos interficies son de líquidos no miscibles, este agente reduce la tensión interficial y se forman emulsiones. El agente constituye en tal caso un emulsivo. Cuando el agente de actividad superficial reúne propiedades humectantes y emulsivas en grado a propósito, se llama detergente sintético.

Los detergentes sintéticos, como los jabones, constan de un grupo hidrófugo (que repele el agua) y otro hidrófilo (que atrae el agua).

Los compuestos detergentes y humectantes se componen en gran parte de agentes aniónicos y poseen una carga eléctrica negativa; se ionizan en el agua como los jabones:

Jabones	Agentes aniónicos
R·COONa	R·SO_3Na
Grupo carboxilo	Grupo sulfónico

En su mayoría, los emulsivos no son iónicos, es decir, no se ionizan en el agua. Un agente no iónico típico es el monostearato de glicerina, emulsivo empleado en la industria panadera y para fabricar helados y cosméticos:

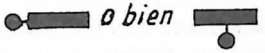
$$\begin{array}{l} CH_2\cdot OOC\cdot C_{17}H_{35} \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \qquad \text{o} \qquad RCOOR'$$

Los agentes catiónicos poseen una carga eléctrica positiva y pueden invertir la acción de los jabones; generalmente son sales amónicas substituídas. Muy conocidos son los compuestos amónicos cuaternarios de fórmula

$$R - N(CH_3)_3Cl$$

Probablemente, 75 % de los agentes catiónicos son sales amónicas cuaternarias; a este grupo pertenecen los agentes de saneamiento y bactericidas.

Los agentes de superficie tienden a localizarse en la capa superficial o la interficie de líquidos. Una molécula de actividad superficial se puede representar en esquema por una barra para el grupo hidrófugo (liposoluble) y un disco para el grupo polar (hidrosoluble), según que éste se halle en el extremo o en otro lugar de la cadena de carbonos:



La película superficial se puede representar como sigue:



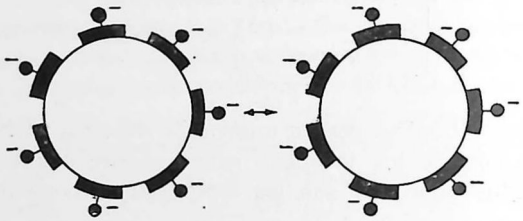
La superficie de una solución que contenga un agente de superficie se halla prácticamente alterada, por estar cubierta de una película de hidrocarburos del espesor de una capa molecular. Cuando una solución acuosa que contiene un humectante se halla en contacto con una superficie lipoidea, el grupo hidrófobo del humectante se absorbe, y sobresale el grupo polar:



Tal superficie no puede ser humedecida por el agua; por eso, los humectantes reducen la tensión superficial de este líquido. Estas soluciones pueden penetrar en aberturas y grietas, en espacios muy pequeños e incluso hasta el centro de agregados de bacterias. Las mismas soluciones, sin humectantes, quedan simplemente encima de esas aberturas, sin mostrar penetración alguna apreciable.

Los agentes de superficie son de gran importancia como complementos en soluciones germicidas para aplicaciones clínicas. Así pueden penetrar éstas en tejidos infectados (pus, detritos necróticos, bacterias, etcétera).

Una superficie celular cubierta de moléculas adsorbidas de un humectante se puede representar como sigue:



El número de cargas negativas situadas en la superficie de la célula es mucho mayor en presencia de un agente de actividad superficial que si éste falta. Esto se traduce en la inmediata dispersión y exposición de organismos vivos, protegidos antes contra la acción del factor bactericida.

Aplicaciones de los agentes superficiales. Los agentes de actividad superficial se prestan a muy distintos usos, manifestados por sus aplicaciones con fines de detergencia, solubilización, emulsificación, penetración capilar, humectación, diseminación y desinfección.

Los compuestos amónicos cuaternarios se emplean mucho como germicidas, para destruir bacterias. Primeramente se creyó que eran germicidas a grandes diluciones, pero después se ha visto que así son fuertemente bacteriostáticos nada más, y germicidas sólo cuando están más concentrados. El efecto bacteriostático se puede eliminar añadiendo un agente capaz de neutralizar la acción del germicida. Los neutralizantes comprenden jabones, detergentes aniónicos, fosfolípidos, etc.

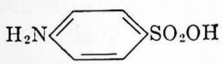
El poder bactericida real de los compuestos amónicos cuaternarios

parece estar comprendido entre los dos extremos de actividad muy alta y muy baja. Se obtiene un resultado que indica un poder excesivo si el compuesto citado no se retira activamente de los organismos en tratamiento. Las células así inhibidas morirán al fin, pero no sucumben en seguida, según se aprecia por los resultados.

Los compuestos amónicos cuaternarios superiores se consideran dotados de muchas ventajas frente a los bactericidas usuales en Medicina. Son desinfectantes superficiales eficaces e inofensivos, germicidas para muchas bacterias patógenas no esporíparas y mohos, tras una exposición de varios minutos. Tienen tensiones superficiales bajas, y algunos poseen propiedades detergentes y queratolíticas. Se dice que son emolientes, y poco irritantes a concentraciones eficaces.

Para más información véanse Chaplin (1952), Curran y Evans (1950), Davies (1949), Glassman (1948), Johns (1948), Kivela, Mallmann y Churchill (1948), Klein y Kardon (1947), Knox, Auerbach, Zarudnaya y Spirtes (1949), Lawrence (1948), McCulloch, Hauge y Migaki (1948), Stuart, Bogusky y Friedl (1950), Valko y Du Bois (1944), Van Eseltine y Hucker (1948), Weber y Black (1948).

Sulfamidas. Este nombre se ha aplicado a un grupo de productos medicamentosos, que muestran actividad bacteriostática *in vitro* y bactericida *in vivo*. El primer miembro importante de este grupo que se empleó extensamente en clínica es la *p*-aminobencenosulfamida (amida del ácido sulfanílico), conocida comúnmente por sulfanilamida:

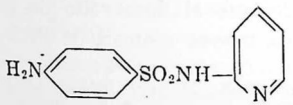


Ácido sulfanílico

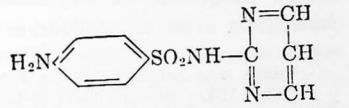


Sulfanilamida

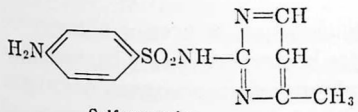
Muchos derivados de la sulfanilamida se han preparado substituyendo los átomos de hidrógeno de los radicales amino por otros grupos o radicales. He aquí los nombres y las fórmulas de constitución de algunas de las sulfamidas más corrientes:



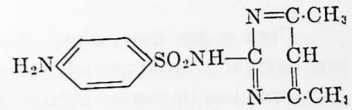
Sulfapiridina



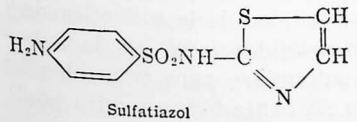
Sulfadiazina



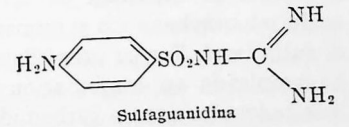
Sulfamerazina



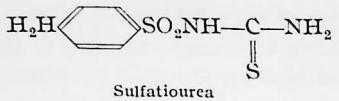
Sulfametazina



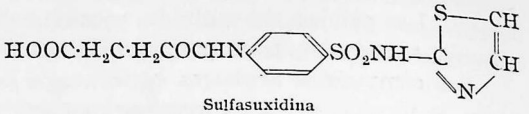
Sulfatiazol



Sulfaguanidina



Sulfatiourea



Sulfasuxidina

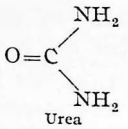
Aplicaciones clínicas. Estos medicamentos son útiles en diversas enfermedades e infecciones, algunas de las cuales solían presentar un índice de mortalidad muy elevado; entre ellas se cuentan: neumonía, meningitis, blenorragia, infecciones por micrococos y estreptococos hemolíticos, gangrena gaseosa, infecciones de heridas y de las vías urinarias. Los derivados son más bien específicos contra ciertas afecciones; unos pueden ser muy útiles, y otros tal vez no lo sean. Por consiguiente, hay que elegir el derivado apropiado a la enfermedad o infección que interese combatir; por ejemplo, la sulfanilamida resultó ser de enorme utilidad a las tropas en la segunda guerra mundial, en forma de polvos, para prevenir la infección de heridas; cada soldado llevaba siempre consigo una provisión como recurso de urgencia.

Modo de acción. Entre las muchas teorías expuestas para explicar el modo de acción de las sulfamidas, la de Fildes (1940) parece ser la más lógica. Woods (1940) demostró que el ácido *p*-aminobenzoico (PAB), a grandes diluciones, contrarrestaba la acción de las sulfamidas; y Fildes observó que el PAB es un metabolito esencial, normalmente asociado a una enzima. Las sulfamidas desalojan el PAB de su enzima y así interrumpen esta línea esencial del metabolismo.

A menos de administrar una dosis suficiente de sulfamidas, los microorganismos propenden a desarrollar una resistencia al producto, lo que obliga a elevar mucho la dosis. Landy, Larkum y Ostwald (1943), y Landy, Larkum, Ostwald y Streighoff (1943), trabajando con *Micrococcus pyogenes* var. *aureus,* han comprobado que el desarrollo de la resistencia a las sulfamidas se traducía en una mayor síntesis de PAB.

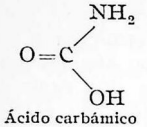
Véase más información en Florestano y Bahler (1948), Henry (1943), Landy y Dicken (1942), Robln (1946), Roblin y Bell (1943), Shannon (1943), Spink, Wright, Vivino y Skeggs (1944), y Youmans (1948).

Urea y sus derivados. Se ha averiguado que la urea y algunos de sus derivados, como el uretano, son fuertes bacteriostáticos y bactericidas para muchas bacterias gramnegativas y algunas grampositivas. Asimismo potencian la actividad de las sulfamidas, inhiben moderadamente el ácido *p*-aminobenzoico y aumentan la solubilidad de la sulfanilamida y el sulfatiazol. Por su propiedad de disolver tejidos necróticos, la urea se ha empleado en combinación con las sulfamidas para tratar heridas infectadas. La urea o carbamida tiene la siguiente fórmula estructural:

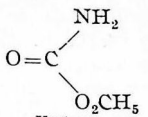


Urea

El uretano es el éster etílico del ácido carbámico:

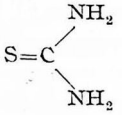


Ácido carbámico



Uretano

Weinstein (1946) informa que, substituyendo en la urea el grupo =O por =S, para obtener tiourea,



aumentaba notablemente su actividad antibacteriana.

Véase más información en Howe y Weinstein (1947), Klotz y Mellody (1949).

EVALUACIÓN DE GERMICIDAS

El método generalmente empleado para valorar germicidas se basa en sus coeficientes de fenol. Se han propuesto otros métodos nuevos para medir la toxicidad de los germicidas frente a tejidos y frente a las bacterias de ensayo.

Método del coeficiente de fenol. Esta prueba fué propuesta primero por Rideal y Walker (1903) para comparar y evaluar substancias destinadas a destruir bacterias; posteriormente se han recomendado muchas modificaciones del método primitivo. En la actualidad, el procedimiento que suele seguirse en los Estados Unidos es el presentado por Ruehle y Brewer (1931), del Servicio de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration, FDA) del Ministerio de Agricultura; esta prueba, en una u otra forma, es de uso universal para examinar y valorar desinfectantes.

Definición. El coeficiente de fenol puede definirse como el poder letal de un germicida frente a un microorganismo de ensayo, comparado con el del fenol en condiciones idénticas. Las condiciones que deben especificarse comprenden: 1.°, tiempo de acción del germicida; 2.°, temperatura del ensayo; 3.°, presencia y cantidad de materia orgánica; 4.°, microorganismo empleado; 5.°, antigüedad del cultivo; 6.°, composición y reacción del medio de cultivo; 7.°, relación entre cantidades de desinfectante y de cultivo, y 8.°, temperatura y tiempo de incubación de

tubos o matraces. Las variaciones de uno o varios de estos requisitos afectan el resultado final, y por eso es muy importante concretar las condiciones de la prueba, pues de otro modo no tendrá ningún valor ese resultado.

Tiempo y temperatura. En general, la acción germicida aumenta con el tiempo, de suerte que puede emplearse una dilución mayor si se aumenta el período de acción. Esto se aplica igualmente a la temperatura; cuando ésta se eleva, es mayor la eficacia de un germicida y puede diluirse más. Los aumentos de tiempo y de temperatura no afectan por igual a todos los germicidas, y por eso no se puede formular una regla general de acción.

No siempre aumenta la acción germicida con el tiempo; el yodo es un oxidante vigoroso y actúa casi en el acto al ponerlo en contacto con bacterias.

Materia orgánica. Probablemente, la presencia de materia orgánica reduce mucho la actividad de todos los germicidas, aunque no en la misma proporción. Esto ocurre, sobre todo, con proteínas, aminoácidos y substancias de composición semejante. Los resultados de evaluar germicidas en solución acuosa difieren por completo de los obtenidos cuando se añade materia orgánica; la clase y cantidad de ésta han de mencionarse al indicar la eficacia de productos germicidas.

Microorganismos. La acción de los germicidas sobre diferentes especies de bacterias es muy desigual. Hay algunos más eficaces contra gérmenes grampositivos que contra los gramnegativos, y viceversa; y otros vienen a tener la misma toxicidad frente a estos dos grupos. Hay que mencionar el nombre del microorganismo examinado; generalmente se emplean *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (grampositivo) y *Salmonella typhosa* (gramnegativo).

Antigüedad del cultivo. Los organismos viejos suelen ser más resistentes que los jóvenes a condiciones adversas de ambiente. En casi todos los procedimientos de valoración de germicidas se utilizan cultivos de 24 horas; esta precaución es necesaria para obtener resultados constantes y comparables.

Composición y reacción del medio. Los resultados finales dependen también de la composición y el pH de los medios de cultivo. Goetchius (1950) empleó extracto de carne de vaca de tres procedencias distintas y obtuvo coeficientes de fenol muy distintos. Klarmann y Wright (1945) consiguió resultados similares, que le indujeron a proponer el uso de medios semisintéticos para llegar a cifras más constantes. En general, un microorganismo resiste mejor condiciones adversas en su pH óptimo; cualquier cambio de reacción del medio en uno u otro sentido aumenta la sensibilidad de los gérmenes frente al germicida.

Proporción entre desinfectante y cultivo. Existe paralelismo entre el número de microbios empleados en la prueba y la cantidad mínima de germicida necesaria para destruirlos; si aumenta o disminuye el primero, hay que elevar o reducir la concentración del producto para lograr iguales efectos.

Método. El método del Servicio de Alimentos y Drogas (FDA), de Ruehle y Brewer (1931), es como sigue: Se prepara una serie de diluciones de fenol y del germicida que interesa comparar, en agua destilada estéril, contenida en tubos de ensayo de 25 mm de diámetro y 150 mm de altura; en cada tubo no debe haber más de 5 c. c. de dilución de germicida. Los tubos, colocados en una gradilla, se ponen en un baño de maría, previamente ajustado a 20° C, y se dejan allí cinco minutos, por lo menos, a fin de que las diluciones de germicida adquieran la misma temperatura del baño.

Antes de la prueba deberán resembrarse los microorganismos a diario, durante cinco días consecutivos. Se utilizará para aquélla un cultivo de 24 horas, que se agita vigorosamente para deshacer pequeños agregados de bacterias, y se coloca después en el baño de maría durante quince minutos, a fin de que se depositen las partículas grandes en suspensión. A cada dilución de germicida se añaden con pipeta 1,5 c. c. de cultivo; a intervalos de cinco, diez y quince minutos se toma de cada tubo una asa de 4 mm de producto, y se pasa a un tubo correspondiente, que contiene 10 c. c. de caldo. Estos tubos de subcultivo se incuban a 37° C durante 48 horas, o por mayor espacio, cuando se sospeche que el germicida es bacteriostático.

Si se valoran productos mercuriales o argénticos, colorantes u otros que posean gran poder bacteriostático, es necesario preparar nuevos subcultivos de los primeros tubos de resiembra inmediatamente después de terminar la prueba; o bien hacer la primera siembra en porciones de 100 c. c. de caldo, contenidas en matraces; o resembrar caldo con substancias que se combinen con el germicida o lo destruyan. Por ejemplo, bacterias tratadas con cloruro mercúrico contienen iones Hg^+ adsorbidos en sus paredes celulares; en tales condiciones, las bacterias no mueren forzosamente, pero ya no pueden reproducirse; a veces el número de iones Hg^+ no basta para producir la muerte, pero sí para desarrollar un efecto bacteriostático. El tioglicolato sódico comprende un grupo sulfhidrilo capaz de reaccionar con iones Hg^+; si a un caldo nutritivo que lo contenga se trasladan microorganismos tratados con mercurio, los grupos sulfhidrilo eliminan el germicida de las bacterias, anulando el efecto bacteriostático del mercurio, de modo que los microorganismos pueden desarrollarse de nuevo.

El coeficiente de fenol se calcula dividiendo la dilución máxima de germicida que destruye en diez minutos el germen examinado, pero no en cinco, por la dilución correspondiente de fenol. Por ejemplo, en la tabla 16 el coeficiente de fenol sería 350 : 90 = 3,89; esto significa que el germicida *A* es 3,89 veces más eficaz que el fenol.

Como la prueba se ha efectuado con *Salmonella typhosa*, el valor citado constituye el coeficiente de fenol de esa especia microbiana.

TABLA 16. DILUCIONES DE FENOL Y DE GERMICIDA *A* LETALES PAGA *Salmonella typhosa* EN DIFERENTES PERÍODOS DE TIEMPO

Germicida	Dilución	Tiempo, minutos		
		5	10	15
Fenol.	1:70	—	—	—
	1:80	—	—	—
	1:90	+	—	—
	1:100	+	+	+
Germicida *A* . .	1:325	—	—	—
	1:350	+	—	—
	1:375	+	+	—
	1:400	+	+	+

Se encontrará más información en Mallmann (1948), Mallmann y Leavitt (1948), Ostrolenk (1950), y Rahn (1947).

Limitaciones de la prueba. La prueba del coeficiente de fenol se destinó en un principio a comparar la toxicidad de este producto con la de sus similares; pero últimamente se ha venido usando para valorar substancias que difieren totalmente del fenol en composición y actividad, como el cloro y sus combinaciones, los de mercurio, yodo, germicidas de amonio cuaternarios, etc., con resultados muy diversos.

También es causa de divergencia la libertad con que ciertos autores han aplicado el método, modificándolo según los productos ensayados. Por ejemplo, en el procedimiento oficial se emplea agua como diluente; pero algunos han substituído este líquido por alcohol para aumentar la potencia germicida del producto en estudio. Asimismo se ha utilizado agua alcalinizada con ciertos germicidas solubles en soluciones alcalinas, pero no en agua sola. Los coeficientes de fenol así obtenidos no representan una comparación auténtica de los productos germicidas y el fenol.

Otra limitación de esta prueba es su carencia de valor para determinar la eficacia de un germicida destinado a aplicaciones clínicas. El coeficiente de fenol expresa la relación entre la toxicidad de un germicida y la del fenol frente a un microorganismo dado, pero nada dice sobre sus efectos en tejidos vivos. Puede comprenderse que un germicida con elevado coeficiente de fenol y toxicidad proporcionalmente elevada para los tejidos no ofrecerá ventaja sobre otro de coeficiente de fenol bajo y toxicidad proporcionalmente escasa para los tejidos vivos.

Método de la histotoxicidad. Se han recomendado varios métodos para determinar los efectos de germicidas sobre células de tejidos vivos, así como su capacidad de destruir bacterias.

Nye (1937), Welch y Hunter (1940), Welch y Brewer (1942), Welch, Slocum y Hunter (1942) y Hirsch y Novak (1942), ensayaron germicidas determinando su toxicidad para los tejidos a base de inhibición de la fagocitosis. Witlin (1942), Green y Birkeland (1942, 1944), Gershenfeld y Witlin (1947) probaron el efecto de los germicidas sobre la membrana corioalantoica infectada del embrión de pollo en evolución. Nungester y Kempf (1942) embadurnaron el rabo de ratones anestesiados, utilizando una suspensión en caldo del microorganismo en ensayo, y dejaron secar el cultivo; luego, se sumergieron los rabos en una solución del germicida. Tras un período de desecación, se cortó la punta del rabo y se insertó en la cavidad peritoneal a través de una pequeña incisión; la supervivencia de los animales demuestra que el germicida destruía la bacteria sometida a prueba.

Salle y Lazarus (1935), Salle, McOmie y Shechmeister (1937), Salle, McOmie, Shechmeister y Foord (1938, 1939), Shechmeister y Salle (1938), Foord, McOmie y Salle (1938) y Salle y Catlin (1947), ensayaron germicidas para evaluar su efecto sobre la viabilidad de fragmentos de tejido cardíaco de pollo, conservados *in vitro*. Paff, Lehman y Halperin (1945) emplean una modificación del método. Puede calcularse un número conocido por *índice de toxicidad*, y que se define como la relación entre la dilución máxima de germicida necesaria para matar el tejido en diez minutos y la dilución máxima que mata el germen de ensayo en igual tiempo y en condiciones idénticas. Teóricamente, un índice inferior a 1 denota que el germicida es más tóxico para bacterias que para el tejido; y los mayores de 1 corresponden a una mayor toxicidad del germicida para el tejido que para las bacterias. Cuanto más bajo es el índice de toxicidad, más se aproxima el germicida a la perfección.

En la tabla 17 se exponen varios germicidas con sus correspondientes índices de toxicidad. De los agentes ensayados por esta técnica, el máximo grado de eficacia corresponde al yodo, que reúne escasa toxicidad para los tejidos y gran poder germicida contra el *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*.

TABLA 17. TOXICIDAD DE ALGUNOS GERMICIDAS PARA EL TEJIDO CARDÍACO DE EMBRIÓN DE POLLO Y *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, A 27° C

Germicida (Tinturas)	Máxima dilución letal para tejidos y bacterias e índices de toxicidad correspondientes		
	Tejidos (*A*)	Bacterias (*B*)	Índice de toxicidad, *A*/*B*
Yodo.	1:4000	1:20.000	0,2
Mercresina	1:9000	1:19.000	0,5
Mertiolato.	1:15.000	1:4500	3,3
Metafén.	1:12.000	1:1200	10,0

Más información contienen los trabajos de Britt y Schweiger (1950), Hunter (1943), Lovell (1945), McCulloch (1945), Prombo y Tilden (1950), Rahn (1945b), Salle, Shechmeister y McOmie (1940).

REFERENCIAS

Albert, A.: Chemistry and physics of antiseptics in relation to mode of action, *Lancet*, **243**: 633, 1942.

Anderson, T. F., S. Boggs, y B. C. Winters: The relative sensitivities of bacterial viruses to intense sonic vibration, *Science*, **108**: 18, 1948.

Apostoli y Laquerrière: De l'action polaire positive du courant galvanique constant, sur microbes et en particulier sur la bacteridie charbonneuse, *Compt. rend.*, **110**: 918, 1890.

Barron, E. S. G., y S. Dickman: Sudies on the mechanism of action of ionizing radiations. II. Inhibition of sulfhydryl enzymes by alpha, beta, and gamma rays, *J. Gen. Physiol.*, **32**: 595, 1949.

—, —, J. A. Muntz, y T. P. Singer: Studies on the mechanism of action of ionizing radiations. I. Inhibition of enzymes by X-rays, *ibid.*, **32**: 537, 1949.

Bazzicalupo, C., A. Portella, y M. Contieri: Action of propylene glycol upon experimental tuberculosis in guinea pigs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**: 671, 1951.

Beattie, J. M., y F. C. Lewis: On the destruction of bacteria in milk by electricity, *Special Report* 49, Londres, Medical Research Council, 1920.

Beckwith, T. D., y J. R. Moser: Germicidal efecctiveness of chlorine, bromine, and iodine, *J. Am. Water Works. Assoc.*, 25: 267, 1933.
— y C. E. Weaver; Sonic energy as a lethal agent for yeast and bacteria, *J. Bact.*, 32: 361, 1936.
Blanck, I. H., M. H. Coolidge, L. Soutter, y G. V. Rodkey: A study of the surgical scrub, *Surg. Gynecol. Obstet.*, 91: 577, 1950.
Brewer, J. H.: Reduction of infectivity of certain pathogenic bacteria by «Mercurochrome», *J. Am. Med. Assoc.*, 137: 858, 1948.
Britt, E. M., y L. B. Schweiger: Methods of evaluating new antiseptic agents, *Proc. Indiana Acad. Sci.*, 60: 73, 1950.
Burnett, W. T., Jr., M. L. Morse, A. W. Burke, Jr., y A. Hollaender: Reduction of the X-ray sensitivity of *Escherichia coli* by sodium hydrosulfite and certain other inorganic sulfur compounds, *J. Bact.*, 63: 591, 1952.
Chaplin, C. E.: Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants, *J. Bact.*, 63: 453, 1952.
Chick, H.: An investigation of the laws of disinfection, *J. Hyg.*, 8: 92, 1908.
—: The process of disinfection by chemical agencies and hot water, *ibid.*, 10: 237, 1910.
Churchman, J. W.: The selective bactericidal action of gentian violet, *J. Exp. Med.*, 16: 221, 1912.
— Staining reactions of bacteria. De «The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology», ed. por E. O. Jordan e I. S. Falk, Chicago, University of Chicago Press, 1928.
Cohen, B.: Disinfection studies. The effects of temperature and hydrogen-ion concentration upon the viability of *Bacterium coli* and *Bacterium typhosum* in water, *J. Bact.*, 7: 183, 1922.
Curran, H. R., y F. R. Evans: Quaternary ammonium compounds as sterilizing agents for bacterial spores, *J. Dairy Sci.*, 33: 1, 1950.
Davies, G. E.: Quaternary ammonium compounds, *J. Hyg.*, 47: 271, 1949.
Ephrati, E.: The mechanism of the effect of X-rays on bacterial toxins, *Biochem. J.*, 42: 383, 1948.
Fabian, F. W., y H. T. Graham: Influence of high frequency displacement currents on bacteria, *J. Infectious Diseases*, 53: 76, 1933.
Fair, G. M., R. P. Burden, G. H. Conant, y J. C. Morris: Water-disinfecting tablets, *J. New Eng. Walter Works Assoc.*, 58: 270, 1944.
Ficker, M.: Über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen, *Z. Hyg.*, 29: 1, 1898.
Fildes, P.: A rational approach to research in chemotherapy, *Lancet*, 238: 955, 1940.
Fischer, E., O. Hoffmann, E. Prado, y R. Boné: On the mechanism of bacteriostasis with triphenylmethane dyes, *J. Bact.*, 48: 439, 1944.
Fishbein, M., y otros: «Medical Uses of Soap», Filadelfia, J. B. Lippincott Company,, 1945.
Florestano, H. J., y M. E. Bahler: Investigation of some newer sulfonamides as intestinal chemotherapeutic agents, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 92: 196, 1948.
Foord, D. C., W. A. McOmie, y J. Salle: Germicidal efficiency of some silver compounds tested by the improved tissue culture method, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38: 572, 1938.
Gaden, E. L., Jr., E. J. Henley, y V. P. Collins: Preservation of milk by radiation, *Food Technol.*, 5: 506, 1951.
Gale, C. K., y D. Miller: Bactericidal action of short and ultrashort waves, *J. Lab. Clin. Med.*, 21: 31, 1935.
Gershenfeld, L., y B. Witlin: The egg injection method in the evaluation of bactericides, *Am. J. Pharm.*, 119: 156, 1947.
— y —: Free halogens. A comparative study of their efficiencies as bactericidal agents, *ibid.*, 121: 95, 1949.
Glassman, H. N.: Surface active agents and their application in bacteriology, *Bact. Rev.*, 12: 105, 1948.
Goetchius, G. R.: Testing germicides, *Soap Sanit. Chemicals*, 26: 131, 1950.

Green, T. W., y J. M. Birkeland: Use of the chick embryo in evaluating disinfectants, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 55, 1942.
— y —: The use of the developing chick embryo as a method of testing the antibacterial effectiveness of wound disinfectants, *J. Infectious Disease*, 74: 32, 1944.
Haberman, S.: Lethal and dissociate effects of X-rays on bacteria, extr., Doctoral Dissertations, núm. 36, Ohio State University, 1942.
Hamre, D.: The effect of ultrasonic waves upon *Klebsiella pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Miyagawanella felis*, and influenza virus A, *J. Bact.*, 57: 279, 1949.
Harvey, E. N., y A. L. Loomis: The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves, *J. Bact.*, 17: 373, 1929.
Henry, R. J.: The mode of action of sulfonamides, *Bact. Rev.*, 7: 175, 1943.
Hirsch, M. M., y M. V. Novak: Evaluation of germicides with relation to tissue toxicity, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 50: 376, 1942.
Hoffmann, C. E., y O. Rahn: The bactericidal and bacteriostatic action of crystal violet, *J. Bact.*, 47: 177, 1944.
Holm, G. E., y J. M. Sherman: Salt effects in bacterial growth. I. Preliminary paper, *J. Bact.*, 6: 511, 1921.
Hotchkiss, M.: Studies on salt action. VI. The stimulating and inhibitive effect of certain cations upon bacterial growth., *J. Bact.*, 8: 141, 1923.
Howe, C. W., y L. Weinstein: The action of urea and some of its derivatives on bacteria. IV. The effect of a mixture of urethane and sulfanilamide on the bacterial flora of infected wounds in man, *Surg., Gynecol. Obstet.*, 84: 913, 1947.
Hunter, A. C.: The evaluation of antiseptics, *J. Am. Assoc.*, 121: 25, 1943.
Hyatt, C. A., y E. A. Piszczek: Some results of bromine for swimming pool disinfection, American Public Health Association Convention, Oct. 12, 1943.
Ingraham. M. A.: The bacteriostatic action of gentian violet and its dependence on the oxidation-reduction potential, *J. Bact.*, 26: 573, 1933.
Ingram, M.: The germicidal effects of free and combined sulphur dioxide, *J. Soc. Chem. Ind.*, 67: 18, 1948.
John, Sister Mary: Germicidal value and use of hexachlorophene, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 10: 488, 1949.
Johns, C. K.: Influence of organic matter on the germicidal efficiency of quaternary ammonium and hypochlorite compounds, *Can. J. Research, F*, 26: 91, 1948.
Jordan, R. C., y S. E. Jacobs: Studies in the dynamics of disinfection. I. New data on the reaction between phenol and *Bact. coli* using an improved technique together wit an analysis of the distribution of resistance amongst the cells of the bacterial populations studied, *J. Hyg.*, 43: 275, 1944*a*; II. The calculation of the concentration exponent for phenol a 35° C with *Bact. coli* as test organism, *ibid.*, 43: 363, 1944*b*; III. The reaction between phenol and *Bact. coli*: the effect of temperature and concentration: with a detailed analysis of the reaction velocity, *ibid.*, 44: 210, 1945*a*; IV. The reaction between phenol and *Bact. coli*; true shape of the probit-log survival-time curve, *Ann. Applied Biol.*, 32: 221, 1945*b*; V. The temperature coefficient of the reaction between phenol and *Bact. coli*, derived from data obtained by an improved technique, *J. Hyg.*, 44: 243, 1946*a*; VI. Calculation of a new and constant temperature coefficient for the reaction between phenol and *Bact. coli.*, *ibid.*, 44: 249, 1946*b*; VII. The reaction between phenol and *Bact. coli*: The effect of temperature on the usually accepted concentration exponent and the calculation of a more satisfactory exponent based on theoretical considerations, *ibid.*, 44: 421, 1946*c*; IX. The effect of lethal temperatures on standard cultures of *Bact., coli*. The nature of the probit-log survival-time relationship at pH 7.0, *ibid.*, 45: 144, 1947*a*; X. The effect of lethal temperatures on standard cultures of *Bact. coli*. On the variation of the rate of disinfection with temperature at pH 7.0, including the calculation of a new and constant temperature coefficient, *ibid.*, 45: 333, 1947*b*; XI. The effect of lethal temperatures on standard

cultures of *Bact. coli*. An investigation of that portion of the population whih survives prolonged exposure at pH 7.0, *ibid.*, 45: 342, 1947c; XII. The effect of variation in pH on the rate of disinfection at 51° C. of standard cultures of *Bact. coli*, *ibid.*, 46: 136, 1948a; XIII. The nature of the probit-log survival-time relationship in disinfections of standard cultures of *Bact. col* at 51° C. under various conditions of pH, *ibid.*, 46: 280, 1948b; XIV. The variation of the concentration exponents for hydrogen ad hydroxyl ions with mortality level, using standard cultures of *Bact. coli* at 51° C., *ibid.*, 46: 289, 1948c.

Kass, I.: The use of iodine in a solusalve base as an antiseptic, *J.-Lancet*, 69: 436, 1949.

Kivela, E. W., W. L. Mallmann, y E. S. Churchill: Physical action of surface-active cations upon bacteria, *J. Bact.*, 55: 565, 1948.

Klarmann, E. G., y E. S. Wright: Synthetic and semi-synthetic media for disinfectant testing, *Soap Sanit. Chemicals*, p. 113, enero 1945.

Klatz, I M., y M. Mellody: The inhibition of growth of *Escherichia coli* by some derivatives of urea, *J. Bact.*, 57: 477, 1949.

Klein, M., y Z. G. Kardon: The «reversal», neutralization, and selectivity of germicidal cationic detergents, *J. Bact.*, 54: 245, 1947.

Knox, W. E., V. H. Auerbach, K. Zarudnaya, y M. Spirtes: The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes, *J. Bact.*, 58: 443, 1949

— P. K. Stumpf, D. E. Green, y V. H. Auerbach: The inhibition of sulfhydrvl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine, *ibid.*, 55: 451, 1948.

Kojima, S.: The effects of peroxidase on the bactericidal action of phenols, *J. Biochem.*, 14: 95, 1931.

Krönig, B., y T. Paul: Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfection, *Z. Hyg.*, 25: 1, 1897.

Landy, M., y D. M. Dicken: Neutralization of sulphonamide inhibition of yeast growth by *p*-aminobenozoic acid, *Nature*, 149: 244, 1942.

—, N. W. Larkum, y E. J. Ostwald: Bacterial synthesis of *p*-aminobenzoic acid, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 52: 338, 1943.

—, —, —, y F. Streightoff: Increased synthesis of *p*-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*, *Science*, 97: 265, 1943.

Lawrence, C. A.: Inactivation of the germicidal action of quaternary ammonium compounds, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 37: 57, 1948.

Lovell, D. L.: Skin bacteria, *Surg., Gynecol. Obstet.*, 80: 174, 1945.

McCulloch, E. C.: «Disinfection and Sterilization», Filadelfia, Lea & Febiger, 1945.

—, The efficiency of soaps and other disinfectants in destroying mastitis streptococci, *Am. J. Vet. Research*, 1: 18, 1940.

—, S. Hauge, y H. Migaki: The quaternary ammonium compounds in sanitization, *Am. J. Pub. Health*, 38: 493, 1948.

Madsen, T., y M. Nyman: Zur Theorie der Desinfektion, *Z. Hyg.*, 57: 388, 1907.

Mallmann, W. L.: Practical aspects of disinfection, *Soap Sanit. Chemicals*, 24: 141, 1948.

— y A. H. Leavit: A comparative study of the use-dilution method and the F. D. A. phenol coefficient method applied to some veterinary disinfectants, *Am. J. Vet. Research*, 9: 104, 1948.

Morton, H. E.: «Germicidal» soaps. I. The importance of a clean skin, the action of soaps in freeing the skin of viable microorganisms, and methods for testing the efficiency of germicidal (medicated) soaps, *J. Am. Med. Assoc.*, 124: 1195, 1944.

— L. L. North, Jr., y F. B. Engley, Jr.: The bacteriostatic and bactericidal actions of some mercurial compounds on hemolytic streptococci, *ibid.*, 136: 36, 1948.

Nungester, W. J., y A. H. Kempf: An «infecion-prevention» test for the evaluation of skin disinfectants, *J. Infectious Diseases*, 71: 174, 1942.

—, R. L. Thirlby, y A. B. Vial: Evaluation of hexachlorophene and detergents as substitutes for the surgical scrub, *Surg., Gynecol. Obstet.*, 88: 639, 1949.

Nye, R. N.: The relative in vitro activity of certain antiseptics in aqueous solutions, *J. Am. Med. Assoc.*, 108: 280, 1937.

Ostrolenk, M.: Comparison of in vitro germicide test methods, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 39: 71, 1950.

Paff, G. H., R. A. Lehman, y J. P. Halperin: Comparison of the toxicity of antiseptics for embryonic tissue and bacteria, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 58: 323, 1945.

Patt, H. M., D. E. Smith, E. B. Tyree, y R. L. Straube: Further studies on modification of sensitivity to X-rays by cysteine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73: 18, 1950.

Paul T., y F. Prall: Die Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln mit Staphylokokken, die bei der Temperatur des flussigen Luft aufbewahrt wurden, *Arb. kaiserl. Gesundh.*, 26: fasc. 2, 1907.

Prombo, M. P., y E. B. Tilden: Evaluation of disinfectants by tests in vivo, *J. Dental Research*, 29: 108, 1950.

Rahn, O.: Physical methods of sterilization of microorganisms, *Bact. Rev.*, 9: 1, 1945a.

—: Injury and death of bacteria by chemical agents. *Biodynamica*, 1945b.

—: Advisability of some proposed changes for the evaluation of disinfectants, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 36: 134, 1947.

— y J. E. Conn: Effect of increase in accidity o antiseptic efficiency, *Ind. Eng. Chem*, 36: 185, 1944.

Reichel, H.: Zur Theorie der Desinfektion: die Desinfektionswirkung des Phenols I, *Biochem. Z.*, 22: 149, 1909.

Rideal, S., y J. T. A. Walker: The standardization of disinfectants, *J. Roy-Sanit. Inst.*, 24: 424, 1903.

Robertson, O. H., E. M. Appel, T. T. Puck, H. M. Lemon, y M. H. Ritter: A study of the bactericidal activity in vitro of certain glycols and closely related compounds, *J. Infectious Diseases*, 83: 124, 1948.

Roblin, R. O. Jr.: Metabolite antagonists, *Chem. Rev.*, 38: 255, 1946.

— y P. H. Bell: The relation of structure to activity of sulfanilamide type compounds, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 44: 449, 1943.

Ruehle, G. L. A., y C. M. Brewer: U.S. Food and Drug Administration methods of testing antiseptics and disinfectants, *U.S. Dep. Agr. Circ.*, 198, 1931.

Salle, A. J., y B. W. Catlin: Profile evaluation of germicides, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 36: 129, 1947.

— y A. S. Lazarus: A comparison of the resistance of bacteria and embryonic tissue to germicidal substances. I. Merthiolate, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 32: 665, 1935.

—, W. A. McOmie, y I. L. Shechmeister: A new method for the evaluation of germicidal substance, *J. Bact.*, 34: 267, 1937.

—, —, —, y D. C. Foord: An improved method for the evaluation of germicidal substances, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 37: 694, 1938.

—, —, —, y —: The evaluation of a group of germicides by the tissue culture technique, *J. Bact.*, 37: 639, 1939.

—, I. L. Shechmeister, y W. A. McOmie: Germicidal efficiency of some medicinal dyes compared to a group of non-dye disinfectants, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 45: 614, 1940.

Shannon, J. A.: The relationship between chemical structure and physiological disposition of a series of substances allied to sulfanilamide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 44: 455, 1943.

Shechmeister, I. L., y A. J. Salle: Germicidal efficiency of synthetic phenolic compounds tested by the improved tissue culture method, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38: 295, 1938.

Sherman, F. G., y H. B. Chase: Effects of ionizing radiations on enzyme activities of yeast cells. I. Relation between anaerobic CO_2 production and colony production at intervals after X-radiation, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 33: 17, 1949a; II. Influence of dilution on X-ray induced inhibition of anaerobic CO_2 production and colony formation, *ibid.*, 34: 207, 1949b.

Sherman, J. M., y G. Holm: Salt effects in bacterial growth. II. The growth of *Bacterium coli* in relation to H-ion concentration, *J. Bact.*, 7: 465, 1922.

Shorpshire, R. F.: Turbidimetric evaluation of bacterial disruption by sonic energy, *J. Bact.*, **53**: 685, 1947.
—, Bacterial dispersion by sonic energy, *ibíd.*, **54**: 325, 1947.
Smith, C. R.: Alcohol as a disinfectant against the tubercle bacillus, *Pub. Health Reports*, **62**: 1285, 1947.
Smith, D. E., H. M. Patt, E. B. Tyree, y R. L. Straube: Quantitative aspects of the protective action of cysteine against X-radiation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**: 198, 1950.
Spangler, C. D., y C.-E. A. Winslow: The influence of the sodium ion on the viability of washed cells of *Bacillus cereus*, *J. Bact.*, **45**: 373, 1943.
Spink, W. W., L. D. Wright, J. J. Vivino, y H. R. Skeggs: Para-aminobenzoic acid production by staphylococci. *J. Exp. Med.*, **79**: 331, 1944.
Stapleton, G. E., D. Billen, y A. Hollaender: The role of enzymatic oxygen removal in chemical protection against X-ray inactivation of bacteria, *J. Bact.*, **63**: 805, 1952.
Stuart, L. S., J. Bogusky, y J. L. Friedl: Testing quaternary germicides, *Soap Sanit. Chemicals*, **26**: 127, 1950.
Tanner, F. W., y G. Pitner: Germicidal action of bromine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **40**: 143, 1939.
— y F. L. Wilson: Germicidal action of aliphatic alcohols, *ibíd.*, **52**: 138, 1943.
Tarpley, W., J. Ilavsky, B. Manowitz, y R. V. Horrigan: 1. The effect of high energy gamma radiation from kilocurie radioactive sources on bacteria, *J. Bact.*, **65**: 305, 1953.
Tilley, F. W.: Bactericidal efficiency of certain aniline dyes, *J. Agr. Research*, **58**: 941, 1939.
Trump, J. G., y B. E. Proctor: Sterilizing with electrons, *Modern Packaging*, July, 1951.
Valko, E. I., y A. S. DuBois: The antibacterial action of surface active cations, *J. Bact.*, **47**: 15, 1944.
Van Eseltine, W. P., y G. J. Hucker: The effect of organic matter on germicidal action of the quaternary ammonium compounds, *N. Y. State Agr. Exp. Sta., Tech. Bull*, 282, 1948.
Weber, G. R., y L. A. Black: Laboratory procedure for evaluating practical performance of quaternary ammonium and other germicides proposed for sanitizing food utensils, *Am. J. Pub. Health*, **38**: 1405, 1948.
Weinstein, L.: Action of urea and some of its derivatives on bacteria. V. Antibacterial activity of methyl- and thiourea, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **63**: 506, 1946.
Welch, H., y C. M. Brewer: The toxicity-indices of some basic antiseptic substances, *J. Immunol.*, **43**: 25, 1942.
— y A. C. Hunter: Method for determining the effect of chemical antisepsis on phagocytosis, *Am. J. Pub. Health*, **30**: 129, 1940.
—, G. G. Slocum, y A. C. Hunter: Method for determining the toxicity of antiseptics as measured by the destruction of human leucocytes, *J. Lab. Clin. Med.*, **27**: 1432, 1942.
Whipple, G. C., y A. Mayer, Jr.: On the relation between oxygen in water and the longevity of the typhoid bacillus, *P. Infectious Diseases, Supp.* **2**: 76, 1906.
Whitney, R. Mc.L., y L. A. Russell: An experimental approach to problems of control in quantitative studies of ultrasonic bactericidal effects, *Food Research*, **16**: 205, 1951.
Williams, O. B., y N. Gaines: The bactericidal effects of high frequency sound waves, *J. Infectious Diseases*, **47**: 485, 1930.
Wilson, G. S.: The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting, *J. Bact.*, **7**: 405, 1922.
Winslow, C.-E. A., e I. S. Falk: Studies on salt action. VIII. The influence of calcium and sodium salts at various hydrogen ion concentrations upon the viability of *Bacterium coli*, *J. Bact.*, **8**: 215, 1923*a*; IX. The additive and antagonistic effects of sodium and calcium chlorides upon the viability of *Bacterium coli*, *ibíd.*, **8**: 237, 1923b.

Winslow, C.-E. A., y Hotchkiss: Studies on salt action. V. The influence of various salts upon bacterial growth, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **19**: 314, 1922.
— y E. E. Lochridge: The toxic effect of certain acids upon typhoid and colon bacilli in relation to the degree of their dissociation, *J. Infectious Diseases*, **3**: 547, 1906.
Vitlin, B.: Evaluation of bactericides by egg injection method with special reference to development of technic, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **49**: 27, 1942.
Wood, R. W., y A L. Loomis: The physical and biological effects of high-frequency sound waves of great intensity, *Phil, Mag.*, Series 7, **4**: 417, 1927.
Woods, D. D.: The relation of para-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulfanilamide, *Brit. J. Exp. Path.*, **21**: 74, 1940.
Youmans, A. S.: The relationship of the age of bacterial culture to the delay in sulfonamide bacteriostasis, *J. Bact.*, **55**: 503, 1948.

CAPÍTULO XI

NUTRICIÓN DE LAS BACTERIAS

Los medios nutritivos son preparaciones sólidas, semisólidas y líquidas, empleadas para cultivar microorganismos; constituyen ambientes artificiales asimilados en lo posible a las condiciones naturales.

Los gérmenes autotróficos estrictos no pueden utilizar materia orgánica, y hasta los perjudica su presencia; estos microorganismos son capaces de sintetizar los productos complejos que integran su protoplasma, a partir de simples sales inorgánicas; obtienen su carbono del dióxido de carbono, y su energía de la oxidación de ciertos compuestos o incluso elementos inorgánicos, con lo que resultan independientes de la vida animal o vegetal. Los microbios heterotróficos estrictos u obligados no pueden sintetizar su complicado protoplasma a partir de simples sales inorgánicas, sino que necesitan para su desarrollo productos orgánicos tales como proteínas, peptonas, aminoácidos y vitaminas. Los microorganismos heterotróficos facultativos muestran características intermedias, y pueden utilizar productos inorgánicos y orgánicos; constituyen la gran mayoría de las bacterias estudiadas y clasificadas hasta ahora. En un extremo de la escala, los gérmenes son independientes por completo; en el otro, parásitos absolutos. Fildes (1934) expuso la teoría de que el parasitismo derivaba de la pérdida de enzimas esenciales para la síntesis del protoplasma bacteriano, que impone la necesidad de añadir a los medios de cultivo ciertas substancias complejas.

COMPONENTES COMUNES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se relacionan los ingredientes que suelen formar parte de los medios de cultivo, y sus respectivos usos.

Agua. El agua es absolutamente necesaria para la existencia de toda célula viva. Se prefiere generalmente el agua destilada a la de fuente, por su composición definida; con agua corriente no se pueden preparar siempre medios uniformes, pues el calcio y el magnesio que contiene reaccionan con los fosfatos de las peptonas, del extracto de carne y de otros componentes de los medios de cultivo, y forman fosfatos

insolubles de calcio y de magnesio. Durante la esterilización, tales medios dan abundante precipitado, que suele ser molesto y embarazoso.

Peptonas. Las peptonas son productos intermedios de hidrólisis, y provienen de la acción de ciertos fermentos proteolíticos (generalmente tripsina) sobre proteínas naturales. En el curso de la hidrólisis, la gran molécula de proteína coloidal se divide en varios fragmentos, denominados «proteosas», «peptonas», «péptidos» y «aminoácidos», respectivamente. Las proteosas presentan aún propiedades coloidales, y es corriente considerarlas como el último producto hidrolítico que aún posee caracteres auténticos de proteína; es decir, que la condición proteínica de las moléculas desaparece al proseguir la hidrólisis.

Las peptonas comerciales no son las mismas del laboratorio, pues el químico sólo emplea esta palabra en su sentido estricto. Los preparados comerciales que se emplean en Bacteriología se componen de proteosas o albumosas, peptonas, péptidos y aminoácidos, en proporciones variables, que dependen del tipo de peptona deseado. Lo más corriente es que contengan en abundancia peptona y aminoácidos, con una cantidad insignificante de proteosas y componentes nitrogenados más complejos; otras contienen proteosas en proporción mayor, con menos peptonas y aminoácidos; y las hay que contienen todos los ingredientes en proporciones más o menos ponderadas. Los microorganismos discrepan en sus predilecciones por determinados tipos de peptona.

Las proteínas totales, como la caseína y la albúmina de huevo, empleadas como única fuente de nitrógeno y carbono, no son atacadas probablemente por bacterias; son compuestos indifusibles, y no pueden penetrar en las células mientras sus moléculas no se desdoblen en otras más pequeñas. Si a una proteína se añade un indicio de peptona comercial, inmediatamente es atacada y asimilada; los microorganismos utilizan los componentes de la peptona, y así elaboran las enzimas proteolíticas necesarias para atacar las moléculas de proteína. Los aminoácidos atraviesan fácilmente las membranas celulares de las bacterias y proporcionan a éstas consistencia y energía.

La función más importante de las peptonas en los medios de cultivo es suministrar nitrógeno; como los aminoácidos son compuestos anfóteros, las peptonas constituyen asimismo buenos compensadores o atemperantes.

Véase información sobre estudios químicos y bacteriológicos de diversas peptonas en Hook y Fabian (1943).

Extracto de carne. Se prepara este extracto hirviendo en agua carne magra de vaca, separando el líquido por filtración, y concentrando en vacío; es una masa obscura, pastosa y espesa, de la cual se han eliminado casi todos los componentes nutritivos.

Los materiales separados del tejido muscular por ebullición en agua

se conocen por productos extractivos, y en total constituyen un 2 % del peso del músculo fresco. En el extracto de carne se distinguen dos clases de productos: nitrogenados y no nitrogenados. Los primeros comprenden creatina, xantina, hipoxantina, ácido úrico, ácido adenílico, ácido inosínico, carnosina, carnitina, glicocola, urea, glutamina, alanina β, etc.; entre los segundos se cuentan glucógeno, fosfato de hexosa, ácido láctico, ácido succínico, inosita, grasa, sales inorgánicas y otros.

El empleo de extracto de carne de vaca en medios de cultivo fué introducido por Loeffler (1881), y ha persistido desde entonces en Bacteriología. Se añade extracto de carne a los medios para proporcionar ciertas substancias que estimulan la actividad bacteriana, y, al excitar los fermentos, aceleran el desarrollo de los microorganismos. McIlwain, Fildes, Gladstone y Knight (1939) demostraron que la glutamina, componente del extracto de carne de vaca, era un factor nutritivo necesario para el desarrollo del *Streptococcus pyogenes*. Williams (1941*a*) cree que la alanina β existía en pequeñas cantidades en el extracto de carne, porque puede tener su origen en la hidrólisis de la carnosina o en indicios de ácido pantoténico. Stokes, Gunness y Foster (1944) investigaron en el extracto de carne la presencia de ocho miembros del complejo vitamínico B, a saber: tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, piridoxina, ácido fólico y ácido *p*-aminoácido, y los encontraron en su totalidad (véase «Vitaminas y factores de crecimiento», pág. 275).

Extracto de levadura. Este producto se prepara sometiendo células de levadura a extracción con agua, y evaporando el líquido hasta sequedad en el vacío. La autólisis de las células de levadura se vigila con cuidado, para evitar que se destruyan las vitaminas naturales del complejo B.

El extracto de levadura estimula notablemente el desarrollo bacteriano, y se emplea con frecuencia en medios de cultivo, en vez del extracto de carne. Es una gran reserva de vitaminas B, y proporciona estos factores a los citados medios; por eso resulta superior el extracto de carne en este aspecto.

Gelatina. La gelatina es una proteína, y se prepara hidrolizando colágeno con agua hirviendo. No es soluble en agua fría, pero se hincha y ablanda al sumergirla en ella; se disuelve bien en agua hirviendo, y, al enfriarse, forma una jalea sólida transparente.

Pocas veces sustituye la gelatina al agar en la preparación de medios sólidos, porque la atacan y descomponen muchas bacterias, y porque funde a 37°C. Se añade a los medios de cultivo principalmente para probar hasta qué punto la licuan los microorganismos, o si no lo hacen; es de importancia para identificar y clasificar bacterias.

Agar. El agar es la substancia mucilaginosa seca que se extrae de varias especies de *Gelidium* y otras algas afines que viven principalmente a lo largo de las costas del Japón, China, Ceilán, Malasia y California meridional.

Es el éster que forma el ácido sulfúrico con una galactana lineal, insoluble en agua fría, soluble en la caliente; una solución neutra al 1 % se solidifica a 35-50°C en un gel firme, que funde entre 80° y 100°C. Se emplea con preferencia a la gelatina como solidificante, para el desarrollo y el aislamiento de especies bacterianas.

Lo atacan y licuan diversos microbios terrestres y marinos. Stanier (1941, 1942) ha descrito siete especies marinas bien identificadas de los géneros *Vibrio, Cytophaga* y *Pseudomonas*, y varias cepas de un *Actinomyces*, capaces de licuar el agar.

Para más información sobre especies que atacan el agar, véanse Humm (1946), Humm y Shepard (1946), y Tseng (1944 *a*-*b*).

Cloruro sódico. Generalmente se añade a los medios de cultivo cloruro sódico para aumentar su presión osmótica, aunque no suele hacer falta.

A veces se requieren medios que contienen sangre para cultivar bacterias o para apreciar una reacción hemolítica sobre agar. Los glóbulos rojos se hemolizan al ponerlos en agua o en medios de reducida presión osmótica; desde luego, tales medios no sirven para reconocer una reacción hemolítica, y esto puede remediarse añadiendo cloruro sódico a concentración próxima a la de una solución isotónica.

El cloruro sódico no actúa como atemperante o compensador. Algunas sales, como fosfatos y carbonatos, que tienen muy acentuada esa propiedad, se añaden con frecuencia a medios de cultivo con tal objeto (página 298).

Substancias inorgánicas necesarias. No se sabe con exactitud qué substancias inorgánicas requieren las bacterias. Por lo regular se les añaden las siguientes: Na, K, Mg, Fe, S, P; y de materia orgánica se obtienen generalmente Cl, C, N y H.

Young, Begg y Pentz (1944), estudiando las necesidades de factores nutritivos inorgánicos de la *Escherichia coli*, comprobaron que este germen consumía Mg, Fe, Na, K, PO_4, SO_4, Cl, N y H. Webb (1948) ha dado a conocer la producción de formas filamentosas de *Clostridium perfringens* en medios complejos que contenían peptona exenta de Mg; tales filamentos se convertían en células de morfología normal por subcultivo en un medio que contenía iones libres de Mg.

Perlman (1945) preparó un medio de carbohidratos con escasos cationes metálicos, pasando la parte no iónica del medio por una columna de intercambio catiónico. Al fermentar con *Aerobacter aerogenes* este medio purificado, tuvo efecto una redistribución de los productos resultantes: disminuyeron las cantidades de ácido acético, ácido fórmico y alcohol etílico, y aumentaron las de ácido láctico y dióxido de carbono.

Se volvió a la fermentación «normal» agregando iones de manganeso y cromo al medio purificado; la adición de Zn, Cu, Al y Fe provocó una reversión parcial.

MacLeod y Snell (1948) prepararon un medio deficiente en K y relativamente exento de NH_4 y Na. Según ellos, el medio sustentaba un excelente desarrollo de cinco bacterias lácticas (*Lactobacillus arabinosus, L. casei, L. mesenteroides* 8042 y 9135, y *Streptococcus faecalis*), al incorporarle cantidades adecuadas de K. Estas cantidades habían de ser mucho mayores si se añadían Na y NH_4; que estos iones detuvieran el desarrollo dependía de la relación entre sus concentraciones y la de K, y no de las cantidades absolutas presentes.

Roberts y Roberts (1950) han extraído de sus investigaciones la conclusión de que el potasio quedaba fijado por adsorción en ciertos puntos de la célula; la cantidad del metal adsorbido depende del número de esos lugares y de la concentración de potasio y otros iones concurrentes en el medio. Durante el metabolismo aeróbico y anaeróbico de substratos de glucosa y otros se originaban y destruían zonas de adsorción, lo cual indica que éstas provenían de factores intermedios del metabolismo de la glucosa.

El metabolismo del fósforo y el del potasio indicaban que una fracción importante de la glucosa suministrada a la célula se consumía (en condiciones aeróbicas) por oxidación de los fosfatos de hexosa, proceso en el que no interviene el potasio; este metal se necesita, sin embargo, en cierta fase del metabolismo anaeróbico, y determina el ritmo del suministro de energía para la síntesis.

Carroll, Danby, Eddy y Hinshelwood (1950) han estudiado el consumo de iones de potasio, rubidio y sodio por el *A. aerogenes* cultivado en un medio sintético. El potasio sustentaba el crecimiento en su mayor parte, pero las células podían absorber también rubidio, y acumular potasio y rubidio en relación de 5: 2, de un medio que contenía los dos iones en idéntica concentración; en cambio, no eran capaces de asimilar cantidades perceptibles de sodio de una mezcla de este metal con rubidio.

Shankar y Bard (1952) informan acerca de la necesidad de Ca, Mg, Fe, Na y K, pero no de Zn, Mn, Co ni Cu para el desarrollo de *Cl. perfringens*. Sin Ca, las bacterias crecen en estado de agregación, mientras que la escasez de Mg y K provoca la producción de células filamentosas.

El azufre parece ser un componente universal de las células vivas. Cowie, Bolton y Sands (1950) han comprobado que el ion de sulfato atravesaba fácilmente células de *E. coli*, y que la absorción de este elemento era directamente proporcional al desarrollo celular.

Han estudiado el consumo de hierro por las bacterias de Waring y Werkman (1942, 1943, 1944). Emplearon un medio deficiente en hierro, y comprobaron que las células de *A. indologenes* necesitaban, por lo menos, 0,025 parte por millón de hierro en el cultivo para su desarrollo

óptimo. El germen, cultivado en un medio carente de hierro, contenía 0,0031 % de este metal; en el mismo medio, con la cantidad mínima de hierro requerida (0,025 parte por millón), contenía 0,0073 % de hierro; y cultivado con gran exceso del metal, contenía 0,1049 % del mismo. El efecto de la deficiencia de hierro en los sistemas enzimáticos de *A. indologenes* muestra depresión en los de catalasa, peroxidasa, deshidrogenasa fórmica, hidrogenasa y citocromos.

Algunas sales desempeñan un importante papel en las funciones vitales del protoplasma, y penetran en la estructura más íntima de la célula. Guilleman y Larson (1922) demostraron que, al matar *E. coli* por el calor, se difundían aproximadamente la mitad de las sales inorgánicas fuera de las células, y permanecían fijas en el interior de ellas la otra mitad, que, a juicio de estos autores, ejercen allí alguna función vital. Las sales fijadas mostraban un elevado cociente K/Na, en comparación con las sales libres. Además, dentro de la célula permanece prácticamente todo el hierro, lo cual indica que este elemento es necesario para la actividad protoplasmática.

Productos fermentables. Con frecuencia se agregan a los medios de cultivo substancias fermentables, que tienen un doble objeto: 1.º, proporcionan reservas de energía fácilmente disponibles, siempre que los gérmenes elaboren las enzimas necesarias para fermentar las substancias, y 2.º, mediante reacciones de fermentación, contribuyen ampliamente a identificar y clasificar microorganismos.

Las substancias fermentables principales que se añaden a medios de cultivo son:

Monosacáridos:
- Pentosas: arabinosa, xilosa, ramnosa.
- Hexosas: glucosa, levulosa, manosa, galactosa.

Disacáridos:
- Sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, melibiosa.

Trisacáridos:
- Rafinosa, melecitosa, gencianosa.

Polisacáridos:
- Almidón, inulina, dextrina, glucógeno, celulosa.

Alcoholes:
- Trivalentes: glicerina.
- Pentavalentes: adonita.
- Hexavalentes: manita, dulcita, sorbita.

Glucósidos:
- Salicina, amigdalina.

Compuestos no carbohidratos:
- Inosita.

TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios nutritivos empleados para cultivar bacterias pueden dividirse en dos grupos, según el carácter de las substancias que entran en su composición: sintéticos y no sintéticos.

Medios de cultivo sintéticos. Estos medios se componen de productos de estructura química conocida. Pueden consistir enteramente en sales orgánicas o mezclas de sales inorgánicas y substancias orgánicas, o en productos inorgánicos y orgánicos con factores auxéticos o de crecimiento. Se conoce la constitución química de todos los componentes, lo cual permite reproducir un lote de cualquier medio con gran exactitud. Se emplean medios sintéticos de cultivo cuando interesa averiguar el efecto que un organismo produce sobre ciertas substancias, y también para determinar las necesidades nutritivas de las bacterias.

McCullough y Dick (1943) cultivaron varias especies de *Brucella* en un medio sintético compuesto de sales inorgánicas, glucosa y factores auxéticos. En una información posterior, McCullough y otros (1947) tratan del desarrollo de *B. suis* en un medio constituido por aminoácidos, ácido nucleico, iones metálicos, glucosa y factores de crecimiento. Gerhardt y Wilson (1948) emplearon un medio similar al de McCullough y Dick, pero con adición de ácido láctico, glicerina y *dl*-asparagina, y obtuvieron resultados análogos. Johnson y Rettger (1943) estudiaron las necesidades nutritivas de especies de Salmonella en un medio sintético que contenía fosfato, aminoácidos y factores de crecimiento. Smiley, Niven y Sherman (1943) cultivaron *Streptococcus salivarius* en un medio químicamente definido, compuesto de sales inorgánicas, glucosa, tioglicolato sódico, aminoácidos y factores de crecimiento. Barker y Peterson (1944) comprobaron que el *Clostridium acidi-urici* se desarrolla en un medio que contiene sales inorgánicas, tioglicolato sódico y ácido úrico. Karlsson, Volcani y Barker (1948) cultivaron *Cl. aceticum* en un medio sintético con glucosa, ácido glutámico, biotina, piridoxamina y ácido pantoténico. Bornstein y Barker (1948) consiguieron cultivar *Cl. kluyveri* en un medio sintético compuesto de sales inorgánicas, etanol, acetato, biotina y ácido *p*-aminobenzoico. Boyd, Logan y Tytell (1948) comprobaron que un medio compuesto de aminoácidos, adenina, uracilo, vitaminas, sales, glucosa, fosfato atemperante y ácido ascórbico mantenía el desarrollo de *Cl. perfringens*. Scherp y Fitting (1949) cultivaron *Neisseria meningitidis* en un medio líquido que contenía solamente ácido glutámico, cistina y sales inorgáncas. Herbst y Snell (1949) lograron desarrollar *Hemophilus parainfluenzae* en un medio que contenía aminoácidos, varias vitaminas, cofermento I o II, putrescina, una pirimidina adecuada, glucosa y acetato sódico. Doetsch y Pelczar (1949) obtuvieron un buen desarrollo de *Microbacterium lacticum* en un medio compuesto de 18 aminoácidos y *d*-pantotenato cálcico. Youmans (1944) logró un cultivo subsuperficial de *Mycobacterium tuberculosis* en un medio sintético que contenía sales inorgánicas, asparagina y glicerina. Stokes y Larsen (1945) cultivaron *Acetobacter suboxidans* en un medio sintético compuesto de aminoácidos, glicerina, sales y factores de crecimiento. Éstos son unos pocos de los numerosos medios sintéticos descritos en la bibliografía.

Medios de cultivo no sintéticos. Los medios no sintéticos se componen de ingredientes de composición química ignorada; algunos son peptonas, extracto de carne de vaca, infusión de carne, sangre y suero. Es prácticamente imposible preparar dos lotes idénticos del mismo medio con diferentes cargas de los productos. Algunas de las bacterias más molestas no se desarrollan, o lo hacen muy débilmente, en medios de cultivo no sintéticos; pero esto constituye la excepción. Los medios de cultivo usuales son de este tipo.

Actualmente se sabe que la presencia de factores auxéticos o de crecimiento es absolutamente necesaria para el cultivo afortunado de la mayoría de las bacterias (pág. 275). Cuando un microorganismo no crece en un determinado medio, probablemente es porque faltan una o más de las substancias accesorias de crecimiento indispensables. Los medios de cultivo se eligen habitualmente por su capacidad de proporcionar resultados, más bien que por saberse qué contienen esas substancias. Parece muy probable que algunos medios dotados de ellas puedan emplearse con éxito para cultivar bacterias; hasta que se confirme así, el bacteriólogo continuará empleando muchas clases de medios nutritivos, cada uno de ellos más o menos específico para un fin determinado.

NECESIDADES NUTRITIVAS

Reservas de nitrógeno. Diversos estudios recientes han demostrado que muchas bacterias son capaces de utilizar sales amónicas como única reserva de nitrógeno; así sucede con las autotróficas, y probablemente con la mayoría de las heterotróficas, algunas de las cuales se desarrollan mal o no lo hacen en absoluto cuando su única provisión de nitrógeno consiste en sales amónicas. Estos microorganismos necesitan nitrógeno en forma de aminoácidos. Como se cree que la mayor parte de los aminoácidos contenidos en un medio de cultivo se desdoblan y desprenden amoníaco, los compuestos que proporcionan nitrógeno, lo mismo aminoácidos que sales inorgánicas de amonio, suelen ser de igual valor como reservas de nitrógeno inmediatamente disponibles.

Fildes, Gladstone y Knight (1933) señalaron que el aminoácido triptófano era necesario para cultivar *Salmonella typhosa*, y comprobaron que este germen puede extraer el nitrógeno que necesita de una mezcla

de aminoácidos que contenga triptófano, pero que generalmente los microorganismos no crecen cuando falta este aminoácido esencial. Algunas cepas de *S. typhosa* que al principio necesitan triptófano, pueden habituarse a medrar sin él. A su juicio, el triptófano es probablemente un factor esencial del protoplasma, y si los organismos no pueden sintetizarlo, ha de añadirse al medio de cultivo.

Fildes y Knight (1933) distribuían los microorganismos en tres grupos, a base de su acción frente al triptófano:

1.° Este grupo comprende los gérmenes que habitualmente no pueden desarrollarse cuando el medio no contiene triptófano; entre ellos se cuentan *Clostridium sporogenes, Cl. botulinum, Cl. tetani, Bacillus anthracis, Corynebacterium diphtheriae, Salmonella typhosa* y *Micrococcus pyogenes* var. *aureus.*

2.° En este grupo se incluyen los microorganismos que no requieren la presencia de triptófano en el medio de cultivo, entre ellos las bacterias autotróficas, especies de *Escherichia* y *Aerobacter, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella aertrycke* y *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis.* Estos gérmenes contienen triptófano en su protoplasma, y son capaces de sintetizarlo.

3.° Se hallan comprendidos en este grupo los microorganismos intermedios en cuanto a su necesidad de triptófano. No pueden sintetizarlo al sembrarlos primero en un medio que no lo contenga, pero sí habituarse a ello por eliminación gradual del producto. Entre estos gérmenes se cuentan *Salmonella typhosa, Corynebacterium diphtheriae, Micrococcus pyogenes* var. *aureus,* y probablemente *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis.*

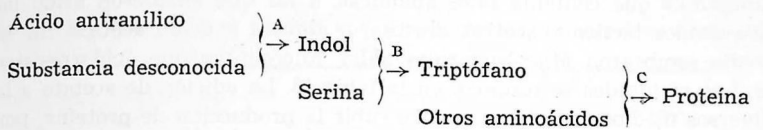
Curcho (1948) consiguió producir células mutantes de *S. typhosa* capaces de desarrollarse sin triptófano y de mantenerse independientes de este producto después de resiembras diarias durante más de un año.

Fildes (1940*a*) ensayó diversos productos afines al triptófano, por su propiedad de mantener el desarrollo de cepas de *S. typhosa* que necesitan este aminoácido; entre ellos se cuentan los ácidos indolacrílico, indolacético, indolpropiónico, indolcarboxílico e indolpirúvico, indoletilamina, indolaldehido, escatol e indol. Este último estimula el crecimiento del microorganismo, y como el ácido indolcarboxílico contiene indicios de indol en calidad de impureza, esto explica el ligero desarrollo conseguido en presencia del producto. Las otras substancias resultaron ser totalmente inactivas. Esta observación sugiere que el indol constituye una fase de la síntesis del triptófano por el bacilo tífico, según el esquema NH_3 o N amínico → indol → triptófano.

Si el esquema es correcto, sería posible encontrar un germen capaz de sintetizar triptófano al proporcionarle cualquiera de las fases antes mencionadas. Los resultados mostraron que algunas bacterias pueden sintetizar triptófano de uno de sus precursores, mientras que otras necesitan el aminoácido ya elaborado. Fildes saca la consecuencia de que el triptófano era sintetizado del amoníaco en fases, una de las cuales es indol u otra substancia muy afín. Si un organismo no medra, es por

su incapacidad de sintetizar triptófano. En una información posterior, este autor (1945) demostró la síntesis del indol por bacterias, y expuso que era una fase de la producción de triptófano, probablemente por condensación de indol con serina.

Rydon (1948), a base de ensayos experimentales, dedujo que la *S. typhosa* sintetiza ácido antranílico, y que éste precedía al indol en la biosíntesis del triptófano. A su juicio, el esquema se desarrolla así:



Véase más información en Clark (1949), Evans (1948), Riesen, Spengler, Robbles, Hankes y Elvehjem (1947), y Wood, Gunsalus y Umbreit (1947).

Empleo de productos carbonados. Como se ha expuesto en los párrafos iniciales de este capítulo, los requerimientos de carbono de los microorganismos varían considerablemente. Las bacterias autotróficas lo obtienen de dióxido de carbono o de carbonatos; las heterotróficas necesitan compuestos de carbono como factor de energía y para sintetizar células. Los compuestos de carbono disponibles para los gérmenes varían mucho de una especie a otra, lo cual explica probablemente la presencia de microorganismos en ambientes específicos.

Braun y Cahn-Bronner ensayaron numerosos compuestos carbonados, entre ellos ácidos acético, oxálico, láctico, succínico, málico, tartárico y cítrico, así como glicerina, glucosa y arabinosa; y descubrieron que la glucosa, la glicerina y los ácidos láctico y cítrico se consumen mucho más que los otros compuestos al ensayarlos con *Salmonella schottmuelleri, S. enteritidis* y *S. typhosa.* Siguen en importancia los ácidos acético y oxálico; el ácido fórmico, y probablemente el tartárico, no parecen servir como reservas de carbono. Desde el punto de vista de la disponibilidad, los aminoácidos son inferior a los ácidos orgánicos, los carbohidratos y la glicerina. Den Dooren de Jong (1926) ensayó unos doscientos cincuenta compuestos orgánicos como posibles reservas de carbono para una serie de microorganismos, añadiendo las substancias a un medio sintético de cultivo que contenía amoníaco en calidad de única reserva de nitrógeno. Sus conclusiones son similares a las de Braun y Cahn-Bronner, pues entiende que los carbohidratos y sus afines son los más utilizados; a continuación, los ácidos málico, cítrico, succínico y láctico, seguidos de los ácidos grasos, y, en último lugar, los alcoholes monohídricos o monovalentes.

Braun y Cahn-Bronner hallaron que el desarrollo anaerobio se anulaba totalmente al sembrar *S. schottmuelleri* en un medio orgánico que contenía lactato amónico y glucosa. Koser (1923) apreció lo mismo al

sembrar los miembros del grupo *Escherichia* y *Aerobacter* en medios que contenían diversos ácidos orgánicos como fuente de carbono. Consume ácido cítrico y sus sales el *Aerobacter aerogenes*, pero no la *Escherichia coli* (pág. 571).

Formación de lípidos. La producción de lípidos por bacterias depende de la naturaleza de los compuestos de carbono agregados a los medios de cultivo. Stephenson y Whetham (1922) emplearon un medio inorgánico que contenía sales amónicas, a las que añadieron ácido láctico, ácidos láctico y acético, glucosa, o glucosa y ácido acético. En ese medio sembraron *Mycobacterium phlei*, microorganismo ácidorresistente. Los resultados se resumen en la tabla 18. La adición de acetato a los diversos medios de cultivo no hizo subir la producción de proteína, pero sí la concentración de lípidos. Las concentraciones mayores de lactato y de glucosa aumentaron proteínas y lípidos, habitualmente las primeras. Un microorganismo que en condiciones normales sintetiza suficiente substancia lípida para hacerse ácidorresistente se puede volver sensible a los ácidos omitiendo en el medio de cultivo una reserva apropiada de carbono.

TABLA 18. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO SOBRE LA FORMACIÓN DE GRASA POR *Mycobacterium phlei*

Componentes orgánicos del medio	Período de máxima formación de lípidos, días	Miligramos en 100 c. c. de medio de cultivo		Relación lípidos/nitrógeno
		Nitrógeno sintetizado	Lípidos sintetizados	
0,68 % ácido láctico	10	19	16	0,84
1,4 % ácido láctico	11	26	20	0,78
1,2 % ácido láctico + 0,4 % ácido acético	7	20	35	1,78
1 % glucosa	12	18	28	1,6
1 % glucosa + 1 % ácido acético	21	18	42	2,34
1 % glucosa	15	15	19	1,3
2 % glucosa	15	34	21	0,62

Larson y Larson (1922) comprobaron que los organismos que fermentan glucosa o glicerina no pueden utilizar el compuesto para la síntesis de lípidos. Como la *Escherichia coli*, el *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* y el *Clostridium mucosum* fermentan glucosa, no sintetizan lípidos suplementarios. En cambio, los microorganismos que no fermentan glucosa o glicerina utilizan el material carbonado para sintetizar lípidos. *E. coli*, *M. pyogenes* var. *albus* y *Bacillus megatherium* no fermentan glicerina; estos microorganismos mostraron un señalado aumento de lípidos, tanto en caldo glucosado como en los nutritivos normales.

Geiger y Anderson (1939) inocularon con *Agrobacterium tumefaciens* dos medios sintéticos de cultivo, uno de los cuales contenía glicerina y el otro sacarosa. Los microorganismos desarrollados en el primero dieron sólo 2 % de lípidos totales, y los del segundo, 6 %. También era muy distinta la composición de los productos grasos sintetizados por los gérmenes de ambos medios (tabla 19).

TABLA 19. PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR *Agrobacterium tumefaciens* DESECADOS

	Medio 1.°, gramos	Medio 2.°, gramos
Cantidad de bacterias extractadas	364	276
Lípidos solubles en alcohol-éter	4,85	16,23
Lípidos solubles en cloroformo	2,46	0,63
Fosfátidos totales	3,21	10,90
Grasa total soluble en acetona	3,35	5,92
Substancia insoluble en éter	0,64	0,03

VITAMINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Probablemente fué Hopkins (1906) quien primero señaló que, en la nutrición humana, además de grasas, proteínas, carbohidratos, substancias minerales, agua y oxígeno, se necesitaban otros productos. Esta observación condujo al descubrimiento de las vitaminas de Funk (1912). Wildiers (1901) argüía que como la nutrición humana requería ciertos factores desconocidos entonces, en la de los hongos debía de suceder algo semejante. Utilizó un medio inorgánico con azúcar de caña y amoníaco, en calidad de reservas de carbono y nitrógeno, respectivamente, y halló que las células de levadura no se desarrollan a menos de resembrar cierto número de microorganismos en un medio nuevo. Una cantidad mayor llevaba más factores de crecimiento al segundo medio, y provocaba la reproducción. Añadiendo una suspensión hervida de levadura, se registraba el mismo efecto estimulante del desarrollo, en dosis pequeñas de siembra, que mediante adición de una emulsión de levadura viva. Wildiers dió al factor estimulante del desarrollo el nombre de «bios».

Sabemos ahora que el factor «bios» es una mezcla de varios de los miembros hidrosolubles del complejo vitamínico B, o sea tiamina (vitamina B_1), ácido pantoténico, piridoxina (vitamina B_6), biotina e inosita.

La expresión «factor de crecimiento» se emplea para describir cualquier compuesto que muestra un efecto estimulante sobre el desarrollo de un microorganismo, y con igual significado se utiliza el término

«vitamina». Sin embargo, puede establecerse una distinción a base de que las vitaminas se descubrieron investigando la nutrición de animales, mientras que los factores auxéticos o de crecimiento se identificaron estudiando en microorganismos. Williams (1941*a*) propuso el término «nutrilito» para cualquier substancia orgánica, prescindiendo de su naturaleza, que en cantidad minúscula tenga importancia para la nutrición de un organismo.

Se han estudiado numerosos factores de crecimiento y vitaminas, y ha sido posible sintetizar algunos. También se ha determinado su constitución química, sencilla en unos y compleja en otros.

Respuesta de las bacterias a los factores de crecimiento. El hecho de que un microorganismo se desarrolle sin que exista un factor particular de crecimiento en el medio de cultivo no significa necesariamente que no se necesite. Algunos gérmenes pueden sintetizar uno o más factores, y otros son incapaces de hacerlo; por consiguiente, es equivocado deducir que un microorganismo no requiere cierto factor porque falte éste en el medio en que se desarrollan las células.

O'Kane (1941) cultivó micrococos en un medio exento de riboflavina, y descubrió que esos gérmenes eran capaces de sintetizar el factor de crecimiento. Burkholder y McVeigh (1942) demostraron que ciertas especies intestinales podían sintetizar varias vitaminas del complejo B. Los actinomicetos, según comprobaron Herrick y Alexopoulos (1943), sintetizan tiamina; y Miller (1944) averiguó que la *Escherichia coli* produce, mediante síntesis, ácido fólico.

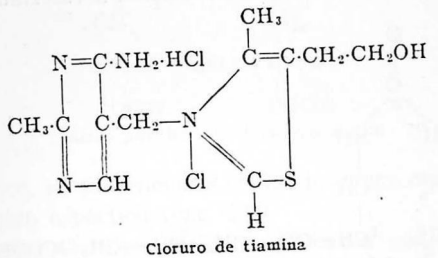
Algunas bacterias pueden habituarse a prescindir de ciertas vitaminas, por medio de resiembras repetidas en medios nuevos. Por ejemplo, es posible adaptar cepas de *Propionibacterium* al desarrollo sin riboflavina ni tiamina. Koser y Wright (1943) han aislado variedades de bacilos disentéricos capaces de desarrollarse sin añadir nicotinamida al medio de cultivo.

VITAMINAS QUE NECESITAN LAS BACTERIAS

Los factores que más frecuentemente se citan como estimulantes del crecimiento de bacterias comprenden tiamina, biotina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina y ácido *p*-aminobenzoico. Además, se ha visto que diversos compuestos son indispensables para algunas bacterias, aunque no para todas; entre ellos figuran ácido fólico, inosita, codehidrogenasas I y II, ácido pimélico, alanina β, glutamina, purinas, pirimidinas, glutatión, hematina, nicotinamida, betaína y nucleótidos de piridina.

Cloruro de tiamina (vitamina B_1). Este factor es probablemente necesario para el crecimiento de todas las bacterias (fig. 123). Varios

microorganismos han resultado ser capaces de sintetizarlos. Químicamente es un pirimidintiazol, con la siguiente fórmula de estructura:



Cloruro de tiamina

El éster pirofosfórico (pirofosfato de tiamina) se conoce por cocarboxilasa (pág. 366); participa en todas las descarboxilaciones que llevan a la formación de aldehidos y de dióxido de carbono. Se ha comprobado

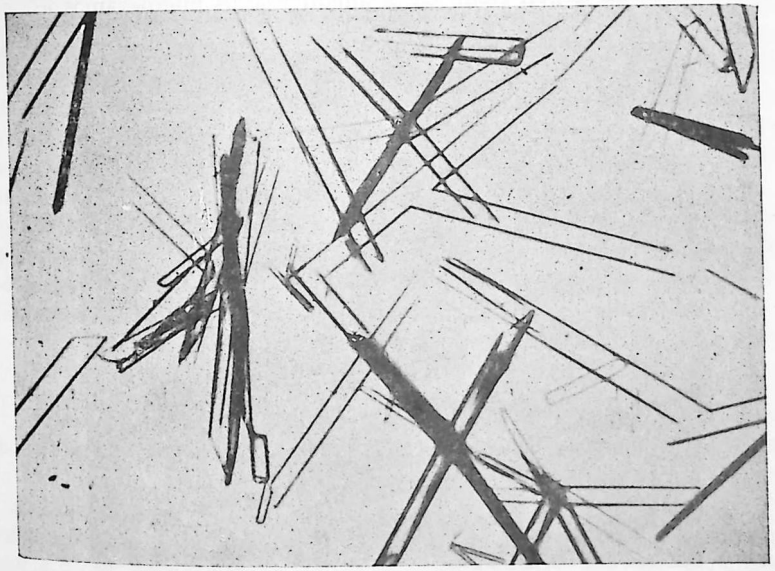
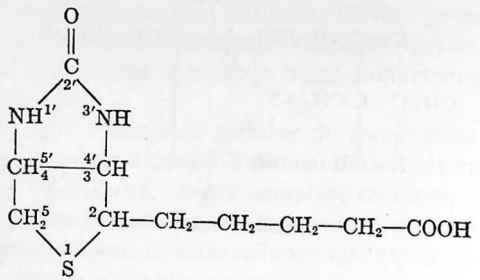


Fig. 123
Cristales de cloruro de tiamina. (Con licencia de Merk & Company, Inc.)

que la cocarboxilasa puede reemplazar a la vitamina B_1 en la nutrición de las levaduras. Es probable que esta vitamina le sirva de precursor.

Biotina. Este factor de crecimiento fué primeramente aislado por Kögl (1935), y es idéntico a la vitamina H. Se ha logrado cristalizar como biotina pura y en forma de éster metílico de biotina (fig. 124).

Du Vigneaud, Melville, Folkers, Wolf, Mozingo, Keresztesy y Harris (1942) estudiaron la estructura del compuesto, y hallaron que era ácido 2'-ceto-3,4-imidazolido-2-tetrahidrotiofen-*n*-valeriánico:



Biotina

La biotina, en cantidades sumamente pequeñas, estimula el desarrollo de levaduras. Según Kögl, basta añadir 0,00004 microgramos a 2 c.c.

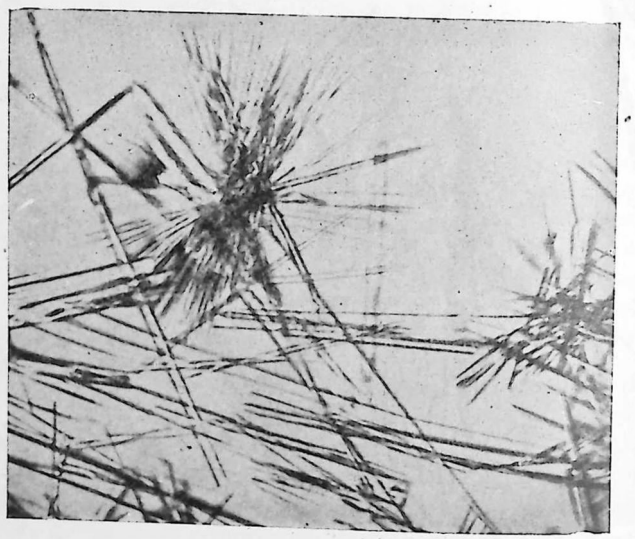
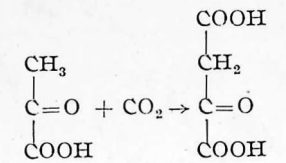


Fig. 124
Ester metílico de biotina. (Con licencia de S. M. A. División Wyeth Inc.)

de cultivo para conseguir un crecimiento 100 % mayor, lo que equivale a 1 parte en 50.000 millones de partes del medio. Asimismo es necesaria para el crecimiento de bacterias y mohos.

No se conoce aún definitivamente la función exacta de la biotina en el metabolismo. Shive y Rogers (1947) suponían que actuaba como

cofermento en la carboxilación del ácido pirúvico a ácido oxalacético:



Ácido pirúvico Ácido oxalacético

El ácido oxalacético, en presencia de ácido glutámico o de alanina, puede convertirse en ácido aspártico (pág. 323).

Stokes, Larsen y Gunnes (1947) comprobaron que la biotina puede ser substituída por ácido aspártico en el desarrollo de diversas bacterias, y dedujeron de ello que participa en la síntesis del referido ácido.

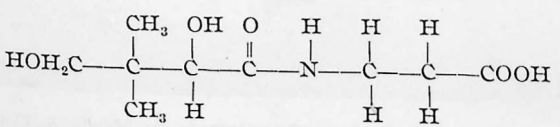
Delwiche (1950) afirma que la biotina guarda estrecha relación con la descarboxilación del ácido succínico a ácido propiónico por el *Propionibacterium pentosaceum.*

Lichstein (1950) ha aislado un cofermento de extracto de levadura, que contenía una substancia estable a los ácidos y capaz de reemplazar a la biotina como estimulante del desarrollo del *Saccharomyces cerevisiae.* En su opinión, esa substancia era un derivado de la biotina, tal vez intermedio en la síntesis del cofermento a partir de la misma. El cofermento interviene en los sistemas descarboxilasa oxalacética y descarboxilasa succínica.

Carlson y Whiteside-Carlson (1949) comprobaron que el *Leuconostoc* no necesita biotina para utilizar sacarosa, pero que la vitamina era indispensable para su desarrollo al añadir al medio los componentes monosacáridos.

Para más información, véanse Wright, Cresson y Skeggs.

Ácido pantoténico. Williams y Bradway (1931) fueron los primeros en señalar que la nutrición de las levaduras (fig. 125) requiere un factor de crecimiento, al que ellos dieron el nombre de ácido pantoténico. Posteriormente, Williams, Lyman, Goodyear, Truesdail y Holaday (1933) comunicaron que el ácido pantoténico es un factor auxético de importancia biológica universal, y se halla presente en bacterias, levaduras, mohos, algas, protozoos, plantas y animales. Se ha demostrado que consiste en una combinación peptídea de la alanina β con un hidroxiácido saturado, según la siguiente fórmula:



Ácido pantoténico

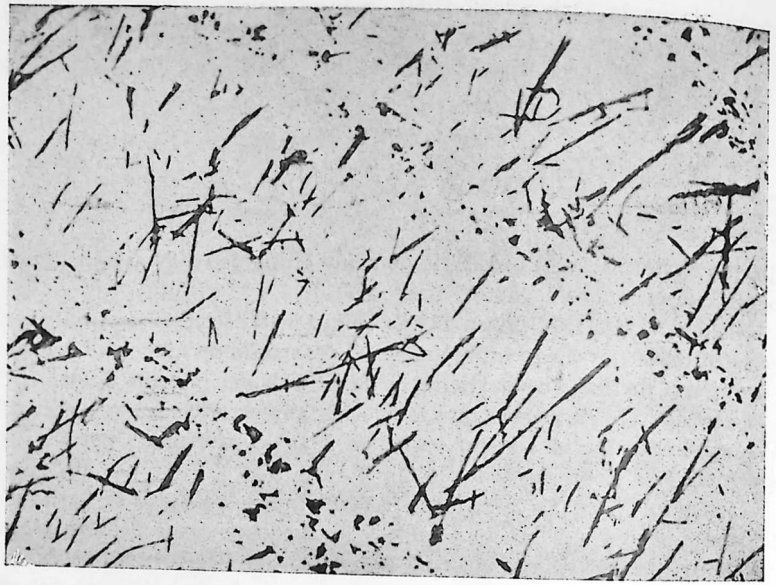


Fig. 125
Cristales de ácido pantoténico. (Con licencia de Merck & Company, Inc.)

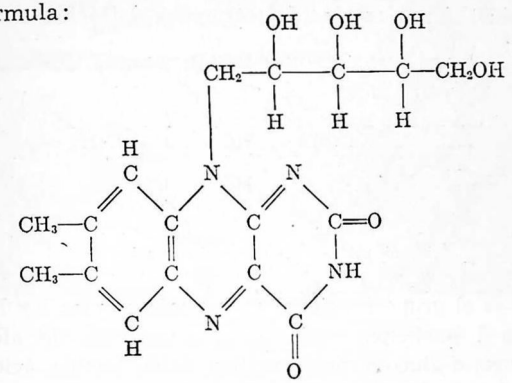


Fig. 126. — Cristales de riboflavina. (Con licencia de Merck & Company, Inc.)

El ácido pantoténico es un componente del cofermento A; actúa en la acetilación de aminas aromáticas y de colina; está relacionado con el aprovechamiento de otras vitaminas, especialmente de la riboflavina.

Véase más información en Kersey y Porter (1948), y Rowatt (1948).

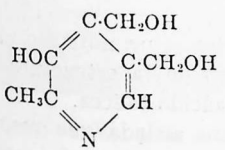
Riboflavina. Este factor se ha estudiado ampliamente, y resulta ser necesario para el desarrollo de numerosos microorganismos (fig. 126). A veces se designa por vitamina B_2, vitamina G, lactoflavina y ovoflavina. Químicamente es una *d*-ribosa derivada de la isoaloxacina, con la siguiente fórmula:



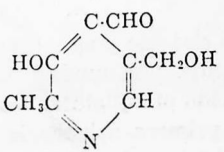
d-riboflavina

La riboflavina desempeña una función importante en muchos sistemas enzimáticos. Forma parte de varios fermentos calificados de «amarillos», entre los cuales se encuentran la «enzima amarilla antigua» de Warburg y Christian (pág. 333), la oxidasa de *d*-aminoácidos (pág. 366), la diaforasa (pág. 365), la deshidrogenasa de la xantina (pág. 329), la reductasa del citocromo c, la deshidrogenasa succínica, etc.

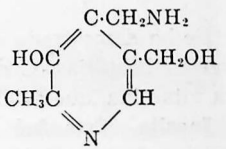
Piridoxina. Este factor de crecimiento se llama a veces vitamina B_6, y la reconoció el primero como vitamina György, en 1935. Keresztesy y Steven (1938), y Lepkovsky (1938), por separado, aislaron la vitamina en cristales (fig. 127); Harris y Folkers (1939) lograron sintetizarla, e indicaron que es 2-metil-3-hidroxi-4,5-di(hidroximetil)-piridina. Se ha demostrado su presencia en la estructura de un cofermento. El grupo de la vitamina B_6 consta de tres miembros, que son piridoxina, piridoxal y piridoxamina:



Piridoxina



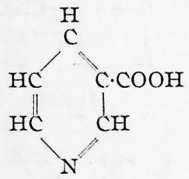
Piridoxal



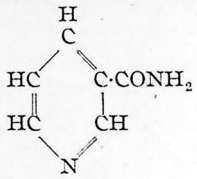
Piridoxamina

Los microorganismos que los consumen hacen de estos cuerpos descarboxilasas de aminoácidos. El piridoxal puede pasar por fosforilación al cofermento que, combinado con proteína (apofermento), cataliza la descarboxilación de aminoácidos tales como tirosina, lisina, arginina, ornitina y ácido glutámico. Se ha dicho también que el fosfato de piridoxal funciona como transaminasa de glutamatos-aspartatos.

Ácido nicotínico (niacina) y nicotinamida (niacinamida). El ácido nicotínico se preparó por primera vez en 1867, pero su importancia para la nutrición no se reconoció hasta 1937, por Elvehjem, Madden, Strong y Woolley (fig. 128). Las fórmulas de estructura del ácido nicotínico y de su amida son:



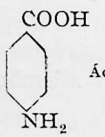
Ácido nicotínico



Nicotinamida

La amida es el grupo funcional de los cofermentos I y II (pág. 363). El cofermento I participa en la deshidrogenación de alcohol, ácido β-hidroxibutírico, *d*-glucosa, ácido málico, ácido láctico, ácido α-glicerofosfórico y aldehido 3-fosfoglicérico. El cofermento II se necesita para deshidrogenar *d*-glucosa, 6-fosfato de hexosa, ácido succínico y ácido α-glicerofosfórico (págs. 331 y siguientes).

Ácido p-aminobenzoico. Woods (1940) y Fildes (1940*b*) descubrieron que la sulfanilamida compite con el ácido *p*-aminobenzoico (PAB) en calidad de enzima, influyendo así en alguna reacción metabólica esencial. Landy, Larkum, Oswald y Streightoff (1943) comprobaron que cepas de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* resistentes a las sulfamidas producían PAB en mayor cantidad que sus progenitoras; esa cantidad mayor parecía suficiente para explicar su resistencia a tales productos. Este ácido tiene la siguiente fórmula de constitución:



Ácido *p*-aminobenzoico

Se ha demostrado que el ácido *p*-aminobenzoico es un nutrilito para diversas bacterias. Constituye una unidad dentro de la estructura de otra vitamina, que es el ácido pteroilglutámico o «ácido fólico».

Inosita. Ésta fué la primera substancia pura aislada que resultó partícipe de la actividad del bios. La aisló primero en estado de pureza

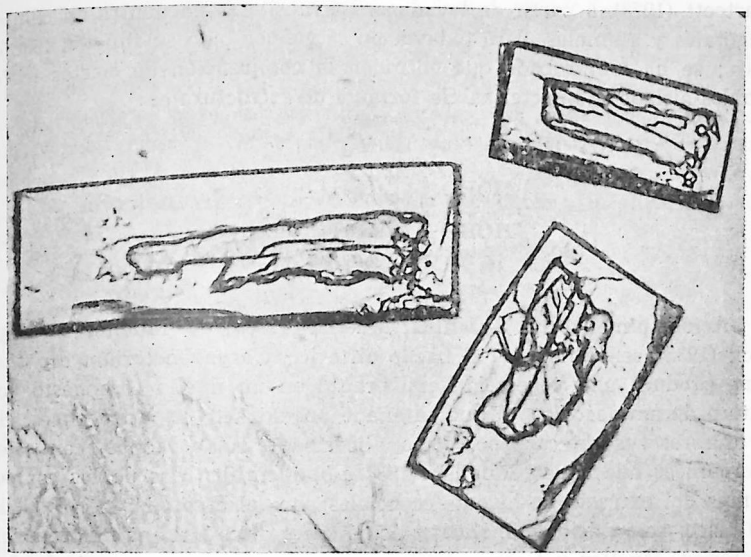


Fig. 127. — Cristales de piridoxina. (Con licencia de Merck & Company, Inc.)

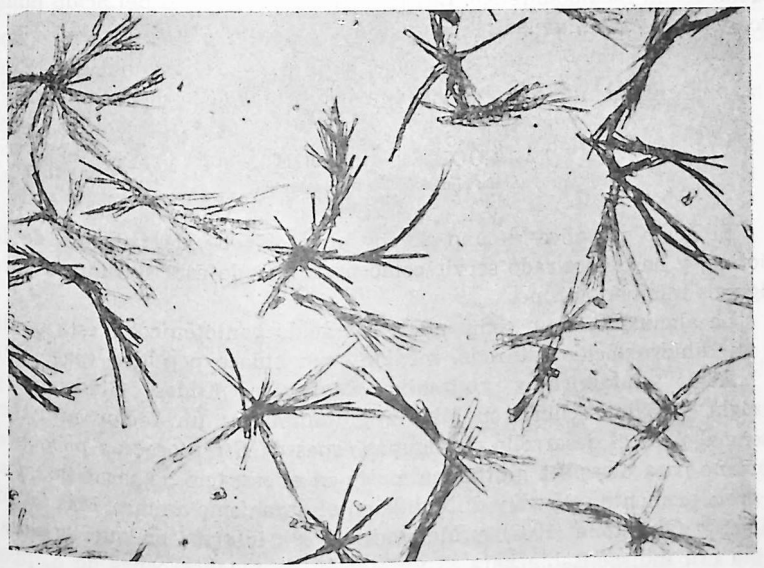
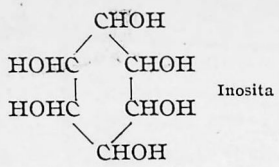


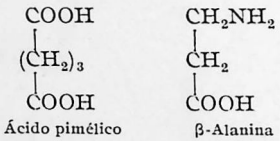
Fig. 128. — Cristales de ácido nicotínico. (Con licencia de Merck & Company, Inc.)

Eastcott (1928), a partir de levadura. La inosita se encuentra en células vegetales y animales, pero todavía no se conoce bien su función fisiológica; se ha comprobado que entra en la composición de ciertos fosfolípidos aislados de bacterias. Su fórmula de estructura es:



Inosita

Ácido pimélico y β-alanina. Mueller (1935), y Mueller y Kapnick (1935), señalaron que el bacilo diftérico, *Corynebacterium diphtheriae*, produce una vegetación exuberante en un medio compuesto por entero de aminoácidos, al que se añade un extracto hepático purificado y una reserva de carbono, como glicerina o ácido láctico, con sales inorgánicas adecuadas. Mueller (1937 *a-b*) identificó dos de los componentes del extracto de hígado, esenciales para el crecimiento del bacilo diftérico, como ácido pimélico y ácido nicotínico. En una información posterior, Mueller y Cohen (1937) comunicaron haber comprobado que la β-alanina es una tercera substancia auxética existente en el extracto de hígado y que determina el desarrollo superabundante del citado bacilo en un medio sintético. Las fórmulas estructurales del ácido pimélico y de la β-alanina son:



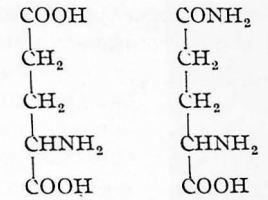
Ácido pimélico β-Alanina

El ácido pimélico es uno de los productos de degradación de la biotina, y ha demostrado servir como precursor de esta substancia para algunos microorganismos.

La alanina β es un componente del ácido pantoténico, y está unida a un dihidroxiácido saturado, mediante un enlace peptídeo (pág. 279).

Ácido glutámico y glutamina. McIlwain, Fildes, Gladstone y Knight (1939) descubrieron que la glutamina es un factor nutritivo esencial para el desarrollo de algunas cepas de *Streptococcus pyogenes*, pero no para otras. La glutamina existe en el extracto de carne de vaca, y probablemente está muy difundida en el organismo animal. Más tarde, Fildes y Gladstone (1939), y McIlwain (1939), informaron que la glutamina era indispensable para la vegetación de muchas cepas de *S. pyogenes* y otras especies bacterianas. Pollack y Lindner (1942) hicieron saber que nueve especies de bacterias productoras de ácido láctico necesitaban glutamina o ácido glutámico para desarrollarse; y suponían que estas substancias les hacían falta para construir proteínas celulares, dado que la demanda de estos aminoácidos es del orden de magnitud que podía esperarse para tal función. Lankford y Snell (1943) hallaron que ciertas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* requerían glutamina para medrar. El ácido glutámico forma parte del ácido fólico, otra vitamina.

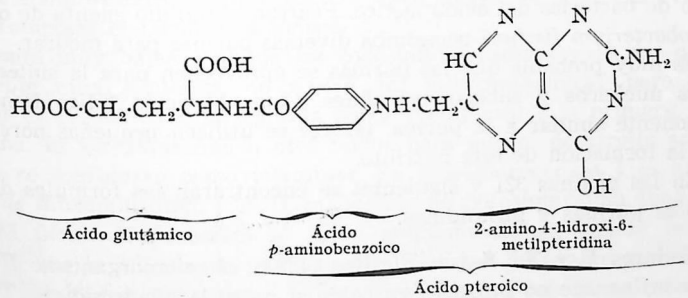
Las fórmulas de estructura del ácido glutámico y la glutamina son las siguientes:



Ácido *l*-glutámico *l*-glutamina

Ácido fólico. Snell y Peterson (1939, 1940) comprobaron que el *Lactobacillus casei* necesitaba una substancia auxética hasta entonces desconocida, que ellos llamaron factor eluato del germen. En él advirtieron muchas propiedades de las purinas. Stokstad (1941) descubrió en una mezcla de guanina y timina alguna de las propiedades favorecedoras del desarrollo encontradas en el referido factor. Éste, concentrado por Mitchell, Snell y Williams (1941) en un estado casi puro, recibió de ellos el nombre de «ácido fólico».

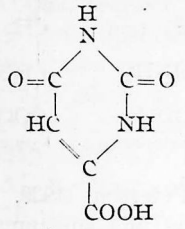
Químicamente, el ácido fólico es ácido pteroilglutámico, con esta fórmula de estructura:



El ácido *p*-aminobenzoico y el glutámico son componentes del ácido fólico. El primero es necesario para que las bacterias sinteticen proteínas; del ácido fólico se supone que funciona en calidad de cofermento, a fin de proporcionar más carbono al anillo de pirimidina para la síntesis de purina.

Más información se encontrará en Oginsky y otros (1951).

Purinas y pirimidinas. Richardson (1936) descubrió que el uracilo era necesario para el desarrollo de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. Snell y Mitchell (1941) comunicaron que hacía falta uracilo para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, timina para el de *Streptococcus lactis*, y adenina para el de *L. plantarum*. Shull, Hitchings y Peterson (1942), como Pollack y Linder (1942), comprobaron que el desarrollo de *L. casei* requería adenina, guanina, uracilo y xantina. Hutner (1944) y Rogers (1944) informaron de la necesidad de uracilo para la *Shigella paradysenteriae* y el *Streptococcus pyogenes*, respectivamente. Chattaway (1944) señaló que el ácido orótico



Ácido orótico
(ácido uracil-4-carboxílico)

estimulaba la proliferación de *L. casei*. Hitchings, Falco y Sherwood (1945) hallaron que la timina podía reemplazar al ácido fólico en la nutrición del mismo germen. Wieland y otros (1950) dieron a conocer que el *L. bulgaricus* necesitaba ácido orótico. Snell, Kitay y McNutt (1948), Wright, Skeggs y Huff (1948), y Kitay, McNutt y Snell (1950), comprobaron que los desoxirribósidos estimulaban el desarrollo de bacterias del ácido láctico. Pearson (1949) dió cuenta de que el *Photobacterium fischeri* necesitaba diversas purinas para medrar.

Es muy probable que las purinas se aprovechen para la síntesis de ácidos nucleicos y substancias afines. Como el ácido fólico tiene un componente similar a la purina, tal vez se utilicen pequeñas porciones para la formación de este nutrilito.

En las páginas 321 y siguientes se encontrarán las fórmulas de las distintas purinas y pirimidinas.

Factores V y X. Según Pfeiffer (1893), el microorganismo *Hemophilus influenzae* no prospera en caldo si no se le añade sangre. Thjötta (1921), Thjötta y Avery (1921 *a-b*), y Fildes (1921, 1922), hallaron que este mismo microbio necesita la presencia de dos factores, que ellos llamaron factores *V* y *X*, ambos contenidos en la sangre. El primero existe también en muchos extractos vegetales y en numerosas bacterias; es termolábil, pues se destruye a 90° C en quince minutos, y muy sensible a los álcalis, pero no a los ácidos; atraviesa membranas de pergamino, y el oxígeno atmosférico no lo destruye fácilmente. El factor *X* se encuentra en patatas y en algunas bacterias; es termostable, ya que resiste durante 45 minutos una temperatura de 120° C.

El *Hemophilus influenzae* no puede desarrollarse en un medio que sólo contenga el factor *X*; sin embargo, lo hace en asociación con un microorganismo como el *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, capaz de producir el factor *V*. La disposición característica de las colonias de *H. influenzae* en tal sociedad se cita a veces como fenómeno de los satélites, porque a modo de tales crecen los gérmenes hemofílicos en colonias aisladas, a alguna distancia de las *M. pyogenes* var. *aureus*.

Lankford, Scott, Cox y Cooke (1943) observaron el mismo fenómeno en placas de agar con estrías de una mezcla de *Micrococcus* y *Neisseiria gonorrhoeae* sin teñir (figura 129).

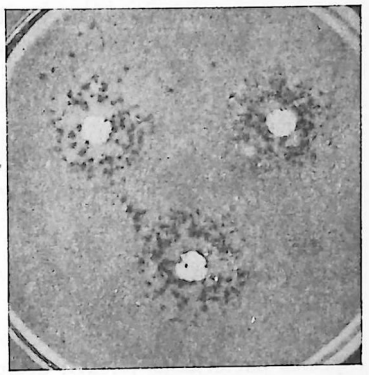


Fig. 129
Colonias satélites de *Neisseria gonorrhoeae*. En la placa se trazaron estrías de este germen y picaduras de un *Micrococcus*; las colonias del primero se desarrollaron como satélites a alguna distancia de las del segundo con ayuda de dimetil-parefenilen-diamina. (Según Lankford, Scott, Cox y Cooke.)

El organismo *H. parainfluenzae* requiere sólo el factor *V* para desarrollarse. Lwoff y Lwoff (1937*a*, *b*) aislaron de levaduras este factor, y añadieron el extracto a un cultivo del microbio; observaron que su actividad guarda relación con la concentración de codeshidrogenasa I en el propio extracto de levadura, y se ha comprobado que tal substancia reemplaza el factor *V* a concentraciones muy bajas. Aunque las codeshidrogenasas I y II son químicamente muy similares, no suelen ser intercambiables; pero como factor de crecimiento, la segunda puede reemplazar a la primera. Dado que ha de agregarse uno u otro factor para que el desarrollo sea posible, se consideran como vitaminas. La codeshidrogenasa I es nucleótido de difosfopiridina, y la II, nucleótido de trifosfopiridina (pág. 363).

El factor *X* necesario se suple ampliamente agregando hemina. Puesto que la adición de una pequeña cantidad de sangre aumenta la actividad del microorganismo, es muy probable que intervengan también otros factores.

Para más información, véanse Atkin (1949), Gingrich y Schlenk (1944), Herbst y Snell (1949), Hoagland, Ward, Gilder y Shank (1942).

Glutatión. Según Gould (1944), el glutatión es necesario para el desarrollo de *Neisseria gonorrhoeae*. Este factor se encontró en infusiones de carne o de levadura, y en extracto de hematíes. Las cepas de

este germen recién aisladas no parecían necesitarlo, pero mostraban tendencia a ello pocas semanas después de resiembra en un medio que contenía infusión de carne.

Las funciones del glutatión son varias: 1.ª, sirve de portador de hidrógeno; 2.ª, evita la inactivación de grupos sulfhidrilo de enzimas, y 3.ª, al parecer, mantiene el ácido ascórbico en su forma reducida.

La fórmula de estructura del glutatión se expone en la página 367.

Efecto del pH sobre la necesidad de factores de crecimiento. Doede (1945) ha comprobado que el pH del medio de cultivo ejerce señalada influencia sobre la cantidad de factor de crecimiento requerida para el desarrollo de diversas especies bacterianas. El ácido nicotínico consumido por el *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* para su desarrollo máximo con pH 8 era unas quince veces más que con pH 6; la *Shigella paradysenteriae* necesitaba ácido nicotínico en un medio de pH 7 u 8, pero no en uno de pH 6, donde los gérmenes eran capaces de sintetizar el factor auxético. El *Lactobacillus casei* medra en un medio sin piridoxina, con pH 5, pero no con pH 6 ó 7, a menos de añadir el factor. Los más eficaces con pH 6 resultan ser ácido fólico, riboflavina, biotina, ácido nicotínico y ácido pantoténico.

Destrucción de vitaminas por bacterias. Se ha visto que diversas especies bacterianas pueden destruir los factores de crecimiento. Según Young y Rettger (1943), la vitamina C (ácido ascórbico) era fácilmente destruída por las bacterias entéricas, incluídos los estreptococos intestinales. La presencia de un carbohidrato de fácil fermentación, como glucosa, preserva la vitamina de descomposición; pero cuando faltan antagonistas desciende en seguida la concentración de ácido ascórbico en el medio.

Foster (1944*a*, *b*) señaló que el microorganismo *Pseudomonas riboflavinus* era capaz de transformar por oxidación riboflavina en lumicromo, según la reacción

$$\underset{\text{Riboflavina}}{C_{17}H_0O_6N_4} + 5\,{}^1\!/_2\,O_3 \rightarrow \underset{\text{Lumicromo}}{C_{12}H_{10}O_2N_4} + 5\,CO_2 + 5\,H_2O$$

Esta reacción es, en substancia, una oxidación de la cadena del lado ribitílico de la molécula de riboflavina, y deja intacta la estructura anular (pág. 281). Koser y Baird (1944) dieron cuenta de la destrucción de ácido nicotínico por bacterias de los grupos *P. fluorescens* y *Serratia marcescens*, durante períodos de activa proliferación celular. Nichol y Michaelis (1947) revisaron estos resultados y señalaron que la destrucción de la vitamina era una oxidación fermentativa. Metzger (1947) puso de manifiesto que algunos miembros del género *Pseudomonas* pueden utilizar ácido pantoténico como factor de crecimiento; sin embargo, durante su desarrollo, estos gérmenes destruyen 100 % de la vitamina en 72 horas, por un proceso de oxidación.

Síntesis de vitaminas por bacterias. Meyer y Rodbart (1946) han informado acerca de la síntesis de riboflavina por *Mycobacterium smegmatis* en un medio sintético de cultivo. Así lo confirman Smith y Emmart (1949) respecto a los bacilos tuberculosos. Tanner, Vojnobich y Van Lanen (1949) emplearon un medio orgánico, y dieron cuenta de que la *Ashbya gossypii* sintetizaba riboflavina.

Contenido vitamínico de ingredientes en medios de cultivo. Los datos sobre concentración de vitaminas en los componentes de medios de cultivo serán de interés y utilidad para el cultivo de microorganismos, y por ellos puede decidirse si un medio determinado satisface las necesidades de factor auxético de un germen.

Stokes, Gunnes y Foster (1944) analizaron varios medios de cultivo para determinar su contenido en ocho miembros del complejo B: tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, piridoxina, ácido fólico y ácido *p*-aminobenzoico, y compararon los resultados con el consumo de vitaminas de varios microorganismos incapaces de sintetizar esos factores. Dispusieron los diversos componentes de los medios nutritivos en orden decreciente de su contenido en vitaminas del complejo B, y obtuvieron la clasificación siguiente:

1. Extracto de levadura.
2. Extracto de carne, infusión de sesos, infusión de corazón.
3. Peptonas diversas.

Con la posible excepción de tiamina, el extracto de levadura es una excelente reserva de todas las vitaminas del complejo B; así se explica que este extracto se utilice tanto en la preparación de medios de cultivo.

En opinión de Stokes, Gunness y Foster, si se emplean peptona, extracto de carne, etc., por separado o en combinaciones al 1 o al 2 %, es probable que los medios resultantes estén escasos en tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina y ácido *p*-aminobenzoico, pero no en ácido nicotínico, biotina o ácido fólico; y creen que tales deficiencias en factores de crecimiento se pueden corregir combinando bien los ingredientes o agregando concentrados de levadura o vitaminas sintéticas.

Véase más información acerca de factores de crecimiento en Mueller (1940), Williams (1941b), y Peterson y Peterson (1945).

Antimetabolitos. Un metabolito se puede definir como cualquier substancia esencial para el crecimiento y la reproducción de células, que pueden sintetizarla u obtenerla del ambiente. Su antagonista (antimetabolito) es cualquier substancia que interrumpa o estorbe (inhiba) la función normal del metabolito; los mejores ejemplos de antimetabolitos comprenden substancias afines al substrato por su constitución.

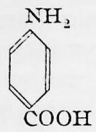
Inhibición de la deshidrogenasa succínica. Al fermento deshidrogenasa succínica se opone el ácido malónico:

$COOH{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$ — Ácido malónico

$COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$ — Ácido succínico

El ácido malónico dibásico homólogo parece refrenar la enzima, compitiendo con el ácido succínico, metabolito normal. La inhibición antagónica entre los dos compuestos se traduce en una interrupción casi total de la reacción enzimática.

Inhibición del ácido p-aminobenzoico. La estrecha relación estructural entre el ácido *p*-aminobenzoico y la sulfanilamida se aprecia por las siguientes fórmulas:



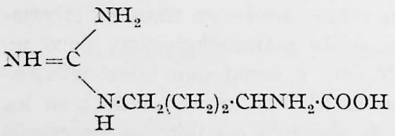
Ácido *p*-aminobenzoico



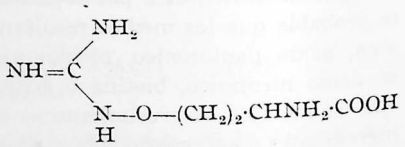
Sulfanilamida

Woods (1940) señaló que el ácido *p*-aminobenzoico (PAB), a grandes diluciones, contrarrestaba la acción de la sulfanilamida. Fildes hizo saber que el PAB es un metabolito esencial, normalmente asociado a una enzima; la sulfanilamida desaloja el PAB de su enzima, y detiene así esta línea vital de metabolismo. Otras sulfamidas obran de manera análoga.

Inhibición de la arginina. Según Volcani y Snell (1948), la arginina es un metabolito indispensable para el desarrollo de ciertas especies de bacterias lácticas; ninguna de ellas podía consumir canavanina en vez de arginina:



Arginina



Canavanina

Con algunas de las bacterias ensayadas, la canavanina funciona como un verdadero auxostático o inhibidor del desarrollo, tanto en caso de microorganismos que sinteticen arginina como en el de los que necesiten este aminoácido ya formado.

Para más información sobre antimetabolitos, véanse Dreizen, Scholz y Spies (1948), Grossowicz (1948), Knight (1946, 1949), Roblin, Jr. (1949), Toennies, Winegard y Gallant (1950), Wastburn y Niven, Jr. (1948) y Woolley (1952).

FASES DE DESARROLLO EN UN CULTIVO

La mayoría de las bacterias se reproducen con gran rapidez y ocasionan notables cambios en medios de cultivo al cabo de muy poco tiempo. En condiciones favorables, una célula de *E. coli* se convierte en dos cada veinte minutos, poco más o menos; si este ritmo se mantiene constante, un solo germen producirá mil millones de células nuevas

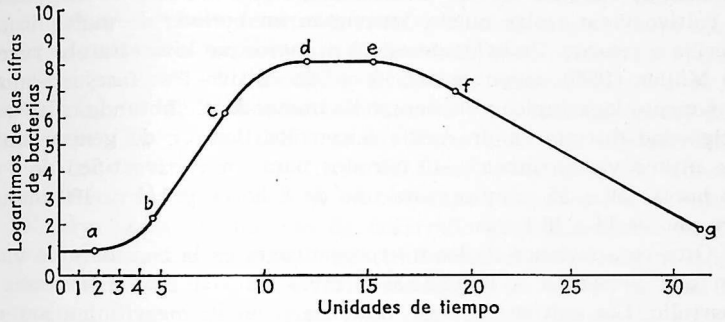


Fig. 130. — Fases de desarrollo en un cultivo. (Según Buchanan.)

en unas diez horas. Sin embargo, no sucede así, porque se agotan las substancias nutritivas, se acumulan residuos tóxicos del metabolismo y muchas bacterias sucumben en proporción cada vez mayor a medida que el cultivo envejece. Mueren primero las células más vulnerables, y quedan en el cultivo las formas resistentes, al final del período de incubación.

Cuando se siembra un germen en un tubo con caldo u otro medio nutritivo, la reproducción no se produce de un modo regular; antes bien se distinguen varias fases en la vida de un cultivo. Buchanan (1918) reconoció siete, y las designó como sigue:

1.ª *Fase estacionaria inicial.* Durante esta fase permanece constante el número de bacterias. La gráfica da una línea horizontal (1*a*) en la figura 130.

2.ª *Fase dilatoria o de aceleración positiva.* En el curso de esta fase, la rapidez de multiplicación aumenta con el tiempo (*ab*).

3.ª *Fase logarítmica de desarrollo.* En esta fase, el ritmo de multiplicación se mantiene constante (*bc*); el tiempo de generación es el mismo siempre.

4.ª *Fase de aceleración negativa.* Desciende la rapidez de multiplicación (*cd*), y aumenta el lapso medio de generación. Sigue creciendo el número de gérmenes, pero más despacio que en la fase logarítmica de desarrollo.

5.ª *Fase estacionaria máxima.* El número de microorganismos vivos permanece constante, es decir, son iguales los índices de mortalidad y de reproducción (*de*).

6.ª *Fase letal acelerada.* El número de gérmenes disminuye con creciente rapidez (*ef*), y alcanza su máximo el promedio de muertes por microorganismo.

7.ª *Fase letal logarítmica.* Durante esta fase, el índice de mortalidad es constante.

En general, se cree que las fases de un cultivo bacteriano obedecen a cambios de ambiente, como alteración del pH, agotamiento de substancias nutritivas y acumulaciones de productos de desecho.

Período dilatorio o de aceleración positiva. Al pasar las bacterias de un cultivo viejo a otro nuevo, atraviesan un período de multiplicación diferida o retardo. Probablemente, el primero que hizo esta observación fué Müller (1895), quien reconoció en un cultivo tres fases: dilatoria, de aumento logarítmico y de desarrollo atenuado. Sembrando cultivos de antigüedad distinta en un medio nuevo, los tiempos de generación en este último varían mucho: 40 minutos para un cultivo tífico de 2 1/2 a 3 horas; 80 a 85 minutos para uno de 6 horas y 1/4, y 160 minutos para uno de 14 a 16 horas.

Otra característica de los microorganismos es la considerable variación que presentan a influencias nocivas en sus diferentes fases de desarrollo. Los cultivos en fase dilatoria o en la logarítmica son más sensibles al calor que en las subsiguientes. Schultz y Ritz (1910) informaron que un cultivo de veinte minutos de *E. coli* resistía más el calor que otro de cuatro horas, y que la resistencia aumentaba de modo constante con el tiempo. Sherman y Albus (1923) expusieron *E. coli* a diversas condiciones desfavorables, y hallaron que las células viejas son mucho más resistentes que las jóvenes. Según Hegarty y Weeks (1940), las células jóvenes de un cultivo de *E. coli* son más propensas que las viejas al shock por frío, y las segundas no se alteran enfriándolas bruscamente ni manteniéndolas largo tiempo a 0° C; a su juicio, la sensibilidad de las células jóvenes al frío se relaciona en cierto modo con la división celular y los cambios en el interior de cada una.

Si en un tubo con medio nutritivo fresco se siembran gérmenes de su cultivo en la fase logarítmica de desarrollo (*bc*, fig. 130), la fase dilatoria se reduce notablemente, o queda anulada en muchos casos. En la citada fase logarítmica, los microorganismos se reproducen a velocidad máxima, y así continúan cuando se llevan a un medio nuevo. Buchanan (1928) suponía que el traslado desde un cultivo bacteriano en cualquier fase a un medio distinto sigue la continuación de esa misma fase, sin que recomience el ciclo de desarrollo.

Factores que afectan al tamaño de las células. Durante la fase dilatoria, las células aumentan notablemente de tamaño, según Henrici (1928), quien comprobó que la longitud media del *Bacillus megatherium* era seis veces mayor que la de los gérmenes tomados de un cultivo viejo. Este aumento se manifiesta generalmente a las dos horas, y las dimensiones máximas aparecen entre las cuatro y las seis horas. Durante la fase dilatoria, la forma de las células varía mucho, y, al pasar de ella a la logarítmica de muerte, disminuye poco a poco y se hace más constante.

Es sabido que cuando un cultivo inicial se resiembra en un medio nuevo aumenta primero lentamente el número de bacterias. Hershey (1939) demostró de modo palmario que este ritmo lento de reproducción no se puede interpretar como indicio de un período dilatorio, en el sentido de menor viabilidad y actividad. Lo que sucede realmente es que disminuye el ritmo de reproducción, pero cada célula se hace mayor, lo cual se traduce en un aumento rápido de la masa bacteriana. Hershey sembró en nuevo medio nutritivo *E. coli* de cultivos iniciales de 3 y de 24 horas, y midió el aumento de la masa bacteriana por medio de un fotelómetro. Durante las primeras dos a tres horas, los nuevos cultivos procedentes de otros de tres horas de tiempo mostraron un índice de reproducción más bajo que el de los obtenidos por resiembra de cultivos de 24 horas, pero el aumento de desarrollo protoplasmático continuó siendo el mismo. Las células de un cultivo inicial más joven mostraron el mismo aumento de masa celular que las de un cultivo original más viejo, aunque se multiplicaban más despacio. El índice de aumento de masa celular es casi constante desde que comienza el desarrollo hasta que se alcanza el número máximo de gérmenes.

Estos resultados sugieren que las condiciones de un medio nuevo favorecen el aumento de tamaño de las células, pero restringen la división celular, con lo que son mayoría las células que alcanzan dimensiones anormales antes de la escisión. La resiembra de un gran número de células en un medio fresco tiende a producir el efecto inverso, o sea que el tamaño medio es menor y se alcanza mucho antes que con resiembras de pocos gérmenes. Si se toman células de un cultivo antes de que hayan alcanzado su tamaño máximo, y se trasladan a un medio nuevo, se hacen mayores, y el punto crítico se retrasa más que en el cultivo original; esto parece indicar que el tamaño de los microorganismos depende de la densidad del cultivo bacteriano. La concentración de los elementos nutritivos del medio es otro factor; los gérmenes son menores en un medio diluído, y tarda menos en llegarse al punto crítico. Un medio diluído proporciona un desarrollo menor que otro más concentrado; esto significa que el segundo produce sobre el tamaño de las células el mismo efecto que el primero.

Efecto del dióxido de carbono sobre el desarrollo. Según Valley y Rettger (1927), muchas bacterias crecen mejor en presencia de dióxido de carbono más concentrado. Walker (1932) observó que la duración de la fase dilatoria podía regularse concentrando el dióxido de carbono presente, y que la multiplicación de *E. coli* podía diferirse indefinidamente por aireación de un cultivo con aire exento de CO_2. Volviendo

a introducir dióxido de carbono en el medio, aumentaba rápidamente el número de bacterias. De ello deduce que «el fenómeno de retardo puede obedecer en gran parte, si no del todo, al tiempo que tarda el cultivo en elevar la concentración de CO_2, en el medio o en las mismas bacterias, a un valor esencial para el desarrollo». Otros autores han llegado a una conclusión similar. Parece indudable que la cantidad de dióxido de carbono presente en un medio nuevo constituye un factor importante para regular la duración de la fase dilatoria, pero probablemente no actúa solo.

Factores que afectan al índice de reproducción. La rapidez con que se multiplican las bacterias aumenta al subir la temperatura, y así continúa hasta llegar a un máximo, para disminuir luego, hasta que sobreviene la muerte. Los tiempos de generación de *E. coli*, a diferentes temperaturas de incubación, son los siguientes:

°C	Tiempo	°C	Tiempo
10	14 h. 20 min.	35	22 min.
15	120 min.	40	17 1/2 min.
20	90 min.	45	20 min.
25	40 min.	47 1/2	77 min.
30	29 min.		

Según Penfold y Norris (1912), el tiempo de generación de la *Salmonella typhosa* en solución de peptona al 1 % es de unos 40 minutos a 37° C. Si la proporción de peptona en el medio es inferior el 0,2 %, el tiempo de generación viene a ser inversamente proporcional a la concentración de la peptona; si es superior al 0,4 %, aumentando la cantidad apenas se modifica el índice de desarrollo de los microorganismos. La adición de 0,175 % de glucosa a un medio que sólo contenga 0,1 % de peptona reduce el tiempo de generación de 111 a 50 minutos; y la de igual cantidad de glucosa a una solución de peptona al 1 % lo reduce sólo de 39 a 34 minutos.

Efecto de la antigüedad del cultivo sobre la morfología celular. En algunas condiciones de ambiente, las bacterias presentan gránulos, y esto no ocurre en otras condiciones distintas. Se ha observado que cuando las bacterias alcanzan su tamaño máximo (al cabo de dos a cuatro horas), los gránulos intracelulares desaparecen, y el protoplasma se vuelve más hialino y se tiñe con más intensidad. A medida que las células maduran y disminuyen de tamaño, su granulación aumenta; las viejas suelen ser muy granulosas, mientras que las jóvenes no lo son en absoluto. En la figura 131 se representa el desarrollo de gránulos en células de *Bacillus mycoides* al envejecer. Una excepción a esta regla es el microorganismo *Corynebacterium diphteriae*, o bacilo diftérico, que

parece ser menor en cultivos recientes que en los viejos, y presenta gránulos en ambos.

Efectos del ambiente constante sobre el número de células. Jordan y Jacobs (1944) cultivaron *E. coli* en un aparato que permitía graduar rigurosamente la temperatura, el pH, la aireación y el volumen del cultivo, y suministraron substancias nutritivas a un ritmo constante, por medio de un mecanismo automático de jeringa. Las determinaciones del número total de células y del de las viables revelaron un período inicial

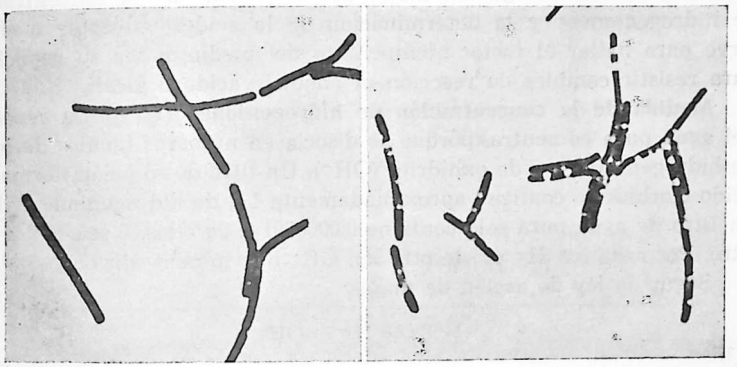


Fig. 131. — *Bacillus mycoides*. Izquierda, cultivo de seis horas; derecha, cultivo de 24 horas. Obsérvese el desarrollo de gránulos al madurar.

de aumento de ambas cifras, seguido de una fase sostenida en la que la de células viables permanecía constante o descendía algo, mientras que seguía subiendo la total. Deteniendo de pronto la nutrición durante la fase sostenida, la cifra total no se alteraba, y la de células viables descendía a un nivel constante más bajo.

Para más información, véanse Hinshelwood (1946), Rahn (1945), Stephenson (1949), Winslow y Walker (1939).

CONCENTRACIÓN DE HIDROGENIONES EN MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se ajustan a diversos grados de acidez o alcalinidad, según el pH que convenga a los gérmenes que hayan de cultivarse. Algunos microorganismos medran mejor en medios ácidos; otros, en medios alcalinos, y algunos prefieren un punto próximo a la neutralidad; este último grupo comprende la mayoría de las bacterias estudiadas hasta ahora. Es necesario, por tanto, ajustar la reacción de los medios al pH que requieren los diversos microbios.

Para fijar la reacción de los medios de cultivo se emplean dos proce-

dimientos: 1.º, determinar la cifra efectiva de hidrogeniones libres, y 2.º, determinar el número exacto de grupos básicos o ácidos activos presentes. El primero da la concentración de hidrogeniones (H+); el segundo, la acidez o alcalinidad valorable.

La concentración de hidrogeniones se determina por colorimetría o por electrometría. La acidez valorable se obtiene hallando la diferencia entre el factor de la solución y el que se acepte como punto neutro o acidez inicial. Ambos métodos son muy útiles en la técnica bacteriológica. Los medios se ajustan mejor por el método de la concentración de hidrogeniones; y la determinación de la acidez valorable o eficaz sirve para hallar el factor atemperante del medio, o sea su capacidad para resistir cambios de reacción al añadirle ácido o álcali.

Medida de la concentración de hidrogeniones (H+). La reacción del agua pura es neutra, porque se disocia en números iguales de iones de hidrógeno (H+) y de oxhidrilo (OH−). Un litro de solución normal de ácido clorhídrico contiene aproximadamente 1 g de hidrogeniones (H+); un litro de agua pura sólo contiene 0,0000001 g de ellos, o sea 10^{-7} g por litro. Por cada ion H+ existe otro ion OH− que lo neutraliza.

Según la ley de acción de masas,

$$HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

o bien.

$$\frac{(H^+)\,(OH^-)}{HOH} = K$$

Como la concentración del agua no disociada es muy grande, se supone constante. La ecuación puede expresarse como sigue:

$$(H^+)\,(OH^-) = K$$

Dado que los números de iones H+ y OH− son iguales, la concentración de cada grupo será 1×10^{-7}. El producto de la concentración de hidrogeniones por la de oxhidriliones es igual a 1×10^{-14}; de aquí resulta una nueva ecuación:

$$(H^+) \times (OH^-) = 1 \times 10^{-14}$$

El agua pura, que tiene una concentración de 1×10^{-7} hidrogeniones, da reacción neutra. Si la concentración de hidrogeniones de una solución es menor de 1×10^{-7}, dará reacción alcalina, y ácida, si tal concentración es superior a 1×10^{-7}.

El pH se define como logaritmo del número recíproco del que indica la concentración de hidrogeniones; por comodidad, se emplea sólo el exponente para expresar el pH. Si una solución tiene un pH inferior a 7, su reacción es ácida, y alcalina, si lo tiene mayor de 7. La mayoría de los microorganismos se desarrollan sobre todo en medios de cultivo con pH próximo a 7.

En la tabla 20 se expone la relación entre el pH y la concentración de H+.

TABLA 20. RELACIÓN ENTRE pH Y H+

	pH	Normalidad en hidrogeniones	Normalidad en oxhidriliones
Acidez	0	1	10^{-14}
	1	10^{-1}	10^{-13}
	2	10^{-2}	10^{-12}
	3	10^{-3}	10^{-11}
	4	10^{-4}	10^{-10}
	5	10^{-5}	10^{-9}
	6	10^{-6}	10^{-8}
Punto neutro	7	10^{-7}	10^{-7}
Alcalinidad	8	10^{-8}	10^{-6}
	9	10^{-9}	10^{-5}
	10	10^{-10}	10^{-4}
	11	10^{-11}	10^{-3}
	12	10^{-12}	10^{-2}
	13	10^{-13}	10^{-1}
	14	10^{-14}	1

Método colorimétrico. La concentración de hidrogeniones se determina por este método a base de los cambios de color que experimentan ciertos colorantes ácidos o básicos al variar la reacción del medio; tales colorantes se conocen por indicadores. Todos ellos se disocian al añadir un ácido o un álcali, y cambian de color dentro de una zona muy pequeña a ambos lados del punto de la escala de pH en que su disociación es de 50 %. En este punto, una mitad del colorante permanece sin disociar, y la otra mitad se halla disociada en iones libres; el pH en que esto ocurre se designa por el símbolo pK.

A cada lado del pK se extiende una estrecha zona de sensibilidad del indicador. Cada matiz del mismo dentro de ella corresponde a un valor pH definido; así, comparando el matiz del indicador con patrones de reacción conocida, se determina la concentración de hidrogeniones de una solución. Mediante selección de indicadores cuyas zonas de sensibilidad se superpongan en parte, puede cubrirse una escala de pH desde 1 hasta 10.

La figura 132 muestra una tabla de selección de indicadores de pH corrientemente utilizados.

Atemperantes o compensadores. Las sales de ácidos débiles poseen la propiedad de impedir en las soluciones cambios muy pronunciados al añadir cantidades relativamente grandes de ácidos o bases fuertes. Las substancias dotadas de esta facultad se denominan atemperantes o compensadores, y también amortiguadores, tampones o topes.

La adición de 1 c. c. de ácido clorhídrico N/10 a un litro de agua

destilada neutra (pH 7) da una solución con pH 4, aproximadamente; y añadiendo a la misma cantidad de agua 1 c. c. de solución N/10 de hidróxido sódico, se obtiene una solución con pH 10, poco más o menos; pero si se agrega la misma cantidad de ácido o álcali a un litro de agua destilada en la que se hayan disuelto previamente unos gramos de fosfato sódico, apenas cambia la reacción, pues esta sal es atemperante. El fenómeno puede seguirse por las siguientes reacciones.

Cuando se añade un ácido enérgico,

$$Na_2HPO_4 + HCl \rightarrow NaH_2PO_4 + NaCl$$

el ácido, HCl, reacciona con el álcali débil, Na_2HPO_4, y da un ácido débil, NaH_2PO_4, y cloruro sódico. En otras palabras, el ácido fuerte, HCl, es reemplazado por el fosfato ácido débil, y sólo se produce un cambio relativamente pequeño en la concentración final de hidrogeniones.

Al añadir un álcali fuerte,

$$NaH_2PO_4 + NaOH \rightarrow Na_2HPO_4 + H_2O$$

el álcali, NaOH, reacciona con el ácido débil, NaH_2PO_4, y da un álcali débil, Na_2HPO_4, y agua. El álcali fuerte, NaOH, queda reemplazado por el fosfato básico débil, y se produce un cambio relativamente pequeño en la concentración final de hidrogeniones.

Las sales importantes que se agregan a medios nutritivos para atemperarlos comprenden fosfatos y carbonatos; estos compuestos resultan muy útiles, por ser prácticamente atóxicos.

Las peptonas bacteriológicas contienen substancias tales como proteosas, peptonas, péptidos y aminoácidos, atemperantes todas ellas, pues son a la vez ácidas y básicas, es decir, tienen la facultad de fijar tanto ácidos como bases. Por consiguiente, todo medio de cultivo que contenga peptona está compensado o atemperado, y el grado de compensación depende de la cantidad de peptona agregada.

Los compensadores o tampones son de importancia sobre todo en medios que contengan carbohidratos muy fermentados. Las diversas fermentaciones producen ácidos orgánicos; a medida que aumenta la concentración de hidrogeniones, desciende el pH hasta alcanzar un punto en que los microorganismos no se reproducen ya, por haberse acumulado ácido suficiente para detener su actividad. En presencia de un atemperante, esto ocurre en general al cabo de 24 a 48 horas; sin atemperante, la actividad de los gérmenes puede interrumpirse a las pocas horas. Un buen medio de cultivo, además de contener las substancias nutritivas necesarias, debe estar debidamente compensado.

Soluciones atemperadas de contraste. Clark y Lubs (1917) propusieron una serie de soluciones compensadas que cubrían una escala de pH 1,2 a pH 10, con intervalos de 0,2 pH. Eligiendo indicadores apropiados (fig. 132), estas soluciones atemperadas pueden servir de

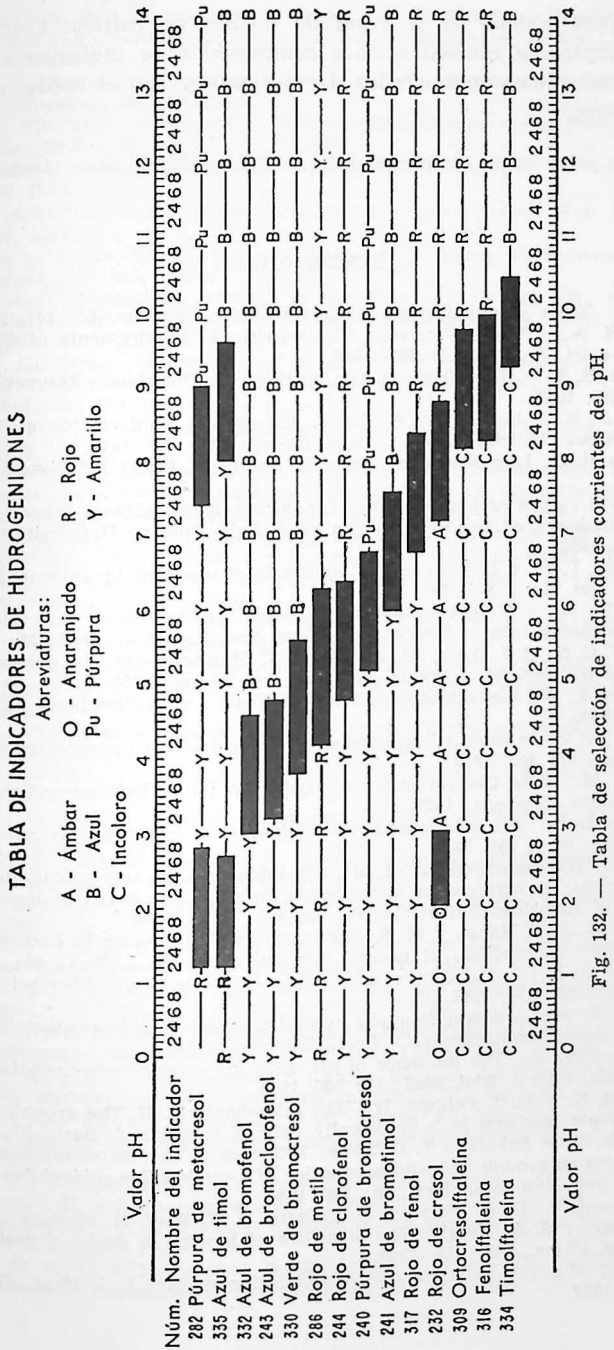


Fig. 132. — Tabla de selección de indicadores corrientes del pH.

patrón para ajustar la reacción de medios de cultivo. Con este fin deben emplearse concentraciones comparables de indicador, para uso con las soluciones atemperadas de contraste y con el medio que haya de ajustarse.

Véase información complementaria en Clark (1928), Cohen (1948) y Hewitt (1950).

REFERENCIAS

Atkin, L.: Yeast growth factors, *Wallerstein Lab. Commun*, **12**: 141, 1949.

Barker, H. A., y W. H. Peterson: The nutritional requirements of *Clostridium acidi-urici*, *J. Bact.*, **47**: 307, 1944.

Bornstein, B. T., y H. A. Barker: The nutrition of *Clostridium kluyveri*, *J. Bact.*, **55**: 223, 1948.

Boyd, M. J., M. A. Logan, y A. A. Tytell: The growth requirements of *Clostridium perfringes (Welchii)* BP6K, *J. Biol. Chem.*, **174**: 1013, 1948.

Buchanan, R. E.: Life phases in a bacterial culture, *J. Infectious Diseases*, **23**: 109, 1918.

—: Growth curves of bacteria. De «The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology», ed. por E. O. Jordan e I. S. Falk, Chicago, University of Chicago Press, 1928.

Burkholder, P. R., e Ilda McVeigh: Synthesis of vitamins by intestinal bacteria, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **28**: 285, 1942.

Carlson, W. W., y V. Whiteside-Carlson: Biotin-carbohydrate interrelationships in the metabolism of *Leuconostoc*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**: 416, 1949.

Carroll, T. C. N., C. J. Danby, A. A. Eddy, y C. Hinshelwood: The uptake of alkali metals by bacteria, *J. Chem. Soc.*, pág. 946, March, 1950.

Chattaway, F. W.: Growth stimulation of *L. casei* ε by pyrimidines, Nature, **153**: 250, 1944.

Clark, F. M.: Some nitrogen requirements of *Clostridium thermosaccharolyticum*, *J. Bact.*, **57**: 465, 1949.

Clark, W. M.: «The Determination of Hydrogen Ions», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1928.

— y H. A. Lubs: The colorimetric determination of hydrogen-ion concentration, *J. Bact.*, **2**: 1, 191, 1917.

Cohen, B.: The measurement of pH, titratable acidity, and oxidation-reduction potentials. De «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Society of American Bacteriologists, Geneva, N. Y., 1948.

Cowie, D. B., E. T. Bolon, y M. K. Sands: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. I. Sulfate metabolism of normal and mutant cells, *J. Bact.*, **60**: 233, 1950.

Curcho, M. de la G.: Mutation of tryptophan independence in *Eberthella typhosa*, *J. Bact.*, **56**: 374, 1948.

Delwiche, E. A.: A biotin function in succinic acid decarboxylation by *Propionibacterium pentosaceum*, *J. Bact.*, **59**: 439, 1950.

Doede, Dorothy R.: The influence of pH upon tne growth-factor requirements of bacteria, *Yale J. Biol. Med.*, **17**: 595, 1945.

Doetsch, R. N., y M. J. Pelczar, Jr.: The microbacteria. II. The growth of *Microbacterium lacticum* in a chemically defined medium, *J. Bact.*, **57**: 61, 1949.

Dreizen, S., E. Scholz, y T. D. Spies: Influence of anti-metabolites of essential vitamins on growth and acid production of *Lactobacillus acidophilus* (Hadley), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**: 620, 1948.

Du Vigneaud, V., D. B. Melville, K. Folkers, D. E. Wolf, R. Mozingo, J. C. Keresztesy, y S. A. Harris: The structure of biotin: A study of desthiobiotin, *J. Biol. Chem.*, **146**: 475, 1942.

Eastcott, E. V.: The isolation and identification of bios I, *J. Phys. Chem.*, **32**: 1094, 1928.

Elvehjem, C. A., R. J. Madden, S. M. Strong, y D. W. Woolley: Relation of nicotinic acid and nicotinic acid amide to canine blacktongue, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**: 1767, 1937.

Evans, R. J.: Sulfur amino acid nutrition of some lactic acid-producing bacteria, *Arch. Biochem.*, **16**: 357, 1948.

Fildes, P.: The nature of the effect of blood pigment upon the growth of *B. Influenzae*, *Brit. J. Exp. Path.*, **2**: 16, 1921.

—, The nature of the action of potato upon the growth of *B. influenzae*, *ibid.*, **3**: 210, 1922.

—, Some medical and other aspects of bacterial chemistry, *Proc. Roy. Soc. Med.*, **28**: 79, 1934.

—: Indole as a precursor in the synthesis of tryptophane by bacteria, *Brit. J. Exp. Path.*, **21**: 315, 1940*a*.

—: A rational approach to research in chemotherapy, *Lancet*, **238**: 955, 1040b.

—: The biosynthesis of tryptophane by *Bact. typhosum*, *Brit. J. Exp. Path.*, **26**: 416, 1945.

— y G. P. Gladstone: Glutamine and the growth of bacteria, *ibid.*, **20**: 334, 1939.

—, —, y B. C. J. G. Knight: The nitrogen and vitamin requirements of *B. typhosus*, *ibid.*, **14**: 189, 1933.

— y B. C. J. G. Knight: Tryptophane and the growth of bacteria, *ibid.*, **14**: 343, 1933.

Foster, J. W.: Microbiological aspects of riboflavin. I. Introduction. II. Bacterial oxidation of riboflavin to lumichrome, *J. Bact.*, **47**: 27, 1944*a*, III. Oxidation studies with *Pseudomonas riboflavina*, *ibid.*, **48**: 97, 1944b.

Funk, C.: The etiology of the deficiency diseases, *J. State Med.*, **20**: 341, 1912.

Geiger, W. B. Jr., y R. J. Anderson: The chemistry of *Phytomonas tumefaciens*. I. The lipids of *Phytomonas tumefaciens*. The composition of the phosphatide, *J. Biol. Chem.*, **129**: 519, 1939.

Gerhardt, P., y J. B. Wilson: The nutrition of brucellae: growth in simple chemically defined media, *J. Bact.*, **56**: 17, 1948.

Gingrich, W., y F. Schlenk: Codehydrogenase I and other pyridinium compounds as V-factor for *Hemophilus influenzae* and *H. parainflwenzae*, *J. Bact.*, **47**: 535, 1944.

Gould, R. G.: Glutathione as an essential growth factor for certain strains of *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Biol. Chem.*, **153**: 143, 1944.

Grossowicz, N.: Glutamine, an antimetabolite for *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, **173**: 729, 1948.

Guilleman, M., y W. P. Larson: Fixed and free salts of bacteria, *J. Infectious Diseases*, **31**: 355, 1922.

György, P.: Vitamin B_2 complex. I. Differentiation of lactoflavin and the rat antipellagra factor, *Biochem. J.*, **29**: 741, 1935.

Harris, S. A., y K. Folkers: Synthesis of vitamin B_6, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**: 1245, 1939.

Hegarty, C. P., y O. B. Weeks: Sensitivity of *Escherichia coli* to cold-shock during the logarithmic growth phase, *J. Bact.*, **39**: 475, 1940.

Henrici, A. T.: «Morphologic Variation and the Rate of Growth of Bacteria», Springfield, Ill., Charles C. Thomas, Publisher, 1928.

Herbst, E. J., y E. E. Snell: Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae*, 7901, *J. Biol. Chem.*, **181**: 47, 1949.

Herrick, J. A., y C. J. Alexopoulos: A further note on the production of thiamine by *Actinomyces*, *Bull. Torry Botan. Club.*, **70**: 369, 1943.

Hershey, A. D.: Factors limiting bacterial growth. IV. The age of the parent culture and the rate of growth of transplants of *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **37**: 285, 1939.

Hewitt, L. F.: «Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry», Edinburgh, E. y S. Livingstone, Ltd., 1950.

Hinshelwood, C. N.: «The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell», Nueva York, Oxford University Press, 1946.

Hitchings, G. H., E. A. Falco, y M. B. Sherwood: The effects of pyrimidines on the growth of *Lactobacillus casei*, *Science*, **102**: 251, 1945.

Hoagland, C. L., S. M. Ward, H. Gilder, y R. E. Shank: Studies on the nutrition of *Hemophilus influenzae*. I. The relationship between the utilization of coenzyme and hemin and the reduction of nitrate, *J. Exp. Med.*, **76**: 241, 1942.
Hook, A. E., y F. W. Fabian: Chemical and bacteriological studies on peptones. *Mich. State Coll. Agric., Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.*, 185, 1943.
Hopkins, F. G.: The analyst and the medical man, *Analyst*, **31**: 385, 1906.
Humm, H. J.: Marine agar-digesting bacteria of the South Atlantic coast, *Duke Univ. Marine Sta. Bull.* 3,, 1946.
— y K. S. Shepard: Three new agar-digesting actinomycetes, *ibid.*, 3, 1946.
Hutner, S. H.: A strain of *Shigella paradysenteriae* (Flexner) requiring uracil, *Arch. Biochem.*, **4**: 119, 1944.
Johnson, E. A., y L. F. Rettger: A comparative study of the nutritional requirements of *Salmonella typhosa, Salmonella pullorum,* and *Salmonella gallinarum, J. Bact.*, **45**: 127, 1943.
Jordan, R. C., y S. E. Jacobs: The growth of bacteria with a constant food supply I. Preliminary observations on *Bacterium coli, J. Bact.*, **48**: 579, 1944.
Karlsson, J. L., B. E. Volcani, y H. A. Barker: The nutritional requirements of *Clostridium aceticum, J. Bact.*, **56**: 781, 1948.
Keresztesy, J. C., y J. R. Stevens: Vitamina B_6, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**: 1267, 1938.
Kersey, R. C., y J. R. Porter: Pantothemic acid and the metabolism of amino acids by bacteria, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**: 379, 1948.
Kitay, E., W. S. McNutt, y E. E. Snell: Desoxyribosides and vitamin B_{12} as growth factors for lactic acid bacteria, *J. Bact.*, **59**: 727, 1950.
Knight, B. C. J. G.: Growth factors and growth inhibitors for micro-organisms, *Proc. Nutrition Soc.*, **4**: 116, 1946.
—: Essential metabolites and antimetabolites, *J. Mt. Sinai Hosp.*, **15**: 281, 1949.
Kögl, F.: Über Wuchsstoffe der Auxin- und der Bios-Gruppe, *Ber.*, **68**: 16, 1935.
Koser, S. A.: Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group, *J. Bact.*, **8**: 493, 1923.
— y G. R. Baird: Bacterial destruction of nicotinic acid, *J. Infectious Diseases*, **75**: 250, 1944.
Landy, M., N. W. Larkum, E. J. Oswald, y F. Streigthtoff: Increased synthesis of *p*-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus, Science*, **97**: 2516, 1943.
Lankford, C. E., V. Scott, M. F. Cox, y W. R. Cooke: Some aspects of nutritional variation of the gonococcus, *J. Bact.*, **45**: 321, 1943.
— and E. E. Snell: Glutamine as a growth factor for certain strains of *Neisseria gonorrhoeae, ibid.*, **45**: 410, 1943.
Larson, L. W., y W. P. Larson: Factors governing the fat content of bacteria and the influence of fat on pellicle formation, *J. Infectious Diseases*, **31**: 407, 1922.
Lepkovsky, S.: Crystalline factor I, *Science*, **87**: 169, 1938.
Lichstein, H. C.: Further studies on the biotin coenzyme, *J. Bact.*, **60**: 485, 1950.
Lwoff, A., y M. Lwoff: Studies on codehydrogenases: Nature of growth factor V, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Series B, **122**: 352, 1937*a*.
— y —: Studies on codehydrogenases; physiological function of growth factor V, *ibid.*, **122**: 360, 1937*b*.
McCullough, N. B., y Leo A. Dick: Growth of *Brucella* in a simple chemically defined medium, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **52**: 310, 1943.
McCullough, W. G., R. C. Mills, E. J. Herbst, W. G. Roessler, y C. R. Brewer: Studies on the nutritional requirements of *Brucella suis, J. Bact.*, **53**: 5, 1947.
McIlwain, H.: The specificity of glutamine for growth of *Streptococcus haemolyticus, Biochem, J.*, **33**: 1942, 1939.
— P. Fildes, G. P. Gladstone, y B. C. J. G. Knight: Glutamine and the growth of *Streptococcus haemolyticus, ibid.*, **33**: 223, 1939.
MacLeod, R. A., y E. E. Snell: The effect of related ions on the potassium requirement of lactic acid bacteria, *J. Biol. Chem.*, **176**: 39, 1948.
Mayer, R. L., y M. Rodbart: The production of riboflavin by *Mycobacterium smegmatis, Arch. Biochem.*, **11**: 49, 1946.
Metzger, W. I.: Microbic decomposition of pantothenic acid, *J. Bact.*, **54**: 135, 1947.

Miller, A. K.: Folic acid and biotin synthesis by sulfonamide-sensitive and sulfonamide-resistant strains of *Escherichia coli, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **57**: 151, 1944.
Mitchell, H. K., E. E. Snell, y R. J. Williams: The concentration of «folic acid», *J. Am. Chem. Soc.*, **63**: 2284, 1941.
Mueller, J. H.: Studies on cultural requirements of bacteria. VI. The diptheria bacillus, *J. Bact.*, **30**: 513, 1935; X. Pimelic acid as a growth stimulant for *C. diphtheriae, ibid.*, **34**: 163, 1937*a*.
—: Nicotinic acid as a growth accessory for the diphtheria bacillus, *ibid.*, **34**: 429, 193*b*.
—: Nutrition of the diphtheria bacillus, *Bact. Rev.*, **4**: 97, 1940.
— y S. Cohen: Beta alanine as a growth accessory for the diphteria bacillus, *J. Bact.*, **34**: 381, 1937.
— y I. Kapnick: Studies on cultural requirements of bacteria. VIII. Amino acid requirements for the Park-Williams No. 8 strain of diphtheria, *ibid.*, **30**: 525, 1935.
Müller, M.: Über den Einfluss van Fiebertemperaturen auf die Wachtumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhus-bacillus, *Z. Hyg.*, **20**: 245, 1895.
Nichol, C. A., y M. Michaelis: Nicotinic acid oxidation in *Pseudomonas fluorescens, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**: 70, 1947.
Oginsky, E. L., P. H. Smith, N. E. Tonhazy, W. W. Umbreit, H. C. Lichstein, y S. F. Carson: The influence of vitamin B_{12} on oxidation by a mutant strain of *Escherichia coli, J. Bact.*, **61**: 581, 1951.
O'Kane, D. J.: The synthesis of riboflavin by staphylococci, *J. Bact.*, **41**: 441, 1941.
Pearson, W. N.: A purine-requiring strain of *Photobacterium fischeri, J. Bact.*, **58**: 653, 1949.
Penfold, W. J., y D. Norris: The relation of concentration of food supply to the generation time for bacteria, *J. Hyg.*, **12**: 527, 1912.
Perlman, D.: Some effects of metallic ions on the metabolism of *Aerobacter aerogenes, J. Bact.*, **49**: 167, 1945.
Peterson. W. H., y M. S. Peterson: Relation of bacteria to vitamins and other growth factors, *Bact. Rev.*, **9**: 49, 1945.
Pollack, M. A., y M. Lindner: Glutamine and glutamic acid as growth factors for lactic acid bacteria, *J. Biol. Chem.*, **143**: 655, 1942.
Rahn, O.: Injury and death of bacteria by chemical agents, *Biodynamica*, 1945.
Richardson, G. M.: The nutrition of *Staphylococcus aureus*. Necessity for uracil in anaerobic growth, *Biochem, J.*, **30**: 2184, 1936.
Riesen, W. H., H. H. Spengler, A. R. Robblee, L. V. Hankes, y C. A. Elvehjem: Cystine and related compounds in the nutrition of lactic acid bacteria, *J. Biol. Chem.*, **171**: 731, 1947.
Roberts, R. B., y I. Z. Roberts: Potassium metabolism in *Escherichia coli*. III. Interrelationship of potassium and phosphorus metabolism. *J. Cellular Comp. Physiol*, **36**: 15, 1950.
Roblin, R. O., Jr.: Metabolite antagonists, *Chem. Eng. News*, **27**: 3624, 1949.
Rogers, H. J.: Importance of pyrimidine derivatives in the growth of group C (Lancefield) streptococci upon a simplified medium, *Nature*, **153**: 251, 1944.
Rowatt, E.: The relation of pantothenic acid to acetylcholine formation by a strain of *Lactobacillus plantarum, J. Gen. Microbiol.*, **2**: 25, 1948.
Rydon, H. N.: Anthranilic acid as an intermediate in the biosynthesis of tryptophan by *Bact. typhosum, Brit. J. Exp. Path.*, **29**: 48, 1948.
Scherp, H. W., y C. Fitting: The growth of *Neisseria meningitidis* in simple chemically defined media, *J. Bact.*, **58**: 1, 1949.
Schultz, J. H., y H. Ritz: Die Thermoresistenz junger und alter Coli-Bacillen, *Centr. Bakt., Abt. I, Orig.*, **54**: 283, 1910.
Shankar, K., y R. C. Bard: The effect of metallic ions on the growth and morphology of *Clostridium perfringens, J. Bact.*, **63**: 279, 1952.
Sherman, J. M., y W. R. Albus: Physiological youth in bacteria, *J. Bact.*, **8**: 127, 1923.
Shive, W., y L. L. Rogers: Involvement of biotin in the biosynthesis of oxalacetic and α-ketoglutaric acids, *J. Biol. Chem.*, **169**: 453, 1947.

Shull, G. M., B. L. Hutchings, y W. H. Peterson: A microbiological assay for biotin, *J. Biol. Chem.*, **142**: 913, 1942.
Smiley, K. L., C. F. Niven, Jr., y J. M. Sherman: The nutrition of *Streptococcus salivarius*, *J. Bact.*, **45**: 445, 1943.
Smith, M. I., y E. W. Emmart: Studies in the metabolism of the tubercle bacillus. I. The production of riboflavin, *J. Immunol.*, **61**: 259, 1949.
Snell, E. E., E. Kitay, y W. S. McNutt: Thymine desoxyriboside as an essential growth factor for lactic acid bacteria, *J. Biol. Chem.*, **175**: 473, 1948.
— y H. K. Mitchell: Purine and pyrimidine bases as growth substance for lactic acid bacteria, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **27**: 1, 1941.
— y W. H. Peterson: Properties of a new growth factor for lactic acid bacteria, *J. Biol. Chem.*, **128**: 94, 1939.
— y—: Growth factors for bacteria. X. Additional factors required by certain lactic acid bacteria, *J. Bact.*, **39**: 273, 1940.
Stanier, R. Y.: Studies on marine agar-digesting bacteria, *J. Bact.*, **42**: 527, 1941.
—: Agar-decomposing strains of the *Actinomyces coelicolor* species-group, *ibíd.*, **44**: 555, 1942.
Stephenson, M.: «Bacterial Metabolism», Nueva York, Longmans, Green & Co., Inc., 1949.
— y M. D. Whetham: Studies in the fat metabolism of the timothy grass bacillus, *Proc. Roy. Soc. (London)*, series B, **93**: 262, 1922.
Stokes, J. L., M. Gunness, y J. W. Foster: Vitamin content of ingredients of microbiological culture media, *J. Bact.*, **47**: 293, 1944.
— y A. Larson: Amino acid requirements of *Acetobacter suboxydans*, *ibíd.*, **49**: 495, 1945.
—, —, y M. Gunness: Biotin and the synthesis of aspartic acid by microorganisms, *ibíd.*, **54**: 219, 1947
Stokstad, E. L. R.: Isolation of a nucleotide essential for the growth of *Lactobacillus casei*, *J. Biol. Chem.*, **139**: 475, 1941.
Tanner, F. W., Jr., C. Vojnovich, y J. M. Van Lanen: Factors affecting riboflavin production by *Ashbya gossypii*, *J. Bact.*, **58**: 737, 1949.
Thjötta, T.: Studies on bacterial nutrition. I. Growth of *Bacillus influenzae* in hemoglobin-free media, *J. Exp. Med.*, **33**: 763, 1921.
— y O. T. Avery: Studies on bacterial nutrition. II. Growth accessory substances in the cultivation of hemophilic bacilli, *ibíd.*, **34**: 97, 1921*a*; III. Plant tissue, as a source of growth accessory substances, in the cultivation of *B. influenzae*, *ibíd.*, **34**: 455, 1921*b*.
Toennies, G. H. M. Winegard, y D. L. Gallant: Inhibition of growth of *Lactobacillus casei* by methionine and its relation to follic acid assimilation. *Arch. Biochem.*, **25**: 246, 1950.
Tseng, C. K.: Agar: A valuable seaweed product, *Sci. Monthly*, **58**: 24, 1944*a*.
—: Utilization of seaweeds , *ibíd.*, **59**: 37, 1944*b*.
Valley, G., y L. F. Rettger: The influence of carbon dioxide on bacteria, *J. Bact.*, **14**: 101, 1927.
Volcani, B. E., y E. E. Snell: The effects of canavanine, arginine, and related compounds on the growth of bacteria, *J. Biol. Chem.*, **174**: 893, 1948.
Walker, H. H.: Carbon dioxide as a factor affecting lag in bacterial growth, *Science*, **76**: 602, 1932.
Waring, W. S., y C. H. Werkman: Growth of bacteria in an iron-free medium, *Arch. Biochem.*, **1**: 303, 1942.
— y —: Iron requirements of heterotrophic bacteria, *ibíd.*, **1**: 425, 1943.
— y —: Iron deficiency in bacterial metabolism, *ibíd.*, **4**: 75, 1944.
Washburn, M. R., y C. F. Niven, Jr.: Amino acid interrelationships in the nutrition of *Streptococcus bovis*, *J. Bact.*, **55**: 769, 1948.
Webb, M.: The influence of magnesium on cell division. I. The grow of *Clostridium Welchii* in complex media deficient in magnesium. *J. Gen. Microbiol.*, **2**: 275, 1948.
Wieland, O. P., J. Avener, E. M. Boggiano, N. Bohonos, B. L. Hutchings, y J. H. Williams: Orotic acid in the nutrition of a strain of *Lactobacillus bulgaricus*, *J. Biol. Chem.*, **186**: 737, 1950.

Wildiers, E.: Nouvelle substance indispensable au développement de la levure, *La Cellule*, **18**: 313, 1901.
Williams, R. J.: Growth-promoting nutrilites for yeasts, *Biol. Rev.* **16**: 49, 1941*a*.
—: The importance of microorganisms in vitamin research, *Science*, **93**: 412, 1941*b*.
—, y E. Bradway: Further fractionation of yeast nutrilites and their relationship to vitamin B and Wildiers' bios, *J. Am. Chem. Soc.*, **53**: 783, 1931.
—, C. M. Lyman, G. H. Goodyear, J. H. Truesdail, y D. Holaday: Pantothenic acid, a growth determinant of universal biological occurrence, *ibíd.*, **55**: 2912, 1933.
Winslow, C.-E. A., y H. H. Wolker: The earlier phases of the bacterial culture cycle, *Bact. Rev.*, **3**: 147, 1939.
Wood, W. A., I. C. Gunsalus, y W. W. Umbreit: Function of pyridoxal phosphate: resolution and purification of the tryptophanase enzyme of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **170**: 313, 1947.
Woods, D. D.: The relation of *p*-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulfanilamide, *Brit. J. Exp. Path.*, **21**: 74, 1940.
Woolley, D. W.: «A Study of Antimetabolites», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1952.
Wright, L. D., E. L. Cresson, y H. R. Skeggs: Biotin in the bacterial deamination of certain amino acids, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**: 556, 1949.
—, H. R. Skeggs, y J. W. Huff: The ability of thymidine to replace vitamin B_{12} as a growth factor for certain lactobacilli, *J. Biol.*, **175**: 475, 1948.
Youmans, G. P.: Subsurface growth of virulent tubercle bacilli in a synthetic medium, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **57**: 122, 1944.
Young, E. G., R. W. Begg, y E. I. Pentz: The inorganic nutrient requirements of *Escherichia coli*, *Arch. Biochem.*, **5**: 121, 1944.
Young, R. M., y L. F. Rettger: Decomposition of vitamin C by bacteria, *J. Bact.*, **46**: 351, 1943.

CAPÍTULO XII

ENZIMAS DE BACTERIAS

La catálisis puede definirse como la aceleración producida en una reacción por la presencia de una substancia conocida por catalizador (del griego κατά, abajo, y λύειν, disolver). Esta substancia no se destruye ni altera, y puede recuperarse al final de la reacción en que interviene.

Una enzima constituye un catalizador orgánico termolábil elaborado por una célula viva, y capaz de actuar con independencia de ésta. Lo hace por catálisis, es decir, aumenta la velocidad de una reacción química sin modificarse de modo permanente.

Existe una estrecha analogía entre catalizadores inorgánicos y enzimas; por ejemplo, el peróxido de hidrógeno se descompone lentamente en agua y oxígeno, según la reacción

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

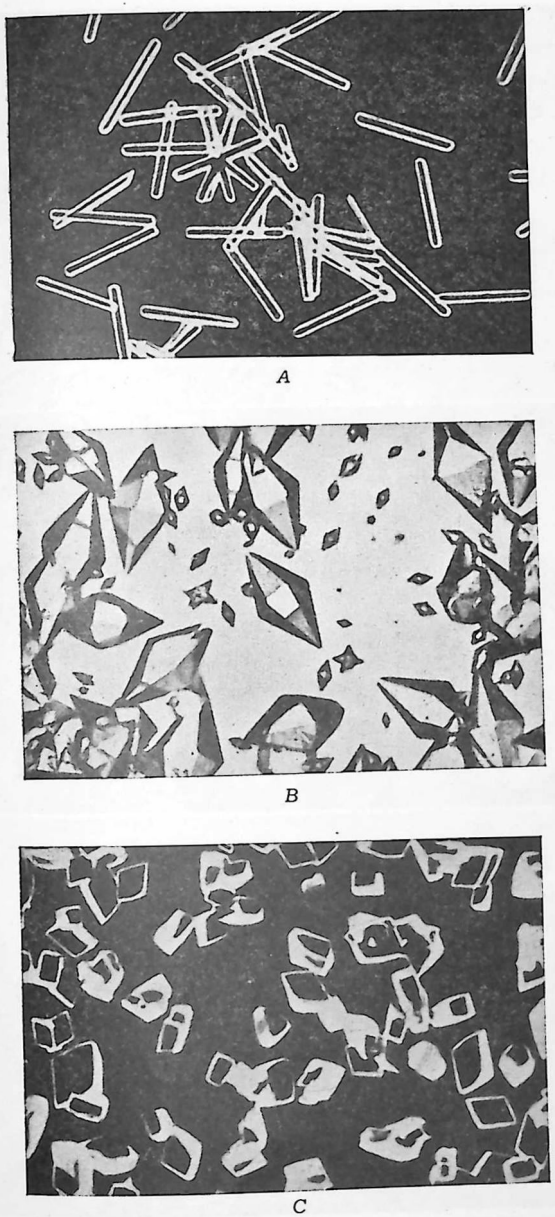
En presencia de un catalizador orgánico, como el platino, o de la enzima catalasa, la descomposición del peróxido se acelera notablemente, y no cesa hasta que termina la destrucción del compuesto.

NATURALEZA DE LAS ENZIMAS

Las enzimas poseen las propiedades de las proteínas: forman soluciones coloidales, no se dializan a través de las membranas, o lo hacen muy lentamente, producen soluciones opalescentes, precipitan de soluciones por los mismos agentes que hacen depositarse las proteínas, y sus pesos moleculares son elevados.

Son numerosas las enzimas aisladas y preparadas en forma cristalina pura. Estas enzimas puras dan reacciones positivas de proteínas, aun después de cristalizaciones repetidas, lo que indica que no contienen ninguna proteína extraña.

Las figuras 133 y 134 reproducen fotomicrografías de algunas enzimas cristalinas.



A

B

C

Fig. 133. — *A*, cristales de tripsina; *B*, cristales de pepsina; *C*, cristales de quimotripsina. (De Northrop, Kunitz y Herriott, «Crystalline Enzymes», Columbia University Press.)

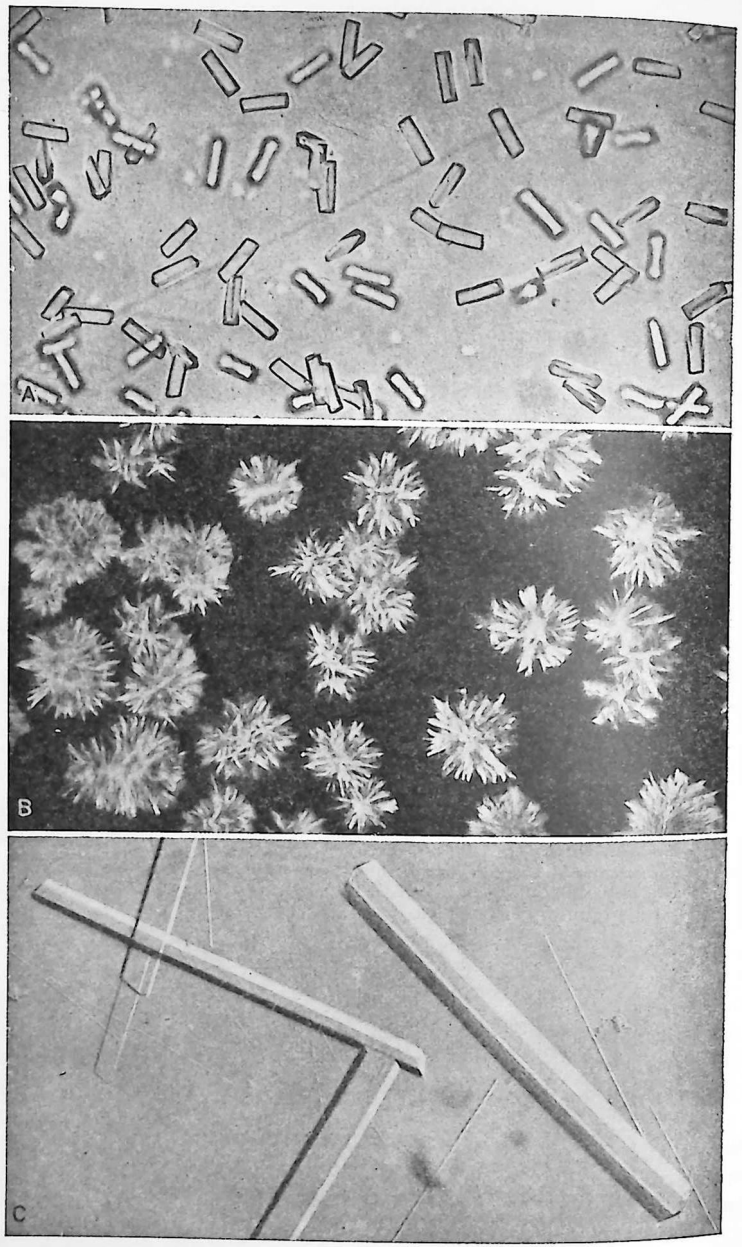


Fig. 134. — *A*, cristales de desoxirribonucleasa; *B*, cristales de ribonucleasa; *C*, cristales de hexocinasa. (Con licencia de M. Kunitz.)

Otro indicio de que las enzimas son proteínas es su producción decreciente en medios de cultivo con cantidades escasas de nitrógeno. Virtanen y De Ley (1948), Virtanen y Winkler (1949) y Virtanen (1949) opinan que, por lo que hoy se sabe del contenido de enzimas en las células, casi toda la proteína de las células bacterianas consiste probablemente en proteína enzimática, y que no es cierta la antigua hipótesis de la presencia de enzimas distribuídas en distintos puntos del protoplasma. Estos autores han comprobado que en células secas de *Escherichia coli,* cultivadas en un medio que contenía abundante nitrógeno, había un 13 % de este elemento; y, cuando los microorganismos se desarrollaban en un medio pobre en nitrógeno, su contenido en éste descendía de 13 hasta 6,5 %. En tales condiciones, la actividad de ciertas enzimas se mantenía bastante similar a la observada en células normales, mientras que se reducía apreciablemente la de otras enzimas, como la sacarasa.

A base de sus investigaciones, llegan a la conclusión de que las enzimas esenciales, esto es, necesarias para la actividad celular, prescindiendo de la composición del medio, conservan esta actividad muy bien aunque se reduzca la proporción de nitrógeno. En cambio, las enzimas no esenciales, es decir, las que amplían las condiciones de vida de la célula y le permiten utilizar diversas substancias nutritivas, sin ser necesarias en todos los medios de nutrición, pierden la mayor parte de su actividad, o toda ella, al reducir el contenido en nitrógeno.

Unión de la enzima con el substrato. Generalmente se cree que las enzimas se combinan con los substratos sobre los cuales actúan. No se sabe bien si esta unión es física (adsorción) o química, pero lo que hasta ahora se conoce indica cierto tipo de complejo inestable entre el catalizador y el substrato. Por ejemplo, si se añade peróxido de hidrógeno a catalasa, el compuesto se descompone rápidamente en agua y oxígeno molecular; pero si la enzima se trata primero con azida sódica, que restringe su actividad, el peróxido tarda en descomponerse. El complejo catalasa-azida muestra un amplio espectro de absorción, con bandas en 6240, 5440 y 5065 Å; al agregar peróxido de hidrógeno, el espectro cambia, y presenta dos bandas en 5880 y 5470 Å, y reaparece el primitivo una vez descompuesto todo el peróxido, para volver de nuevo al de dos bandas cuando se añade más substrato. Estos resultados parecen indicar que la enzima reacciona en cierto modo con su substrato específico.

Grupos prostéticos. Algunas enzimas han resultado estar compuestas enteramente de proteína; otras contienen una fracción no proteínica en sus moléculas. Las enzimas de este segundo tipo son proteínas conjugadas, y la fracción no proteínica se conoce por grupo prostético, el cual se supone firmemente fijado a la fracción proteínica de la molécula, en contraste con la unión entre la enzima y el substrato, que se consi-

dera como un complejo inestable. En algunos casos, por lo menos, los grupos prostéticos sirven de receptores y portadores de hidrógeno. La fracción proteínica de una enzima conjugada puede combinarse con el grupo prostético de otra, para dar una nueva enzima.

CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

La mayoría de las enzimas no se han purificado por cristalización, sino por precipitación y absorción. Como se siguen los mismos procedimientos para purificar proteínas, nunca se sabe cuándo están las enzimas realmente exentas de tales productos; por eso, las enzimas se clasifican más por su actividad que por su naturaleza. Por ejemplo, la lactasa hidroliza lactosa para producir glucosa y galactosa; la arginasa desdobla arginina en urea y ornitina; la adenasa convierte adenina en hipoxantina y amoníaco, etc. También se emplean nombres genéricos para grupos de enzimas, como esterasas, carbohidrasas, proteasas, deshidrogenasas y oxidasas. Es costumbre dar a la enzima un nombre similar al de la substancia que ataca, añadiendo el sufijo —asa. Las enzimas primeramente descubiertas, como pepsina, tripsina y renina, no se ajustan a esta terminología, pero son excepciones.

La clasificación de las enzimas se complica además porque nunca se sabe cuándo una preparación en examen contiene una sola. Muchas preparaciones que se creían compuestas de enzimas únicas han resultado más tarde integradas por más de una de ellas.

Número de enzimas. El agua contenida en las bacterias varía entre 70 y 98 %. Suponiendo que una célula bacteriana media es un cubo de 1,25 μ de lado, y que el diámetro de una partícula coloidal es del orden de 100 mμ (0,1 μ), es difícil concebir que una célula tan pequeña como la de una bacteria pueda albergar más de 100 enzimas diferentes. Los trabajos sobre deshidrogenasas bacterianas indican que es mejor admitir, no la presencia de muchas enzimas distintas, sino la de un grupo activo situado en la superficie celular, o cerca de ella, con algún otro factor, como la absorción específica.

Prescindiendo de si las reacciones vitales provienen de una o de varias enzimas, se considera esencial una clasificación para comprender mejor esta materia. La tabla 21 no es perfecta, pero muestra el método seguido para denominar y clasificar las enzimas. Se han incluído en ellas las reacciones químicas, hasta donde ello es posible.

TABLA 21. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

A) Esterasas.
Las esterasas catalizan la reacción reversible

$$R{\cdot}COOR' + H_2O \rightleftharpoons R{\cdot}COOH + R'OH$$

El ácido puede ser uno graso, superior o inferior; y R'OH, glicerina u otro alcohol alifático o aromático sencillo, o un carbohidrato.

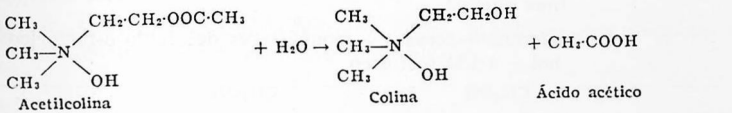
1. Butirasas + ésteres inferiores → alcoholes + ácidos grasos inferiores.

$$CH_3{\cdot}COO{\cdot}C_2H_5 + H_2O \rightarrow CH_3{\cdot}COOH + C_2H_5OH$$
Acetato de etilo — Ácido acético — Alcohol

2. Gliceridasas + glicéridos → glicerina + ácidos grasos superiores.

$$\begin{matrix}CH_2OOC{\cdot}C_{17}H_{33}\\ CHOOC{\cdot}C_{17}H_{33}\\ CH_2OOC{\cdot}C_{17}H_{33}\end{matrix} + 3H_2O \rightarrow \begin{matrix}CH_2OH\\ CHOH\\ CH_2OH\end{matrix} + 3C_{17}H_{33}{\cdot}COOH$$
Trioleína — Glicerina — Ácido oleico

3. Colinesterasa + acetilcolina ⇌ colina + ácido acético.



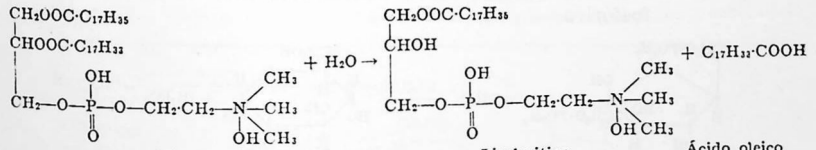
Acetilcolina — Colina — Ácido acético

4. Colesterinesterasa + ésteres de colesterina → colesterina + R·COOH.

5. Clorofilasa + clorofila A + alcohol → etilclorofílida + fitol.

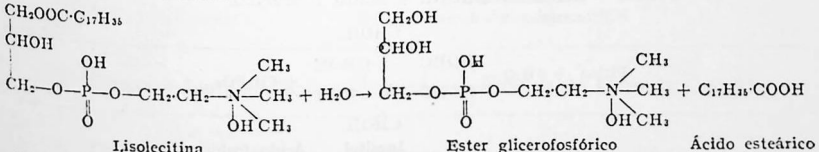
$$C_{32}H_{30}N_4MgO(COOCH_3){\cdot}COO{\cdot}C_{20}H_{39} + C_2H_5OH \rightarrow C_{32}H_{30}N_4MgO(COOCH_3){\cdot}COOC_2H_5 + C_{20}H_{39}OH$$
Clorofila A — Alcohol — Etilclorofílida — Fitol

6. Lecitinasas.
a) Lecitinasa A + lecitina → lisolecitina + ácido oleico.



Lecitina — Lisolecitina — Ácido oleico

b) Lecitinasa B + lisolecitina → éster glicerofosfórico + ácido esteárico.



Lisolecitina — Éster glicerofosfórico — Ácido esteárico

TABLA 21. *(Continuación.)*

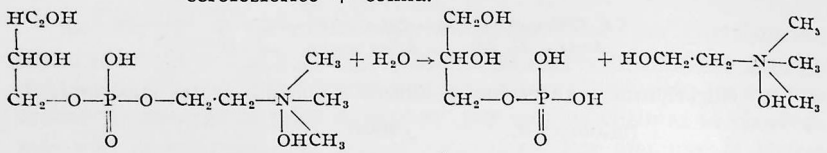
7. Pectasa + pectina → ácido péctico + alcohol metílico.

$$(R\cdot COOCH_3)_n + (H_2O)_n \rightarrow (R\cdot COOH)_n + (CH_3OH)_n$$

Pectina — Ácido péctico — Alcohol metílico

8. Fosfatasas.

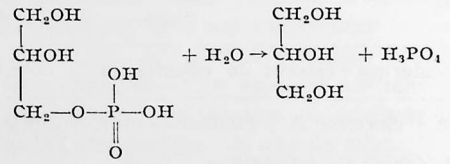
a) Esterasa glicerofosfórica + éster glicerofosfórico → ácido glicerofosfórico + colina.



Éster glicerofosfórico — Ácido glicerofosfórico — Colina

a) Las fosfomonoesterasas constan de una cofosfatasa (coenzima) y una apofosfatasa (vehículo). La coenzima de una enzima puede combinarse con el vehículo de otra para dar dos enzimas nuevas.

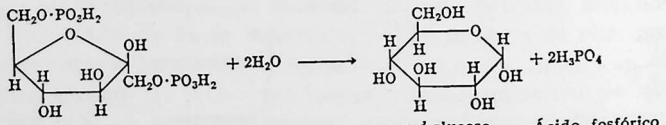
Fosfomonoesterasas + monoésteres del ácido *o*-fosfórico → alcohol + ácido fosfórico.



Ácido glicerofosfórico — Glicerina — Ácido fosfórico

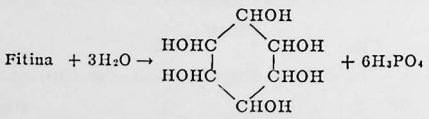
c) Fosfodiesterasa + diésteres del ácido fosfórico → alcohol + monoéster.

d) Hexosadifosfatasa + ácido hexosadifosfórico → hexosa + ácido fosfórico.



1,6-difosfato de hexosa — α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa) — Ácido fosfórico

e) Fitasa + fitina → inosita + ácido fosfórico.



Inositol — Ácido fosfórico

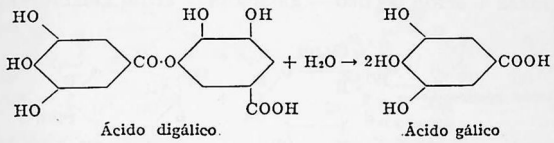
TABLA 21. *(Continuación.)*

9. Sulfatatasas + sulfatos etéreos → fenoles + bisulfato potásico.

$$C_6H_5O\cdot SO_3K + H_2O \rightarrow C_6H_5OH + KHSO_4$$

Fenilsulfato potásico — Fenol — Bisulfato potásico

10. Tanasa + taninos (ésteres de polihidroxifenoles con ácidos aromáticos) → ácido gálico.



Ácido digálico — Ácido gálico

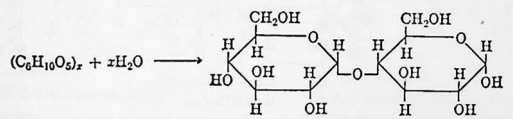
B) Carbohidrasas.

Las carbohidrasas catalizan la hidrólisis de los carbohidratos a productos más sencillos y generalmente más solubles.

1. Amilasas.

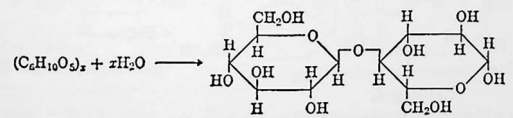
a) α-amilasa + almidón → dextrina + α-maltosa.

b) β-amilasa + almidón → α-maltosa



α-maltosa
α-*d*-glucosa-4-(α-*d*-glucopiranósido)

2. Celulasa + celulosa → β-celobiosa.



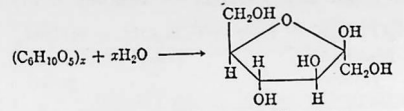
β-celobiosa
β-*d*-glucosa-4-(β-*d*-glucopiranósido)

3. Citasa + hemicelulosas → azúcares sencillos de fórmula $C_6H_{12}O_6$.

4. Liquenasa + liquenina → glucosa.

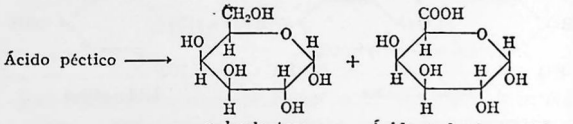
TABLA 21. *(Continuación.)*

5. Inulasa + inulina → *d*-fructosa (levulosa).



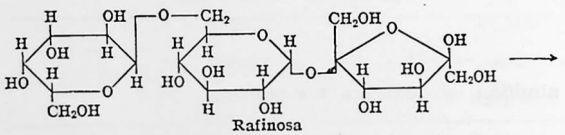
Inulina — *d*-fructosa (β-*d*-fructofuranosa)

6. Pectinasa + ácido péctico → galactosa + ácido galacturónico.

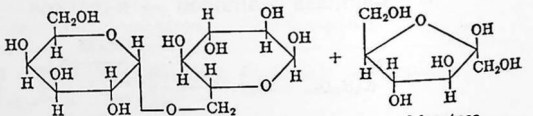


Ácido péctico — α-*d*-galactosa (α-*d*-galactopiranosa) — Ácido α-*d*-galacturónico

7. Rafinasa + rafinosa → melibiosa + *d*-fructosa.



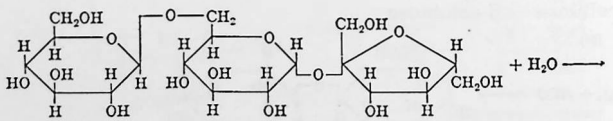
Rafinosa
6-(α-*d*-galactopiranosil)-α-*d*-glucopiranosil-β-*d*-fructofuranósido



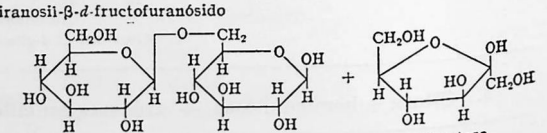
α-melibiosa
d-glucosa-6-(α-*d*-galactopiranósido)

d-fructosa (β-*d*-fructofuranosa)

8. Gencianasa + gencianosa → α-genciobiosa + *d*-fructosa.



Gencianosa
6-(β-*d*-glucopiranosil)-α-*d*-glucopiranosil-β-*d*-fructofuranósido

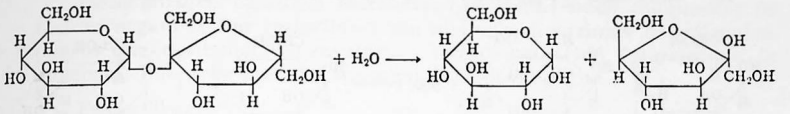


Genciobiosa
d-glucosa-6-(β-*d*-glucopiranósido)

d-fructosa (β-*d*-fructofuranosa)

TABLA 21. *(Continuación.)*

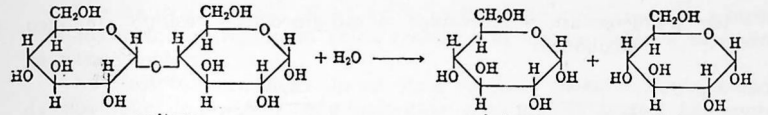
9. Sacarasa (invertasa) + sacarosa → α-*d*-glucosa + *d*-fructosa.



Sacarosa
(α-*d*-glucopiranosil-β-*d*-fructofuranósido)

α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa) — *d*-fructosa (β-*d*-fructofuranosa)

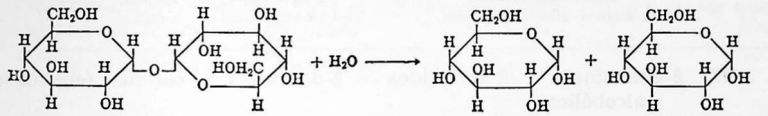
10. Maltasa + α-maltosa → α-*d*-glucosa + α-*d*-glucosa.



α-maltosa
d-glucosa-4-(α-*d*-glucopiranósido)

α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa) — α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa)

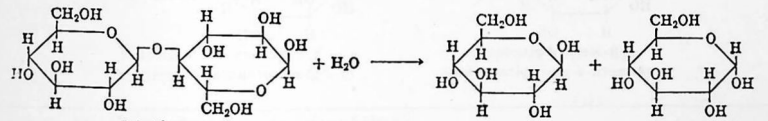
11. Trehalasa + trehalosa → α-*d*-glucosa + α-*d*-glucosa.



Trehalosa
α-*d*-glucopiranosil-α-*d*-glucopiranósido

α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa) — α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa)

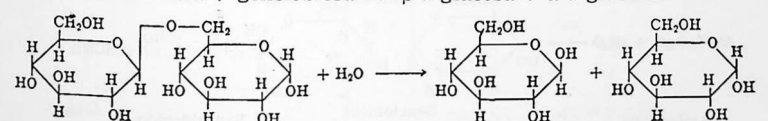
12. Celobiasa + α-celobiosa → β-*d*-glucosa + α-*d*-glucosa.



Celobiosa
d-glucosa-4 (β-*d*-glucopiranósido)

β-*d*-glucosa (β-*d*-glucopiranosa) — α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa)

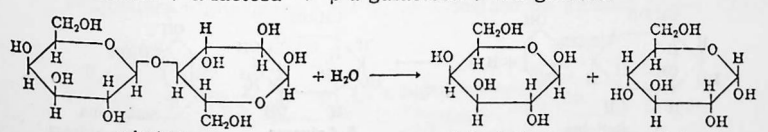
13. Genciobiasa + genciobiosa → β-*d*-glucosa + α-*d*-glucosa.



Genciobiosa
d-glucosa-6-(β-*d*-glucopiranósido)

β-*d*-glucosa (β-*d*-glucopiranosa) — α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa)

14. Lactasa + α-lactosa → β-*d*-galactosa + α-*d*-glucosa.

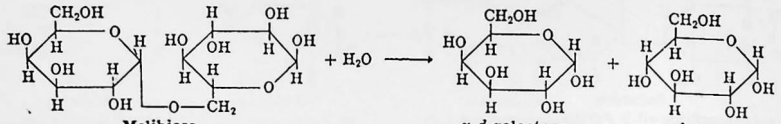


α-lactosa
d-glucosa-4-(β-*d*-galactopiranósido)

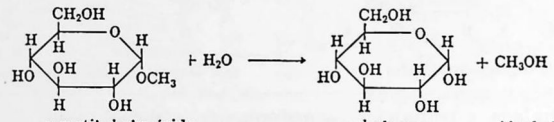
β-*d*-galactosa (β-*d*-galactopiranosa) — α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa)

TABLA 21. *(Continuación.)*

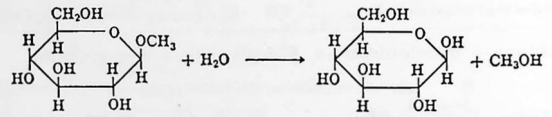
15. Melibiasa + melibiosa → α-*d*-galactosa + α-*d*-glucosa.



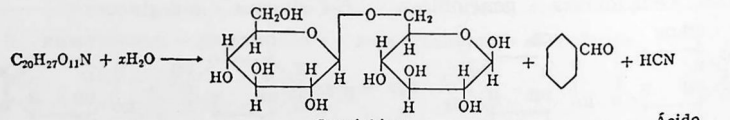
16. α-glucosidasa + glucósidos → α-*d*-glucosa + residuo fenólico o alcohólico.



17. β-glucosidasa + β-glucósidos → β-*d*-glucosa + residuo fenólico o alcohólico.



18. Amigdalasa + amigdalina → gencibiosa + benzaldehido + ácido cianhídrico.



19. Emulsina + salicina → saligenina + β-*d*-glucosa.

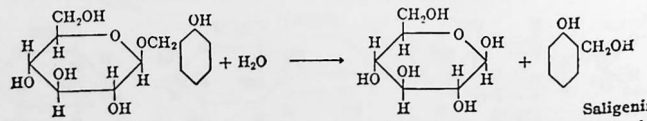


TABLA 21. *(Continuación.)*

C) Enzimas del metabolismo de carbohidratos.

Estas enzimas catalizan reacciones que comprenden compuestos de fósforo orgánico. Las fosforilasas son análogas a enzimas hidrolizantes, puesto que desdoblan el substrato; introducen ácido fosfórico en la molécula, mientras que las segundas introducen agua.

Fosforólisis:

$$RO{\cdot}R' + H_3PO_4 \rightarrow RO{\cdot}PO_3H_2 + R'{\cdot}OH$$

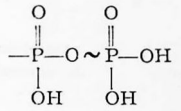
Hidrólisis:

$$RO{\cdot}R' + H_2O \rightarrow RO{\cdot}H + R'{\cdot}OH$$

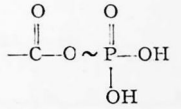
Las transfosforilasas llevan ácido fosfórico de un compuesto a otro. Las fosfomutasas trasladan ácido fosfórico de una posición a otra, en la misma molécula.

Las fosfoisomerasas producen otros cambios en la molécula, como la conversión de un compuesto fosfocetónico en fosfoaldehídico. Los compuestos de fósforo orgánico pueden dividirse en dos grupos: 1.º, los que tienen enlaces débiles de fosfato, y 2.º, los que tienen enlaces fuertes de fosfato. Ejemplos del primer grupo son fosfatos de hexosa, de pentosa, de triosa, glicerofosfatos, etc.; el segundo comprende cuerpos en los que el residuo de fosfato está unido

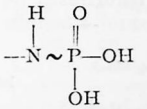
a) a otro residuo de fosfato:



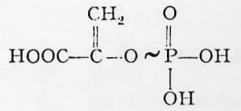
b) A un carboxilo:



c) A un residuo de guanidina:



d) A un enol ácido:



1. Fosforilasa + °glucógeno + H_3PO_4 ⇌ 1-fosfato de glucosa (éster Cori).

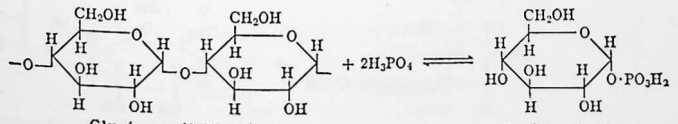
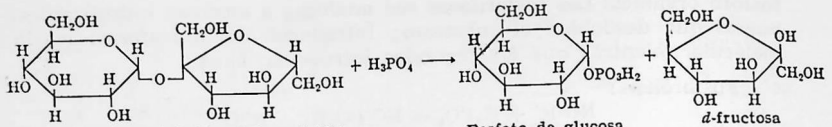


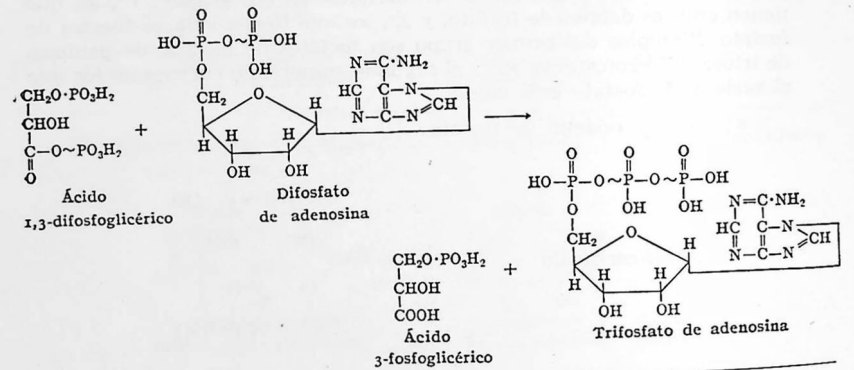
TABLA 21. *(Continuación.)*

2. Fosforilasa de sacarosa + sacarosa + H_3PO_4 → fosfato-1-de glucosa + fructosa.



3. Transfosforilasas de fosfocarboxilo + ácido 1,3-difosfoglicérico + difosfato de adenosina → ácido 3-fosfoglicérico + trifosfato de adenosina.

Estas enzimas transfieren residuos de ácido fosfórico de un grupo carboxilo fosforilado a difosfato o monofosfato de adenosina (ácido adenílico).



4. Transfosforilasas de fosfoguanidina + arginina + trifosfato de adenosina → fosfato de arginina + difosfato de adenosina.

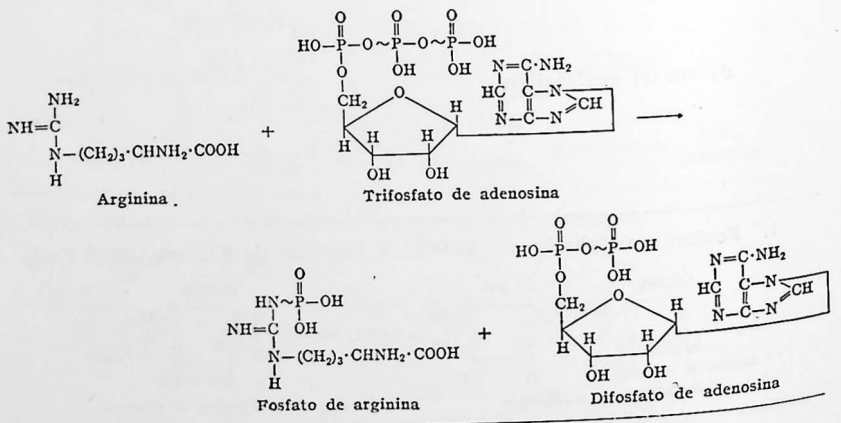
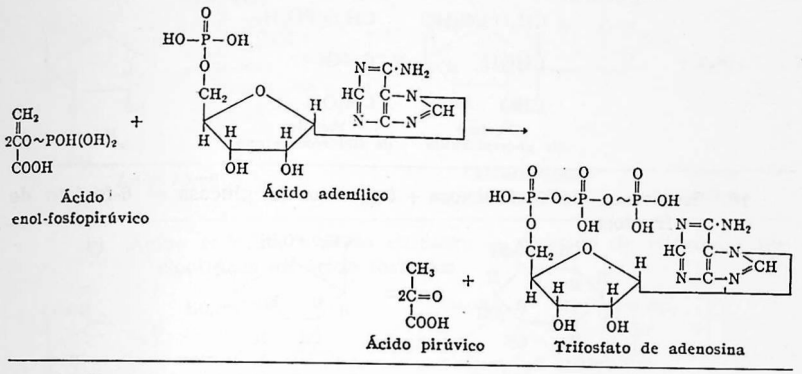
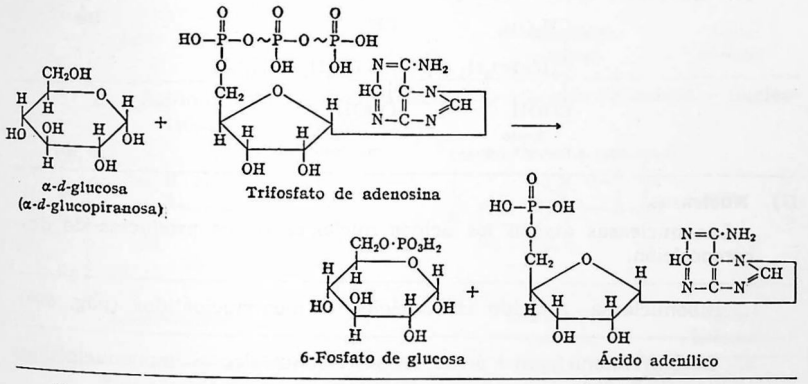


TABLA 21. *(Continuación.)*

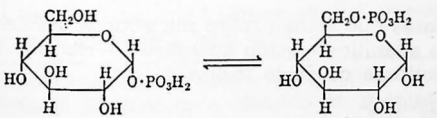
5. Transfosforilasa de fosfoenol + ácido enol-fosfopirúvico + ácido adenílico → ácido pirúvico + trifosfato de adenosina.



6. Hexocinasa + trifosfato de adenosina + glucosa → ácido adenílico + 6-fosfato de glucosa.



7. Fosfoglucomutasa + 1-fosfato de glucosa ⇌ 6-fosfato de glucosa.



8. Fosfogliceromutasa + ácido 3-fosfoglicérico ⇌ ácido 2-fosfoglicérico.

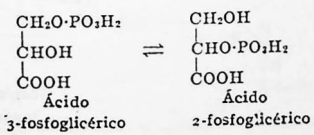
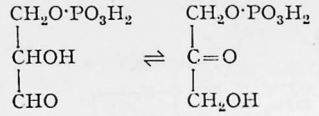


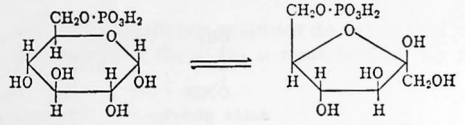
TABLA 21. *(Continuación.)*

9. Isomerasa de fosfotriosa + fosfato 3 de gliceraldehido ⇌ fosfato de dihidroxiacetona.



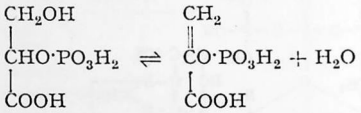
3-Fosfato de gliceraldehido — Fosfato de dihidroxiacetona

10. Isomerasa de fosfohexosa + 6-fosfato de glucosa ⇌ 6-fosfato de fructosa.



6-Fosfato de glucosa — 6-Fosfato de fructosa

11. Enolasa + ácido 2-fosfoglicérico ⇌ ácido fosfopirúvico (enol).



Ácido 2-fosfoglicérico — Ácido enol-fosfopirúvico

D) Nucleasas.

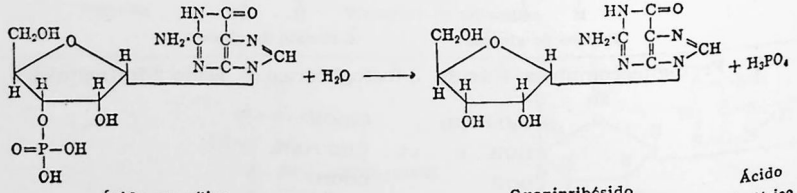
Las nucleasas atacan los ácidos nucleicos o sus productos de descomposición.

1. Ribonucleasa + ácido ribonucleico → mononucleótidos (pág. 690).

2. Desoxirribonucleasa + ácido desoxirribonucleico → mononucleótidos (pág. 690).

3. Nucleotidasas que actúan sobre nucleótidos del ácido nucleico.

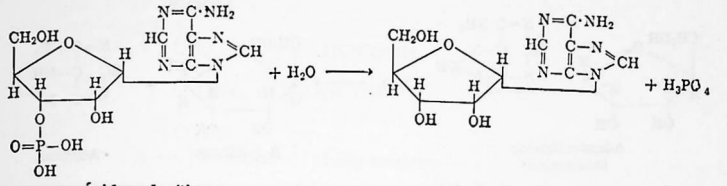
a) Ácido guanílico + ácido guanílico → ribósido de guanina + nucleotidasa de ácido fosfórico.



Ácido guanílico — Guaninribósido (guanosina) — Ácido fosfórico

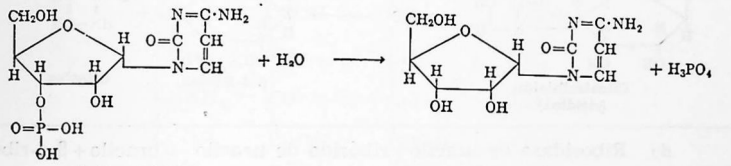
TABLA 21. *(Continuación.)*

b) Ácido adenílico + ácido adenílico → ribósido de adenina + nucleotidasa de ácido fosfórico.



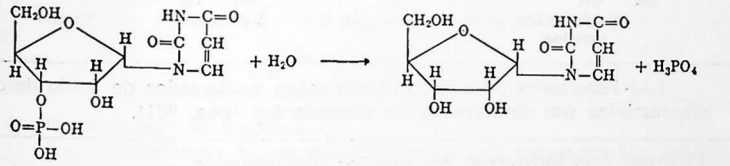
Ácido adenílico — Adeninribósido (adenosina) — Ácido fosfórico

c) Ácido citidílico + ácido citidílico → ribósido de citosina + nucleotidasa de ácido fosfórico.



Ácido citidílico — Citosinribósido (citidina) — Ácido fosfórico

d) Ácido uridílico + ácido uridílico → ribósido de uracilo + nucleotidasa de ácido fosfórico.

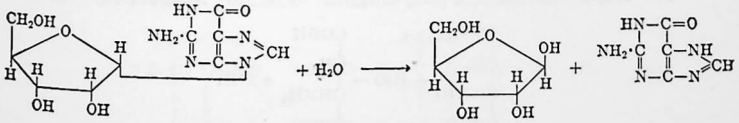


Ácido uridílico — Uracilribósido (uridina) — Ácido fosfórico

Las reacciones de nucleotidasas sobre nucleótidos de ácido desoxirribonucleico son similares a las precedentes, si bien se cree que el ácido fosfórico está ligado al carbono 5 (grupo alcohol primario) de la molécula de azúcar, y no al carbono 3 (pág. 661).

4. Nucleosidasas que actúan sobre nucleósidos de ácido ribonucleico.

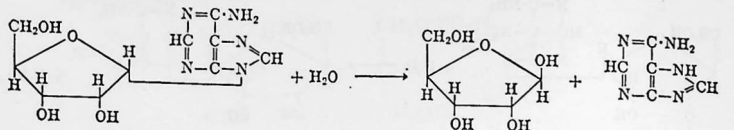
a) Ribosidasa de guanina + ribósido de guanina → guanina + β-*d*-ribosa.



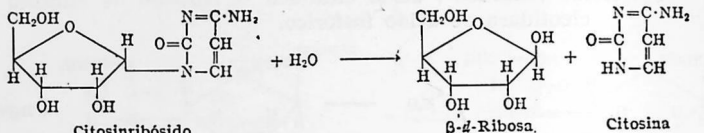
Guaninribósido (guanosina) — β-*d*-ribosa — Guanina

TABLA 21. *(Continuación.)*

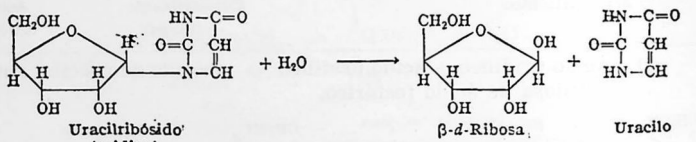
b) Ribosidasa de adenina + ribósido de adenina → adenina + β-*d*-ribosa.



c) Ribosidasa de citosina + ribósido de citosina → citosina + β-*d*-ribosa.



d) Ribosidasa de uracilo + ribósido de uracilo → uracilo + β-*d*-ribosa

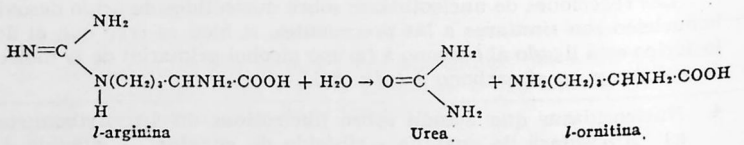


Las reacciones de nucleosidasas sobre nucleósidos de ácido desoxiribonucleico son similares a las precedentes (pág. 661).

E) Enzimas que hidrolizan compuestos nitrogenados.

1. Amidasas.

a) Arginasa + *l*-arginina → urea + *l*-ornitina.



b) Asparaginasa + *l*-βasparagina → ácido *l*-aspártico + amoníaco.

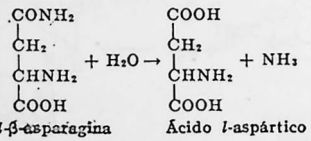
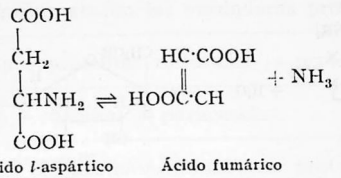
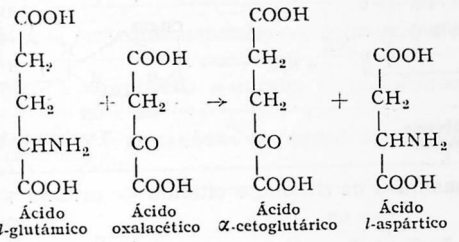


TABLA 21. *(Continuación.)*

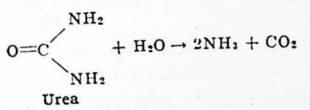
e) Ureasa + urea ⇌ amoníaco + dióxido de carbono.



d) Transaminasa + ácido glutámico → grupo amino transferido a algún residuo carbohidrato reactivo.



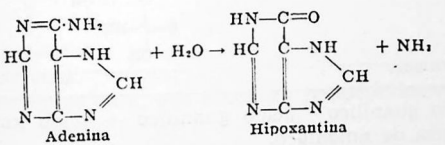
e) Ureasa + urea → amoníaco + dióxido de carbono.



2. Desaminasas de nucleína.

Las desaminasas de nucleína producen una desaminación oxidante de purinas y pirimidinas, libres o combinadas.

a) Adenasa + adenina → hipoxantina + amoníaco.



b) Guanasa + guanina → xantina + amoníaco.

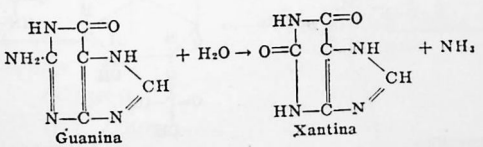
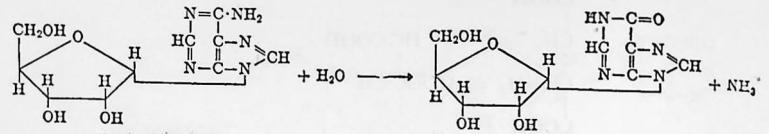
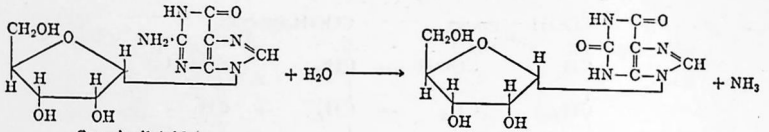


TABLA 21. *(Continuación.)*

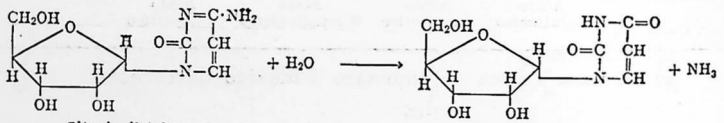
c) Desaminasa de adenosina + adenosina → hipoxantoxina + amoníaco.



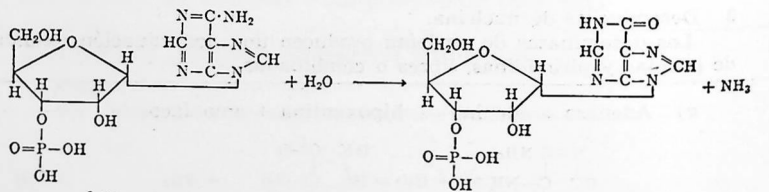
d) Desaminasa de guanosina + guanosina → xantosina + amoníaco.



e) Desaminasa de citidina + citidina → uridina + amoníaco.



f) Ácido adenílico + ácido adenílico → ácido hipoxantílico + amoníaco.



g) Ácido guanílico + ácido guanílico → ácido xantílico + desaminasa de amoníaco.

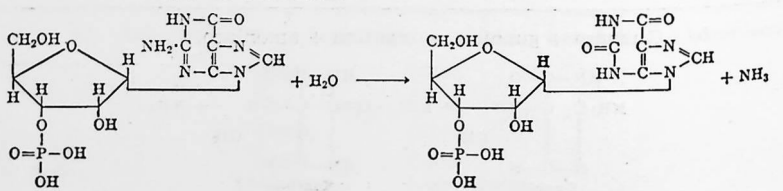


TABLA 21. *(Continuación.)*

3. Proteinasas.

Las proteinasas atacan las verdaderas proteínas.

a) Pepsina + proteínas naturales → proteosas + peptonas.

b) Renina + caseína → paracaseína.

c) Tripsina + proteínas naturales, proteosas, peptonas y péptidos → aminoácidos y polipéptidos.

d) Erepsina + proteosas, peptonas y polipéptidos → aminoácidos.

e) Papaína + proteínas naturales → polipéptidos y dipéptidos.

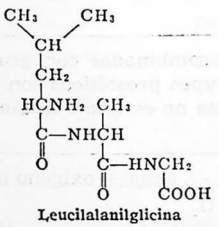
f) Bromelina + proteínas naturales → polipéptidos y dipéptidos.

g) Protaminasa + protaminas con grupo de arginina final → arginina + residuo.

4. Peptidasas.

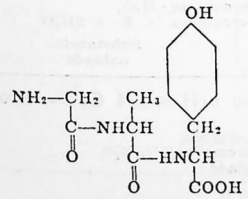
Las peptidasas hidrolizan polipéptidos y dipéptidos a la fase de aminoácidos. Son capaces de atacar también los enlaces péptidos de proteína, si se satisfacen ciertas condiciones estructurales.

a) Aminopolipeptidasa, que ataca el aminoácido del extremo amínico de una cadena de polipéptido.



Por hidrólisis queda libre el aminoácido leucina.

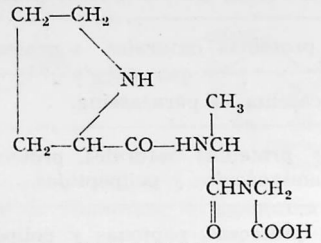
b) Carboxipeptidasa, que ataca los polipéptidos con grupos carboxilo libres.



Por hidrólisis queda libre el aminoácido tirosina.

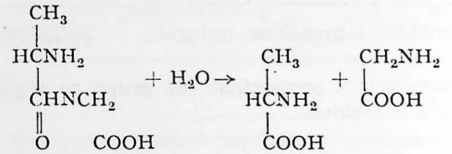
TABLA 21. *(Continuación.)*

c) Prolinasa, que ataca la prolina del extremo imínico de una cadena de péptido.



Prolilalanilglicina

d) Dipeptidasa + dipéptidos → aminoácidos.



Alanilglicina — Alanina — Glicina

F) Enzimas que intervienen en reacciones de oxidación-reducción.

1. Oxidasas.

Las verdaderas oxidasas activan oxígeno para que éste oxide con rapidez compuestos lentamente autooxidables; son proteínas metálicas, que inhibe o envenena el sulfuro de hidrógeno, y también el cianuro potásico. No forman peróxido de hidrógeno por reducción de oxígeno y sólo son activas en condiciones aerobias.

Las oxidasas del hierro son enzimas combinadas con grupos prostéticos que contienen este metal; estos grupos prostéticos son hematina o substancias muy afines a ella. La catalasa no es una oxidasa genuina, pero se incluye aquí por conveniencia.

a) Catalasa + peróxido de hidrógeno → agua + oxígeno molecular.

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

Peróxido de hidrógeno

b) Peroxidasa + peróxido de hidrógeno → agua + oxígeno atómico.

$$\text{Peroxidasa} + H_2O_2 \rightarrow \text{peroxidasa} \cdot H_2O_2$$
$$\text{Peroxidasa} \cdot H_2O_2 + RH_2 \rightarrow \text{peroxidasa} + R + 2H_2O$$

Compuesto de enzima y peróxido — Substancia oxidable — Substancia oxidada

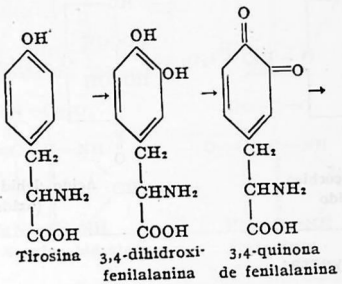
c) Oxidasa de citocromo + citocromo c·H + 1/4 O_2 → citocromo. c + $^1/_2$ H_2O.

1. Citocromo c · H + $^1/_4$ O_2 → citocromo c + $^1/_2$ H_2O
   Reducido — Oxidado
2. Citocromo c + H → citocromo c · H
   Oxidado — Reducido

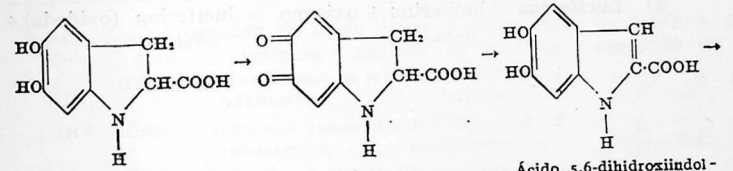
TABLA 21. *(Continuación.)*

Las oxidasas del cobre son enzimas que contienen en su molécula cobre en vez de hierro.

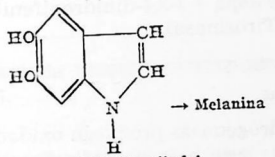
a) Tirosinasa (oxidasa de polifenol) + tirosina → melanina (pigmento negro).



Tirosina — 3,4-dihidroxi-fenilalanina — 3,4-quinona de fenilalanina

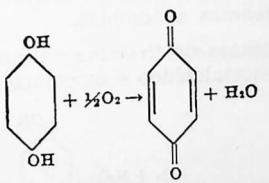


Ácido 5,6-dihidroxi-dihidroindol-2-carboxílico — Halocromo — Ácido 5,6-dihidroxiindol-carboxílico



5,6-dihidroxiindol

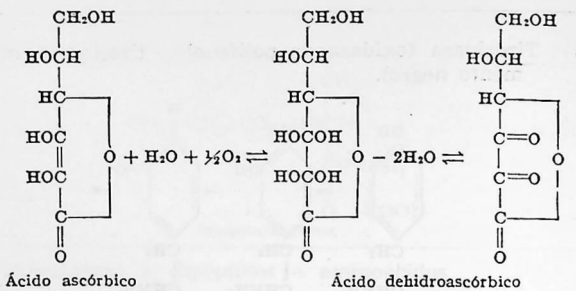
b) Lacasa + fenoles → orto- y paraquinonas.



p-dihidroxibenceno — Quinona

TABLA 21. *(Continuación.)*

c) Oxidasa de ácido ascórbico + ácido *l*-ascórbico ⇌ ácido ascórbico oxidado.



Ácido ascórbico reducido — Ácido dehidroascórbico (oxidado)

Oxidasas diversas.

a) Luciferasa + luciferina + oxígeno → luciferina (oxidada) + luz.
(reducido) (oxidado)

1. Luciferina + 2 H (de un donador) → luciferina · 2 H
(oxidada) (reducida)
2. Luciferina · 2 H + luciferasa → luciferina + luciferasa · 2 H
(reducida) (oxidada)
3. Luciferasa · 2 H + O_2 → luciferasa + H_2O_2 + luz

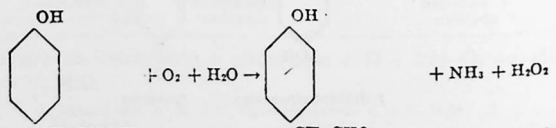
b) Oxidasa de dopa + *l*-3,4-dihidroxifenilalanina (dopa) → melanina (véase Tirosinasa).

2. Deshidrogenasas.

Las deshidrogenasas producen oxidaciones por retirar hidrógeno de metabolitos; este hidrógeno tiene que ser aceptado por oxígeno o una substancia reductora apropiada para que se produzca oxidación. Las deshidrogenasas aerobias no requieren coenzimas ni sistemas citocromo, mientras que las anaerobias catalizan reacciones entre metabolitos y vehículos o portadores.

Deshidrogenasas anaerobias.

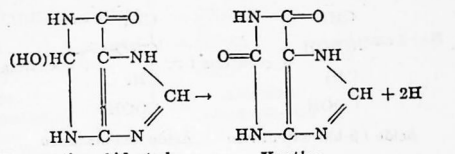
a) Deshidrogenasa de tiramina + tiramina + oxígeno → parahidroxifenil-acetaldehido + amoníaco + peróxido de hidrógeno.



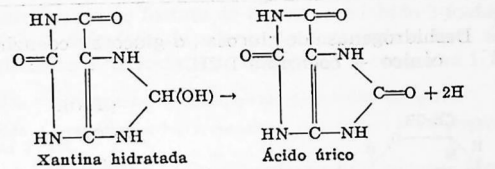
Tiramina — Parahidroxifenil-acetaldehido

TABLA 21. *(Continuación.)*

b) Deshidrogenasa de xantina + xantina e hipoxantina → ácido úrico.

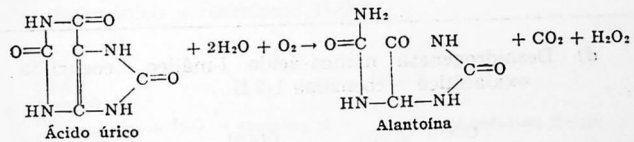


Hipoxantina hidratada — Xantina



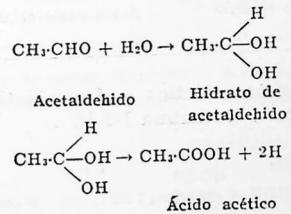
Xantina hidratada — Ácido úrico

c) Deshidrogenasa de ácido úrico + ácido úrico + $2H_2O$ + oxígeno → alantoína + dióxido de carbono + peróxido de hidrógeno.



Ácido úrico — Alantoína

d) Deshidrogenasa de aldehidos + aldehidos + H_2O → ácido respectivo + 2 H.



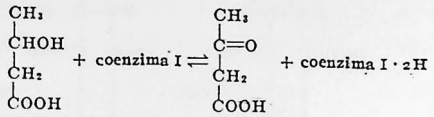
Deshidrogenasas anaerobias.
Ligadas a coenzima I.

a) Deshidrogenasa de alcoholes + alcoholes + coenzima I ⇌ aldehidos + coenzima 1·2 H.

R · CH_2OH + coenzima 1 ⇌ R · CHO + coenzima I · 2H
Alcohol — Aldehido

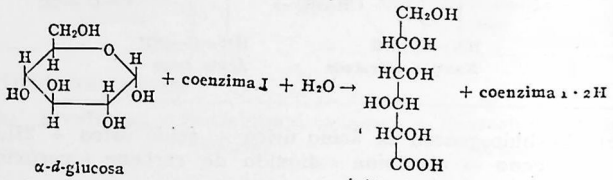
TABLA 21. *(Continuación.)*

b) Deshidrogenasa de ácido β-hidroxibutírico + ácido *l*-β-hidroxibutírico + coenzima I ⇌ ácido acetoacético + coenzima I·2H.



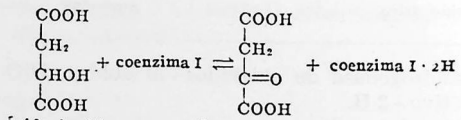
Ácido *l*-β-hidroxibutírico — Ácido acetilacético

c) Deshidrogenasa de glucosa + *d*-glucosa + coenzima I → ácido *d*-glucónico + coenzima I·2H.



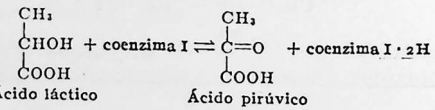
α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa) — Ácido *d*-glucónico

d) Deshidrogenasa málica·ácido *l*-málico + coenzima I ⇌ ácido oxalacético + coenzima I·2 H.



Ácido *l*-málico — Ácido oxalacético

e) Deshidrogenasa láctica + ácido láctico + coenzima I ⇌ ácido pirúvico + coenzima I·2 H.



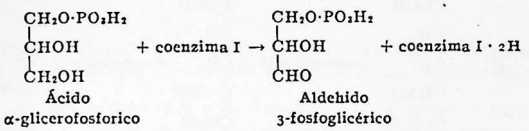
Ácido láctico — Ácido pirúvico

Esquema para la reducción *in vitro* de azul de metileno:

1. Acido láctico + coenzima I → ácido pirúvico + coenzima I · 2 H.
2. Coenzima I · 2 H + diaforasa → coenzima I + diaforasa · 2 H.
3. Diaforasa · 2 H + azul de metileno → diaforasa + azul de metileno · 2 H (incoloro)
4. Azul de metileno · 2 H + O_2 → azul de metileno (colorado) + H_2O_2

TABLA 21. *(Continuación.)*

f) Deshidrogenasa α-glicerofosfórica + ácido α-glicerofosfórico + coenzima I → aldehido 3-fosfoglicérico + coenzima I·2H.



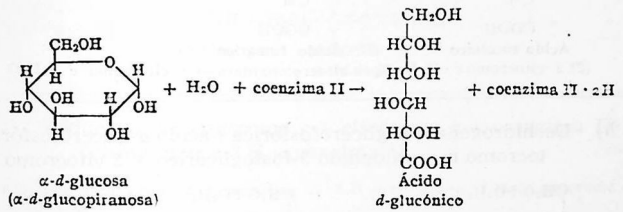
Ácido α-glicerofosforico — Aldehido 3-fosfoglicérico

g) Deshidrogenasa de fosfato de triosa + aldehido 3-fosfoglicérico + H_3PO_4 + difosfato de adenosina + coenzima I ⇌ ácido 3-fosfoglicérico + trifosfato de adenosina + coenzima 1·2 H.

1. Aldehido 3-fosfoglicérico + H_3PO_3 ⇌ aldehido 3-difosfoglicérico
2. Aldehido 1,3-difosfoglicérico + coenzima I ⇌ ácido 1,3 difosfoglicérico + coenzima I · 2H.
3. Acido 1,3-difosfoglicérico + disulfato de adenosina ⇌ ácido 3-fosfoglicérico + trifosfato de adenosina

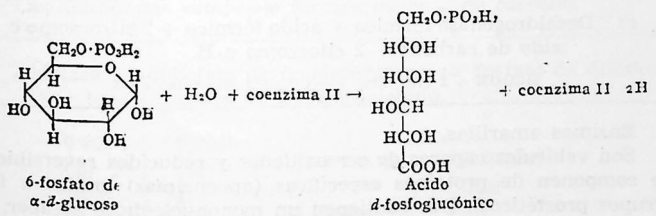
Ligadas a coenzima II.

a) Deshidrogenasa de glucosa + *d*-glucosa + coenzima II → ácido *d*-glucónico + coenzima II·2 H.



α-*d*-glucosa (α-*d*-glucopiranosa) — Ácido *d*-glucónico

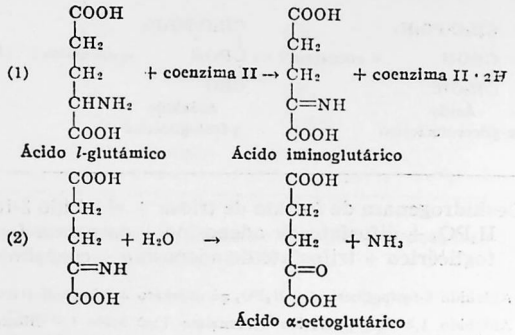
b) Deshidrogenasa de éster Robison + 6-fosfato de hexosa + coenzima II → ácidofosfohexónico + coenzima II·2 H.



6-fosfato de α-*d*-glucosa — Acido *d*-fosfoglucónico

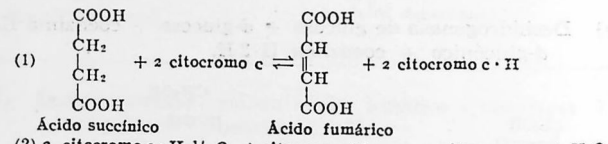
TABLA 21. *(Continuación.)*

c) Deshidrogenasa de ácido glutámico + ácido *l*-glutámico + coenzima II → ácido α-cetoglutárico + coenzima II·2 H.



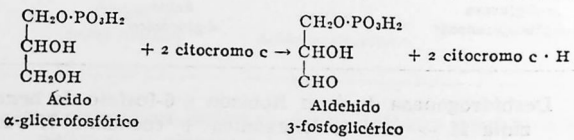
Ligadas a citocromo c.

a) Deshidrogenasa succínica + ácido succínico + citrocromo c ⇌ ácido fumárico + citocromo c·H.



(2) 2 citocromo c · H $^1/_2$ O_2 + citocromoxidasa → 2 citocromo c + H_2O

b) Deshidrogenasa α-glicerofosfórica + ácido α-glicerofosfórico + 2 citocromo c → aldehido 3-fosfoglicérico + 2 citocromo c·H.



c) Deshidrogenasa fórmica + ácido fórmico + 2 citrocromo c → dióxido de carbono + 2 citocromo c·H.

HCOOH + 2 citocromo c → CO_2 + 2 citocromo c · H

3. Enzimas amarillas.

Son vehículos capaces de ser oxidados y reducidos reversiblemente. Se componen de proteínas específicas (apoenzimas) unidas a flavinas (grupos prostéticos). Dos contienen un mononucleótido, a saber, la enzima amarilla antigua y la reductasa de citocromo; las otras contienen una flavina de dinucleótido. Las enzimas amarillas son deshidrogenadas, pero se clasifican aparte por contener flavinas.

TABLA 21. *(Continuación.)*

a) Enzima amarilla antigua (fosfato de riboflavina + proteína) + oxígeno + coenzima II·2 H → peróxido de hidrógeno + coenzima II.

Ejemplo:

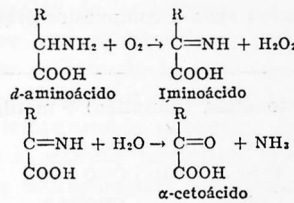
1. Monofosfato de hexosa + coenzima II → ácido fosfohexónico + coenzima II · 2H
2. Enzima amarilla antigua + coenzima II · 2 H → enzima amarilla antigua · 2 H + coenzima II
3. Enzima amarilla antigua · 2 H + O_2 → enzima amarilla antigua + H_2O_2

b) Diaforasas + coenzima I·2 H o coenzima II·2 H + oxígeno + vehículos apropiados → coenzima I o coenzima II + peróxido de hidrógeno.

Ejemplo:

1. Diaforasa + coenzima I · 2 H → diaforasa · 2H + coenzima I
2. Diaforasa · 2 H + 2 azul de metileno → diaforasa + 2 azul de metileno · H (incoloro)
3. 2 azul de metileno · H + O_2 → 2 azul de metileno + H_2O_2

c) Deshidrogenasa de *d*-aminoácidos + *d*-aminoácidos → α-cetoácidos.



d) Reductasa de citocromo c + citocromo c + coenzima II·2 H → citrocromo c·2 H + coenzima II.

1. Reductasa de citocromo c + coenzima II · 2 H → reductasa · 2 H de citocromo c + coenzima II
2. Reductasa · 2 H de citocromo c + 2 citocromo c → reductasa de citocromo c + 2 citocromo c · H

G) Desmolasas.

Las desmolasas rompen o forman cadenas de carbono.

1. Aldolasa 1,6-difosfato de fructofuranosa ⇌ fosfato de dihidroxiacetona + fosfato de 3-gliceraldehido.

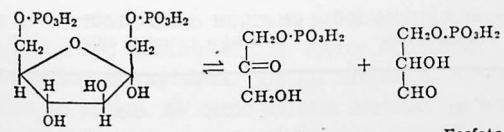
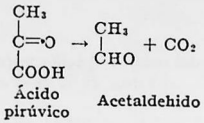
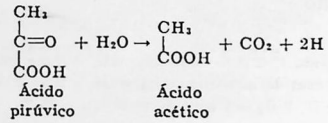


TABLA 21. *(Continuación.)*

2. Carboxilasa + cocarboxilasa + ácido pirúvico → acetaldehido + dióxido de carbono.



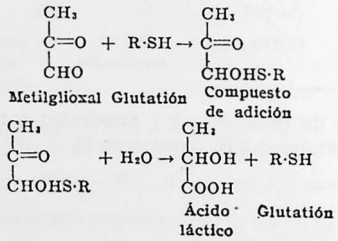
3. Deshidrogenasa pirúvica + cocarboxilasa + ácido pirúvico → ácido acético + dióxido de carbono.



H) Hidrasas.

Las hidrasas añaden agua a compuestos orgánicos, sin provocar hidrólisis.

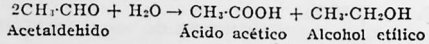
1. Glioxalasa + coglioxalasa (glutatión) + metilglioxal → ácido láctico.



I) Mutasas.

Las mutasas producen la reacción de Cannizzaro: una molécula de aldehido se oxida a ácido, y otra molécula se reduce a alcohol.

1. Mutasa de aldehidos + aldehido → ácido acético + alcohol



FACTORES QUE INFLUYEN EN LAS REACCIONES DE ENZIMAS

Las reacciones de enzimas dependen notablemente de diversos factores, como temperatura, pH, luz ultravioleta, activadores, inhibidores, concentración de la enzima y concentración del substrato, o sean los mismos que influyen en el desarrollo y la reproducción de los microorganismos. Pero las enzimas son más resistentes, en general, a condiciones adversas del medio que las células de donde provienen. Por ejemplo, calentando una levadura seca a 100° C durante seis horas, pierde su facultad de crecimiento y multiplicación, pero conserva la de fermentar azúcar para producir alcohol y dióxido de carbono.

Efecto de la temperatura. La velocidad de una reacción enzimática se acelera al aumentar la temperatura, y así prosigue hasta alcanzar un punto máximo; luego desciende gradualmente, y al final queda destruída la enzima. En general, la velocidad de estas reacciones se duplica por cada 10° C de elevación de la temperatura.

Cada enzima tiene una temperatura óptima característica; la máxima es aquella por encima de la cual una enzima no desarrolla actividad, y la mínima, aquella por debajo de la cual tampoco es capaz de actuar. Estas tres temperaturas dependen de varios factores, tales como concentración de la enzima, naturaleza y concentración del substrato, concentración de hidrogeniones del medio, y presencia de substancias activantes y paralizantes.

La mayoría de las enzimas en disolución son más o menos estables a temperaturas inferiores a 45° C, pero a más de 50° C aumenta rápidamente la inactivación al subir la temperatura. Constituyen también mayoría las que experimentan destrucción irreversible entre 70 y 80° C. Sin embargo, las enzimas secas son más resistentes a temperaturas que cuando están disueltas; por ejemplo, la renina seca se destruye sólo lentamente a 158° C.

Efecto del pH. La concentración de hidrogeniones de la solución influye francamente sobre las enzimas. Algunas actúan mejor en solución neutra; otras la prefieren alcalina, y las hay que no funcionan bien hasta que la reacción de sus soluciones es ácida. Para cada enzima existe, en ciertas condiciones específicas, un pH máximo, otro óptimo y otro mínimo, los cuales varían según el substrato, el tipo de atemperante empleado, y el tiempo durante el cual ejerce actividad.

Efecto de la luz ultravioleta. La luz ultravioleta destruye las enzimas o modifica su acción. El ritmo de esta destrucción no depende prácticamente de la temperatura, pero sí del pH y de algunas otras condiciones del ambiente.

Las enzimas purificadas son más sensibles a la acción destructiva de la luz que en preparaciones menos puras; las impurezas de los medios de cultivo, en particular proteínas y sus productos de desdoblamiento, pueden proporcionar una protección considerable. A mayor grado de purificación de una enzima corresponde regularmente una sensibilidad más pronunciada a los rayos luminosos tóxicos.

Las enzimas parecen ser sensibles a rayos luminosos de longitudes de onda iguales a los que afectan a células vivas. Los rayos más tóxicos son los de 2650 Å, aproximadamente (pág. 186).

La adición de pequeñas cantidades de substancias fluorescentes, como la eosina, a soluciones de enzimas aumenta el efecto tóxico de los rayos luminosos.

Activadores e inhibidores. Algunas substancias aumentan la actividad de las enzimas, y otras producen el efecto contrario; las primeras se llaman activadores, e inhibidores las segundas. Tales substancias pueden ser específicas o inespecíficas.

Pepsina. La pepsina es una enzima proteolítica que actúa sobre enlaces peptídicos (hidrólisis), pero su actividad depende de la presencia de grupos tirosilo o fenilalanilo unidos al lado imínico del péptido ligado.

La enzima es activa sólo en soluciones ácidas. La forma inactiva se conoce por pepsinógeno, y se activa por adición de hidrogeniones; su máxima actividad corresponde a un pH aproximado de 1,6.

Una pepsina activa se puede inhibir añadiendo oxhidriliones (álcalis). Si la solución está ajustada a un pH superior a 6,8, la pepsina se inactiva lentamente.

Tripsina. La tripsina es una enzima proteolítica que actúa sobre enlaces peptídicos (hidrólisis), pero su actividad depende de la presencia de grupos lisilo o arginilo unidos al lado carbonílico del péptido ligado.

La enzima es activa solamente en soluciones alcalinas, y su pH óptimo es de 8 a 9. La tripsina es inactiva al producirse (tripsinógeno), y pasa a la fase activa por obra de una substancia conocida por enterocinasa.

Papainasas. Los dos representantes más corrientes del grupo son la catepsina y la papaína; la primera se encuentra en células animales, y la segunda en las vegetales, especialmente en la papaya, fruto del papayo. El pH óptimo de estas proteinasas oscila entre 4 y 7.

Se supone que una parte esencial de las enzimas activas está constituída por un grupo sulfhidrilo. La oxidación las inactiva, y una reducción restaura su actividad; pueden activarlas el sulfuro de hidrógeno, la cisteína, el glutatión y el ácido cianhídrico.

Catalasa. Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y éste puede servir de receptor de hidrógeno en reacciones de deshidrogenación. La catalasa es inestable en soluciones ácidas, y se destruye con pH 3. La inactivan el sulfuro de hidrógeno, la hidroxilamina, la azida sódica y el ácido cianhídrico, pero no la afectan el monóxido de carbono, el dióxido de carbono, la cisteína y el glutatión. Se digiere con facilidad, y queda destruída por digestión trípsica.

Ureasa. Esta enzima transforma la urea, por hidrólisis, en amoníaco y dióxido de carbono. Cuando no hay atemperantes, los dos productos se unen para formar carbamato amónico; si los hay, los productos son sales amónicas y ácido carbónico. La ureasa es una enzima específica, que sólo actúa sobre la urea.

Inactivan la ureasa el cloruro cúprico, el cloruro mercúrico y el nitrato argéntico, y puede ser reactivada por adición de sulfuro de hidrógeno; esto parece indicar que la enzima contiene un grupo sulfhidrilo. También pierde su actividad por obra de fluoruros, halógenos, boratos, quinonas, formaldehido, peróxido de hidrógeno y colorantes básicos. La enzima actúa mejor con un pH aproximado de 7.

Inactivación de enzimas mediante proteasas. Las enzimas proteolíticas producen, en general, una acción inhibitoria o destructiva sobre otras enzimas, lo cual es un indicio más de que son proteínas.

La pepsina y la papaína digieren rápidamente ureasa a un pH 4,3; la tripsina, en medio alcalino, digiere con facilidad maltosa. La pepsina y la tripsina digieren pronto renina, y la pepsina, a un pH 2, digiere con rapidez tripsina, que a su vez digiere fácilmente pepsina a un pH 8.

Éstos son unos pocos ejemplos de las muchas observaciones publicadas.

Efecto de la concentración de substrato y enzima. Un aumento de la concentración de substrato puede acelerar o retardar una reacción enzimática. Si esta concentración es pequeña con relación a la cantidad de enzima, al aumentar la cantidad de substrato se hace más rápida la reacción. Por ejemplo, la enzima sacarasa hidroliza la sacarosa y la convierte en glucosa y levulosa, a velocidad mayor cuando aumenta la concentración de sacarosa hasta 4 ó 5 %; por encima de ella, la cantidad relativa de azúcar hidrolizado se va haciendo menor en proporción a ese aumento. Puede deducirse de ello que una solución concentrada de azúcar de caña, al diluirla a un 5 %, será hidrolizada por sacarasa más eficazmente que otra más fuerte.

El tiempo necesario para que la sacarasa hidrolice azúcar de caña es proporcional a la concentración de enzima. En general, esto se aplica a todas las enzimas cuando la cantidad de enzima es muy inferior a la de substrato, de modo que puede combinarse con éste toda ella. En cambio, cuando se emplea enzima con exceso, la velocidad parece ser proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de enzima.

ESPECIFICIDAD DE LAS ENZIMAS

Los catalizadores inorgánicos, como níquel, platino y paladio, pueden catalizar muchas reacciones; en cambio, las enzimas muestran un grado mayor de especificidad respecto a los substratos. Esta especificidad puede ser absoluta, estereoquímica y relativa. Ejemplos de especificidad absoluta: las carbohidrasas no actúan sobre grasas o proteínas, sino únicamente sobre carbohidratos; las lipasas no atacan carbohidratos ni proteínas, sino sólo grasas; y las proteasas actúan sobre proteínas, pero no producen efecto sobre grasas o carbohidratos. Ejemplo de especificidad estereoquímica: la maltasa cataliza la hidrólisis de muchos α-glucósidos, pero su efecto es nulo sobre los β-glucósidos. Ejemplo de especificidad relativa: La β-glucosidasa hidroliza algunos β-glucósidos con rapidez mucho mayor que otros.

ACTIVIDADES SINTÉTICAS DE LAS ENZIMAS

Numerosas reacciones químicas se califican de reversibles. Lo característico de una reacción de este tipo es que se desarrolla en uno u otro sentido, hasta que se establece un equilibrio específico de la reacción y de la concentración de las substancias que en ella intervienen. Cualquier cambio en la concentración de tales substancias va seguido inmediatamente de una variación del equilibrio. Se sabe que muchas reacciones enzimáticas son de esta clase.

Síntesis de disacáridos. Doudoroff, Kaplan y Hassid (1943), Doudoroff (1943, 1945), Hassid, Doudoroff y Barker (1944), y Doudoroff, Hassid y Barker (1944), han comprobado que una preparación desecada del microorganismo *Pseudomonas saccharophilia* contenía una fosforilasa capaz de transformar sacarosa en 1-fosfato de glucosa y fructosa. Con 1-fosfato de glucosa y fructosa como substrato, se demostró la formación de sacarosa invirtiendo la reacción, y la sacarosa sintetizada resultó ser idéntica al azúcar natural. El mecanismo de la reacción es éste:

Trifosfato de adenosina + glucosa
↓
Difosfato de adenosina + 6-fosfato de glucosa.
⇅
1-fosfato de glucosa + fructosa ⇌ sacarosa + H_3PO_4

En una información posterior, Hassid, Doudorof, Barker y Dore (1945) señalaron que la enzima que sintetizaba sacarosa a partir de 1-fosfato de glucosa combinaba también este último cuerpo con *l*-sorbosa o *d*-cetoxilosa, para formar los correspondientes disacáridos.

Doudoroff, Wiame y Wolochow (1949) demostraron la presencia de una fosforilasa de sacarosa, fosfoglucomutasa y fosfohexoisomerasa en una preparación de células secas de otro microorganismo, *Pseudomonas putrefaciens*. El ciclo metabólico por el que este germen utiliza la glucosa de la sacarosa se indica así:

Sacarosa + fosfato ⇌ 1-fosfato de glucosa + fructosa
⇅
6-fosfato de glucosa
⇅
6-fosfato de fructosa

Síntesis de proteínas. Bergmann y Fruton (1944) seleccionaron pares de derivados idóneos de aminoácidos, y descubrieron que las enzimas proteolíticas podían sintetizar enlaces sencillos CO-NH para producir dipéptidos. Pueden citarse los siguientes ejemplos:

Enzima: papaína
Benzoil-leucina + leucinanilida ⇌ benzoil-leucil-leucinanilida

Norlín (1947) ha informado que el bacilo diftérico forma fácilmente proteína si se cultiva en un medio sintético que contenga hierro.

Para más información, véase Nachmansohn, Hestrin y Voripaieff (1949).

LISOZIMA

La lisozima es una enzima presente en la mucosa nasal, capaz de disolver bacterias, en particular *Micrococcus lysodeikticus*. Existe en la clara de huevo, de la cual puede aislarse y cristalizarse sin dificultad.

Welshimer y Robinow (1949) han empleado una cepa de *Bacillus megatherium* sensible a la lisozima. Primero se mataron las células con formol al 2 %, y luego se trataron con esta enzima; después de exponerlas a su acción durante cinco minutos, se fijaron en líquido de Bouin y se tiñeron con azul Victoria 4R, y se observó un evidente aumento en la intensidad de coloración del citoplasma (fig. 135). Tras una exposición de 60 minutos a la lisozima, las células tomaron una débil tonalidad, y sólo pudieron observarse con ayuda de un filtro de contraste adecuado. El número de bacilos apreciables fué sumamente reducido, y el aspecto de las células era de fragilidad.

Kern, Kingkade, Kern y Behrens (1951), mediante observaciones de *M. lysodeikticus* en el microscopio electrónico, hacen saber que la lisozima agranda o hincha la célula, la cual se rompe y dispersa su contenido en el medio, hasta que acaba por disolverse también la membrana. En cambio, el *M. pyogenes* var. *aureus* K_1 no es tan sensible a la acción de la enzima, y no pudo demostrarse que se resquebrajara la membrana celular. La porción viscosa externa de la célula se disolvió poco a poco, dejando la interna más densa.

Véase más información en Smolelis y Hartsell (1952), y Walshimer (1953).

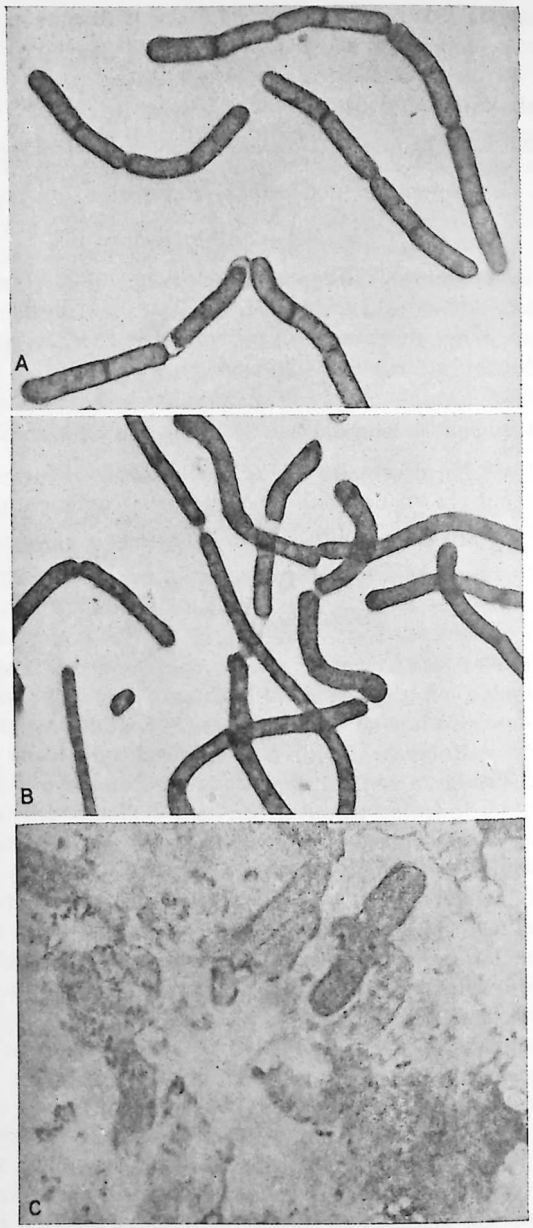


Fig. 135. — Cepa de *Bacillus megatherium* sensible a la lisozima. Todos los frotis se fijaron en líquido de Bouin y se tiñeron con azul Victoria 4R. *A*, células no tratadas con lisozima; abajo, en el centro, se ven células cuyo protoplasma se ha desprendido de la pared. *B*, células expuestas a la lisozima durante cinco minutos; en el centro, arriba, hay varias células que se han mantenido resistentes a la enzima. *C*, células tratadas con lisozima durante 60 minutos, y completamente disueltas por la enzima. (Según Welshimer y Robinow.)

ENZIMAS DE CONSTITUCIÓN Y DE ADAPTACIÓN

La mayoría de las enzimas se elaboran en substratos homólogos o no; éstas son las enzimas de constitución.

En algunos casos, puede hacerse que un microorganismo elabore una enzima que no segregue normalmente. La acción continuada de un germen sobre un substrato específico dará por resultado final el aprovechamiento del compuesto. Esta enzima es de adaptación.

Las enzimas de constitución parecen experimentar amplias fluctuaciones en presencia o ausencia de sus substratos. Por ejemplo, Spiegelman y Dunn (1947), y Spiegelman y Reiner (1947), en su libro sobre levaduras, exponen que el contenido en invertasa de la *Escherichia coli* (índices Q) sube a 452 en presencia de sacarosa, y baja a cifras comprendidas entre 12,4 y 39 cuando no existe este azúcar. Aun cuando se aprecian diferencias cuantitativas, se supone que las enzimas de constitución se forman siempre, cualquiera que sea la composición del substrato.

Rahn, Hegarty y Deuel (1938) cultivaron *Streptococcus lactis* en caldo glucosado, separaron las células por centrifugación, y volvieron a suspenderlas en atemperante neutro de fosfato, agregando glucosa o galactosa. Las suspensiones se concentraron hasta el punto de interrumpir el crecimiento. Se preparó una serie paralela de suspensiones con células cultivadas en caldo de galactosa, y los resultados se exponen en la tabla 22. Los microorganismos cultivados en caldo glucosado durante doce horas no pueden fermentar galactosa, pero los cultivados en ésta fermentan ambos azúcares. La glucosa se hace fermentar siempre, aunque las bacterias se cultiven sin ningún azúcar, lo cual indica que la enzima que ataca la glucosa es de constitución; en cambio, la que ataca la galactosa es de adaptación.

TABLA 22. — MILIGRAMOS DE ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDOS POR *Streptococcus lactis* CULTIVADOS EN DIVERSAS CONDICIONES

Tiempo, horas	Células cultivadas en caldo de glucosa y suspendidas luego en		Células cultivadas en caldo de galactosa y suspendidas luego en	
	Glucosa	Galactosa	Glucosa	Galactosa
1	240	0	160	180
2	360	0	300	270
3	420	0	370	400
4	470	0	420	410

Karström (1938) cultivó el microorganismo *Leuconostoc mesente-*

roides en un medio que sólo contenía una serie de azúcares. Después del desarrollo, los gérmenes se separaron del medio, se lavaron y se sembraron en varios tubos, cada uno de los cuales contenía uno de los carbohidratos. Los resultados se consignan en la tabla 23, donde se aprecia

TABLA 23. — FORMACIÓN DE ENZIMAS DE CONSTITUCIÓN Y DE ADAPTACIÓN

Carbohidrato	Glucosa, levulosa, manosa	Reacción fermentativa			
		Galactosa	Arabinosa	Maltosa	Lactosa
Glucosa	+	—	—	—	—
Galactosa	+	+	—	—	—
Arabinosa	+	—	+	—	—
Sacarosa.	+	—	—	—	—
Maltosa	+	—	—	+	—
Lactosa	+	+	—	—	+
Ningún azúcar. . .	+	—	—	+	—

que han fermentado la glucosa, la levulosa y la manosa, indicio de que las enzimas, para estos azúcares, son de constitución. Por el contrario, las enzimas que fermentan galactosa, arabinosa y lactosa se desarrollan sólo en presencia del substrato apropiado, lo cual demuestra que para estos azúcares son de adaptación. La maltosa se distingue porque aparece aún sin ningún azúcar.

El proceso de adaptación implica la formación de un compuesto nitrogenado; se ha comprobado que existe relación entre este proceso y el metabolismo del nitrógeno en la célula. El nitrógeno exógeno estimula señaladamente la adaptación, tanto en rapidez del comienzo como en la cuantía final de actividad enzimática. Esta estimulación falta cuando las células no son capaces de asimilar el nitrógeno suplementario.

Spiegelman y Dunn señalaron que existe una interacción oponente entre los sistemas enzimáticos de una célula, y que el nitrógeno exógeno puede abolirla o modificar su intensidad. Esto hace suponer que el compuesto nitrogenado que se forma durante la adaptación enzimática es de carácter proteínico, y que se forma una nueva enzima de adaptación a expensas de otra previamente producida cuando se reemplaza por uno nuevo el substrato que promueve la adaptación primera.

Virtanen (1948) ha cultivado *Escherichia coli* en una solución nutritiva que contenía sacarosa y lactosa. Primero se elaboró una sacarasa capaz de atacar la sacarosa; después de consumida ésta por completo, el germen elaboró una lactasa que actuó sobre la lactosa, y la sacarasa desapareció entonces, para ser substituída por la lactasa. Los resultados parecen indicar que la proteína de sacarasa se transformó en proteína de lactasa.

La actividad de las enzimas de adaptación cesa cuando las bacterias se cultivan una o dos veces en medios nutritivos sin el substrato homólogo; esto ocurre sólo cuando la adaptación enzimática es rápida. Si se necesita un lapso prolongado de adaptación para establecer la presencia de una nueva enzima, hace falta otro proporcionalmente mayor para la pérdida de la enzima cuando las células se cultivan sin el substrato específico.

Para más informes sobre adaptación enzimática, consúltese Cohen (1949), Davies y Hinshelwood (1947), Fitzgerald y Bernheim (1948), Fitzgerald, Bernheim y Fitzgerald (1949), Karström (1938), Korkes y Ochoa (1948), Pinsky y Stokes (1952), Rahn (1938), Rahn y Leet (1949), Reiner (1947), Wainwright y Pollock (1949).

ENZIMAS EXTRACELULARES

Las enzimas bacterianas se pueden dividir en dos grupos: las segregadas en el medio de cultivo circundante y las que permanecen en el interior de las células. Las del primer grupo se califican de extracelulares o exoenzimas; las del segundo, se conocen por enzimas intracelulares o endoenzimas.

Desde los tiempos de Pasteur se admite que las transformaciones producidas por microorganismos que actúan sobre carbohidratos (fermentación) y proteínas (hidrólisis proteínica y putrefacción) son obra de las enzimas que aquéllos elaboran. Las enzimas pueden desarrollar sus acciones específicas en ausencia absoluta de células vivas; esto se puede comprobar fácilmente, en lo que atañe a las extracelulares, centrifugando un cultivo de gérmenes, pasando el líquido claro que sobrenada a través de un filtro adecuado, y añadiendo el filtrado a la substancia problema, para demostrar la actividad enzimática.

También se prueba la existencia de enzimas extracelulares incorporando a medios de cultivos sólidos un compuesto insoluble y no difusible. Mediante substancias apropiadas es posible demostrar la presencia de enzimas caseolíticas, hemolíticas, amilolíticas (diastásicas) y lipolíticas.

Hidrólisis del almidón. El almidón es un polímero de glucosa ampliamente difundido en el reino vegetal; se encuentra como material de reserva en raíces, semillas, frutos y medula de plantas. Durante períodos de crecimiento activo, especialmente en primavera, el almidón se convierte en azúcar soluble y se transporta a donde hace falta para su transformación en celulosa u otros productos.

El almidón se presenta en forma de gránulos con estriaciones características. Las dimensiones, formas y rayas de los gránulos son típicas de muchas plantas, y permiten al microscopista experto determinar su procedencia.

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, incluso tras una inmersión prolongada. Después de romperse las membranas exteriores, el contenido se hincha en agua fría. El agua caliente hace hincharse los gránulos intactos y estallar las membranas, y el contenido forma entonces soluciones viscosas o geles. Al enfriar estas soluciones, se pueden formar geles rígidos por cristalización de almidón disuelto o disperso a modo de redes que ocluyen gran cantidad de líquido.

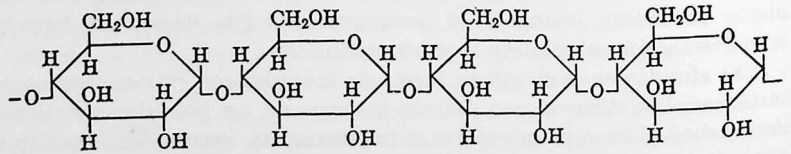
Cuando se calienta almidón con ácidos minerales diluídos, se hidroliza en dextrinas, maltosa y *d*-glucosa, productos todos solubles en agua. Los ácidos minerales concentrados hidrolizan por completo la molécula de almidón a *d*-glucosa. También hidrolizan el almidón las enzimas α-amilasa y β-amilasa.

El almidón se puede dividir en dos fracciones dotadas de propiedades físicas distintas, que se han designado por amilosa (β-amilosa) y amilopectina (α-amilosa). La amilosa es soluble en agua, y con yodo toma coloración azul; la amilopectina no se disuelve en agua, y da color rojo con yodo. Se supone que la amilosa consiste en largas cadenas rectas, no ramificadas, de maltosa polimerizada, y la amilopectina, en cadenas ramificadas de la misma substancia.

La amilosa es de menor peso molecular que la amilopectina, y la β-amilasa la hidroliza en proporción muy superior. Las fracciones amilosa y amilopectina de diferentes orígenes son heterogéneas en cuanto a tamaño molecular y grado de ramificación.

Almidón soluble. El almidón soluble procede de alterar la molécula de modo que el producto se disuelva en agua caliente y dé una solución límpida. Se obtienen almidones solubles tratando almidón natural con ácido clorhídrico al 7,5 %, durante siete días, a temperatura ordinaria. El almidón soluble es mejor que el natural para usos en medios de cultivo.

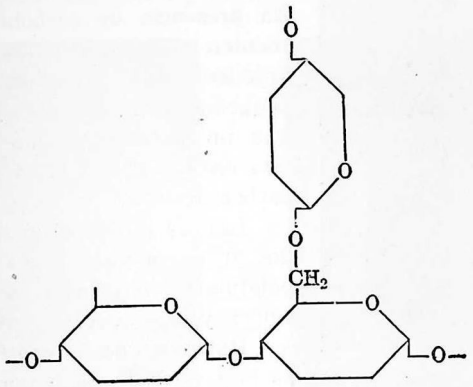
Estructura del almidón. La fórmula empírica del almidón es $(C_6H_{10}O_5)_x$. Hidrolizado con ácido, el almidón proporciona *d*-glucosa, y en éste consiste el método industrial de preparación del azúcar. Por hidrólisis enzimática con amilasa se obtiene el disacárido maltosa. Se ha comprobado que la molécula de almidón está compuesta de una cadena de unidades de α-glucosa, ligadas principalmente por enlaces glucosídicos entre el primer átomo de carbono y el cuarto de la unidad siguiente de glucosa, con reparto de un átomo de oxígeno:



Unidades de α-glucosa en la fracción amilosa del almidón

El reparto entre cualquier par de unidades de glucosa en el almidón es igual que en el disacárido maltosa.

La fórmula de constitución precedente representa muy bien la fracción amilosa de los gránulos de almidón. La estructura de la amilopectina es más complicada, y puede derivarse de la anterior fórmula por adición de cadenas laterales mediante enlaces 1,6-glucosídicos:



Unidades de α-glucosa en la fracción amilopectina del almidón.

Amilasas α y β. Muchos organismos tienen la facultad de elaborar las enzimas α-amilasa y β-amilasa, capaces de hidrolizar almidón a dextrina y maltosa (pág. 313). Las amilasas son enzimas extracelulares segregadas por microorganismos para convertir el compuesto no difusible en substancias difusibles. Estas últimas pueden penetrar entonces en la célula donde se utilizan, y allí se hidrolizan de nuevo probablemente por obra de la enzima maltosa. Los productos de fermentación del almidón son el resultado del consumo intracelular de glucosa.

Puede demostrarse la presencia de amilasas filtrando un cultivo líquido y mezclando parte del filtrado con almidón, con lo que éste desaparece si hay amilasas. Se comprueba tal desaparición añadiendo unas gotas de solución diluída de yodo (fig. 136); una coloración azul indica la presencia de almidón; si el color es pardo, ha sido total la hidrólisis de almidón a maltosa. Un procedimiento sencillo consiste en trazar una estría con un asa de cultivo sobre la superficie de una placa de agar-almidón; incubada la placa, se cubre con una solución diluída de yodo, y la ausencia de color azul a cierta distancia de la vegetación bacteriana indica la hidrólisis extracelular del almidón (fig. 137).

Para más información sobre el almidón, véase Myrbäck (1948).

Licuación de la gelatina. La gelatina es una proteína dotada de la propiedad de formar un gel cuando se disuelve en agua caliente. Por tratarse de una proteína, puede ser atacada por algunas bacterias que la priven de su propiedad gelificante. La hidrólisis de la gelatina es una reacción enzimática, y se conoce por gelatinasa la enzima causante de esta transformación. En presencia de carbohidratos que fermenten con rapidez, la gelatina no se produce o lo hace sólo en cantidades muy pequeñas. En general, para demostrar que un microorganismo puede elaborar esta enzima deben emplearse medios sin carbohidratos.

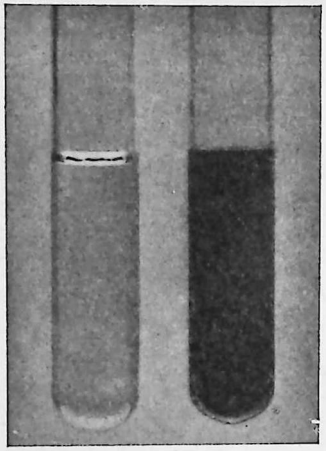
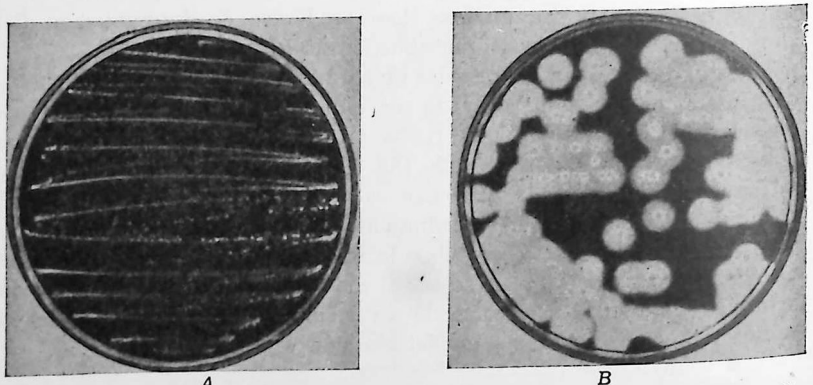


Fig. 136. — Hidrólisis del almidón en ausencia de bacterias. Izquierda, filtrado de *Bacillus subtilis*; no da color con yodo, lo cual indica hidrólisis total del almidón. Derecha, filtrado de *Escherichia coli*; toma color azul con yodo, indicio de que el almidón no se ha hidrolizado.

Las bacterias se pueden dividir en dos grupos a base de su acción sobre la gelatina. Esta prueba es útil para identificar y clasificar bacterias.

Hidrólisis de la caseína. La caseína es la proteína más importante contenida en la leche. Algunos gérmenes pueden desdoblar por hidrólisis la proteína en unidades moleculares más pequeñas, convirtiendo así la caseína insoluble en productos solubles; esto se conoce por peptonización, y la enzima hidrolizante recibe el nombre de proteinasa, o más concretamente, el de caseasa.

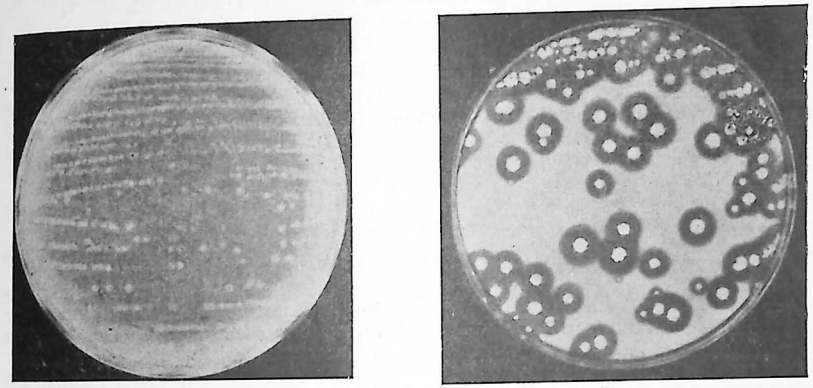
La presencia de una caseasa se puede determinar como sigue: Se



A B

Fig. 137. — Hidrólisis del almidón en presencia de bacterias. *A, Escherichia coli*; color azul con yodo, lo que indica ausencia de hidrólisis. *B, Bacillus subtilis*; el yodo no da color azul en torno a las colonias, lo que demuestra la hidrólisis del almidón.

incorpora a un medio de agar leche suficiente para producir opalescencia. En la superficie del agar lácteo solidificado se trazan estrías con el germen ensayado. Si se emplea un cultivo de *Bacillus subtilis*, alrededor de cada colonia desarrollada en la placa aparecen zonas claras, lo cual indica que la enzima extracelular ha reducido la caseína a compuestos solubles, por peptonización o digestión. En cambio, la *Escherichia coli* no engendra una enzima extracelular caseolítica, y por eso no



A B

Fig. 138. — Hidrólisis de la caseína. *A*, placa de agar lácteo con estrías de *Escherichia coli*; la caseína no se ha hidrolizado. *B*, la misma placa, con estrías de *Bacillus subtilis*; la hidrólisis de la caseína se traduce en la aparición de zonas claras en torno a cada colonia.

puede atacar la caseína (fig. 138). De una manera análoga es posible demostrar la digestión de otros compuestos, como sangre (hemoglobina), almidón e inulina.

Estas pruebas sirven para identificar y clasificar bacterias.

ENZIMAS INTRACELULARES

Las enzimas intracelulares intervienen en las actividades respiratorias del organismo. Como las células no las segregan, es imposible demostrarlas en filtrados de cultivos; pero se pueden descubrir empleando bacterias vivas desmenuzadas o disueltas. Las células se pueden triturar empleando diversos tipos de molinos de bolas; las suspensiones de neumococos u otras especies, mezcladas con bilis, se disuelven. Las células trituradas y los lisados sirven para demostrar la presencia de diferentes endoenzimas, mediante incorporación a substratos apropiados.

Enzimas oxidantes y reductoras. La oxidación se puede definir como adición de oxígeno, pérdida de hidrógeno, o pérdida de electrones. Oxidación es lo contrario de reducción; la oxidación de un compuesto va siempre acompañada de la reducción de otro.

La reacción entre cloruro férrico y yoduro de potasio implica oxidación del átomo de yodo y reducción simultánea del átomo de hierro, por pasar electrones negativos del primero al segundo:

$$Fe^{+++} + 3\,Cl^- + K^+ + I^- \rightleftharpoons Fe^{++} + 3\,Cl^- + K^+ + I$$

Se han expuesto varias teorías para explicar el mecanismo de las oxidaciones y reducciones intracelulares, y de ellas trataremos en el capítulo siguiente.

Véase más información sobre enzimas en Adams, Richtmyer y Hudson (1943), Baldwin (1952), Bayless, Glick y Siem (1948), Di Carlo y Redfern (1947), Feldman y Gunsalus (1950), Gale (1943), Hellerman, Chinard y Deitz (1943), Hewitt (1950), Lichstein y Cohen (1945), Moog (1946), Northrop, Kunitz y Herriot (1948), Smithe (1951), Stephenson (1949), Sumner y O'Kane (1948), Sumner y Somers (1952), Tauber (1949).

REFERENCIAS

Adams, M., N. K. Richtmyer y C. S. Hudson: Some enzymes present in highly purified invertase preparations; a contribution to the study of fructofuranosidases, galactosidases, glucosidases, and monosidases, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**: 1369, 1943.

Baldwin, E.: «Dynamic Aspects of Biochemistry», Nueva York, The Macmillan Company, 1952.

Bayliss, M., D. Glick, y R. A. Siem: Demonstration of phosphatases and lipase in bacteria and true fungi by staining methods and the effect of penicillin on phosphatase activity, *J. Bact.*, **55**: 307, 1948.

Bergmann, M., y J. S. Fruton: The significance of coupled reactions for the enzymatic hydrolysis and synthesis of proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **45**: 409, 1944.

Cohen, S. S.: Adaptive enzyme formation in the study of uronic acid utilization by the K-12 strain of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **177**: 607, 1949.

Davies, D. S., y C. N. Hinshelwood: The effect of adaptation on the activity of the dehydrogenases of *Bact. lactis aerogenes*, *Trans. Faraday Soc.*, **43**: 257, 1947.

DiCarlo, F. J., y S. Redfern: α-Amylase from *Bacillus subtilis*. I. Purification and physical properties, *Arch. Biochem.*, **15**: 333, 1947.

Doudoroff, M.: Studies on the phosphorolysis of sucrose, *J. Biol. Chem.*, **151**: 351, 1943.

—: On the utilization and synthesis of sucrose and related compounds by some microorganisms, *Federation Proc.*, **4**: 241, 1945.

—, H. A. Barker, y W. Z. Hassid: Studies with bacterial sucrose phosphorylase. I. The mechanism of action of sucrose phosphorylase as a glucose-transferring enzyme (transglucosidase), *J. Biol. Chem.*, **168**: 725, 1947*a*; II. Enzymatic synthesis of a new reducing and of a new non-reducing disaccharide, *ibid.*, **168**: 733, 1947*b*; III. Arsenolytic descomposition of sucrose and of glucose-1-phosphate, *ibid.*, **170**: 147, 1947*c*.

—, W. Z. Hassid, y H. A. Barker: Synthesis of two new carbohydrates with bacterial phosphorylase, *Science*, **100**: 315, 1944.

—, N. Kaplan, and W. Z. Hassid: Phosphorolysis and syntesis of sucrose with a bacterial preparation, *J. Biol. Chem.*, **148**: 67, 1943.

— y R. O'Neal: On the reversibility of levulan synthesis by *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.*, **159**: 585, 1945.

—, J. M. Wiame, y H. Wolochow: Phosphorolysis of sucrose by *Pseudomonas putrefaciens*, *J. Bact.*, **57**: 423, 1949.

Feldman, L. I., e I. C. Gunsalus: The occurrence of a wide variety of transaminases in bacteria, *J. Biol. Chem.*, **187**: 821, 1950.

Fitzgerald, R. J., y F. Bernheim: The effect of streptomycin on the formation of adaptive enzymes, *J. Bact.*, **55**: 705, 1948.

—, —, y D. B. Fitzgerald: The effect of various compounds on adaptive enzyme formation in mycobacteria, *Arch. Biochem.*, **20**: 83, 1949.

Gale, E. F.: Factors influencing the enzymic activities of bacteria, *Bact. Rev.*, **7**: 139, 1943.

Hassid, W. Z., M. Doudoroff y H. A. Barker: Enzymatically synthesized crystalline sucrose, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**: 1416, 1944.

—, — y —: Enzymatically synthesized disaccharides, *Arch. Biochem.*, **14**: 29, 1947.

—, —, — y W. H. Dore: Isolation and structure of an enzymatically synthesized crystalline disaccharide, *d*-glucosido-*l*-sorboside, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**: 1349, 1945.

—, —, — y —: Isolation and structure of an enzymatically synthesized crystalline disaccharide *d*-glucosido-*d*-ketoxyloside, *ibid.*, **68**: 1465, 1946.

—, —, A. L. Potter y H. A. Barker: The structure of an enzymatically synthesized reducing disaccharide *d*-glucosido-*l*-arabinose, *ibid.*, **70**: 306, 1948.

Hellerman, Leslie, F. P. Chinard y V. R. Deitz: Protein sulfhydryl groups and the reversible inactivation of the enzyme urease, *J. Biol. Chem.*, **147**: 443, 1943.

Hewitt, L. F.: «Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry», Edinburgh, E. y S. Livingstone Ltd., 1950.

Karström, H.: Enzymatische Adaptation bei Microorganismen, *Ergeb. Enzymforsch.*, **7**: 350, 1938.

Kern, R. A., M. J. Kingkade, S. F. Kern y O. K. Behrens: Characterization of the action of lysozyme on *Staphylococcus aureus* and on *Micrococcus lysodeikticus*, *J. Bact.*, **61**: 171, 1951.

Korkes, S. y S. Ochoa: Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*, *J. Biol. Chem.*, **176**: 463, 1948.

Lichstein, H. C. y P. P. Cohen: Transamination in bacteria, *J. Biol. Chem.*, **157**: 85, 1945.

Moog, F.: The physiological significance of the phosphomonoesterases, *Biol. Rev.*, **21**: 41, 1946.

Myrbäck, K.: The structure of starch, *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**: 209, 1948.

Nachmansohn, D., S. Hestrin y H. Voripaieff: Enzymatic synthesis of a compound with acetylcholine-like biological activity, *J. Biol. Chem.*, **180**: 875, 1949.

Norlin, G.: On the protein synthesizing properties of the diphtheria bacillus, *Acta Poth.*, **24**: 525, 1947.

Northrop, J. H., M. Kunitz y R. M. Herriott: «Crystalline Enzymes», Nueva York, Columbia University Press, 1948.

Pinsky, M. J. y J. L. Stokes: The influence of age on enzymatic adaptation in microorganisms, *J. Bact.*, **64**: 337, 1952.

Rahn, O.: On the nature of adaptive enzymes, *Growth*, **2**: 363, 1938.

—, C. P. Hegarty y R. E. Deuel: Factors influencing the rate of fermentation of *Streptococcus lactis*, *J. Bact.*, **35**: 547, 1938.

— y M. Leet: Adaptive enzymes induced by insoluble substrates, *ibid.*, **58**: 714, 1949.

Reiner, J. M.: Metabolic intermediates in adaptive fermentation of galactose by yeast, *J. Gen. Physiol.*, **30**: 355, 1947.

Smolelis, A. N. y S. E. Hartsell: Factors affecting the lytic activity of lysozyme, *J. Bact.*, **63**: 665, 1952.

Smythe, C. V.: Microbiological production of enzymes and their industrial applications, *Econ. Botany*, **5**: 126, 1951.

Spiegelman, S. y R. Dunn: Interactions between enzyme-forming systems during adaptation, *J. Gen. Physiol.*, **31**: 153, 1947.

— y J. M. Reiner: The formation and stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate, *ibid.*, **31**: 175, 1947.

Stephenson, M.: «Bacterial Metabolism», Nueva York, Longmans, Green & C., Inc., 1949.

Sumner, J. B. y D. J. O'Kane: The chemical nature of yeast saccharase, *Enzymologia*, **12**: 251, 1948.
— y G. F. Somers: «Chemistry and Methods of Enzymes», Nueva York, Academic Press Inc., 1952.
Tauber, H.: «The Chemistry and Technology of Enzymes», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1949.
Virtanen, A. I.: On the adaptive formation of enzymes by micro-organisms, *Särtryck ur Svensk Kemisk Tidskrift*, **60**: 23, 1948.
—: Dependence of the enzyme activity of cells on their protein content, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, Series A, II, Chem. No. 36, p. 3, 1949.
— y J. DeLey: The enzyme activity and nitrogen content of bacterial cells, *Arch. Biochem.*, **16**: 169, 1948.
— y U. Winkler: Effect of decrease in the protein content of cells on the proteolytic enzyme system, *Acta Chem. Scand.*, 3: 272, 1949.
Wainwright, S. D. y M. R. Pollock: Enzyme adaptation in bacteria: fate of nitratase in nitrate-adapted cells grown in the absence of substrate, *Brit. J. Exp. Path.*, **30**: 190, 1949.
Welshimer, H. J., The action of lysozyme on the cell wall and capsule of *Bacillus megatherium*, *J. Bact.*, **66**: 112, 1953.
— y C. F. Robinow: The lysis of *Bacillus megatherium* by lysozyme, *J. Bact.*, **57**: 489, 1949.

CAPÍTULO XIII

RESPIRACIÓN DE LAS BACTERIAS

Desde su aplicación primera, la palabra respiración ha experimentado varios cambios de significado. Al principio se empleó para designar la entrada de aire en los pulmones y su salida de los mismos; luego, se aplicó igualmente al transporte de oxígeno a los tejidos, y de dióxido de carbono desde estos últimos; más tarde, se extendió a plantas y microorganismos aerobios. Como algunas bacterias se multiplican sin necesidad de oxígeno, no es correcto definir la respiración como la admisión de aire y la expulsión de dióxido de carbono; en su acepción más amplia, se refiere a la oxidación de metabolitos y al consiguiente suministro de energía a los microorganismos. Sólo en este sentido puede emplearse el término en Bacteriología.

En los primeros años de esta ciencia, se creía que todos los organismos necesitaban oxígeno libre, y que la ausencia absoluta de este elemento hacía imposible la vida. Pasteur, en los comienzos de sus investigaciones, demostró ya que debía desecharse tal aserto, considerado entonces fundamental, y que existían bacterias incapaces de desarrollarse donde hubiera oxígeno libre; en consecuencia, clasificó las bacterias en aerobias, anaerobias, aerobias facultativas y anaerobias facultativas, según su actitud respecto al oxígeno en libertad.

En opinión de Pasteur, todas las fermentaciones, es decir, las acciones de microorganismos sobre carbohidratos, con producción de ácido, o de ácido y gases, eran anaeróbicas. El dióxido de carbono gaseoso producido al respirar era capaz de desalojar de los medios de cultivo el oxígeno disuelto; aun cuando estos medios se hallasen expuestos al aire, sus capas más profundas estaban en condiciones anaeróbicas; a pesar de ello, las células producían oxidaciones en ausencia de oxígeno libre.

ACTIVIDADES OXIDANTES Y REDUCTORAS DE LOS MICROORGANISMOS

Un cuerpo se puede oxidar por transporte de hidrógeno (o de electrones) de un donador a un receptor; la oxidación de un compuesto origina la reducción de otro. Clark y otros (1923) definieron las oxidaciones biológicas como «la substracción de electrones de una substancia, con o sin adición de oxígeno o elementos análogos a éste; o como la substracción de electrones, acompañada o no de la de hidrógeno o elementos similares». Generalmente se cree que el oxígeno actúa como receptor de hidrógeno para formar H_2O o H_2O_2; el oxígeno, en calidad de tal, no entra en la molécula del substrato. Los cuerpos que actúan como receptores de hidrógeno ocupan el lugar del oxígeno en diversas oxidaciones, y son a la vez reducidos en el curso de ellas. Las oxidaciones y reducciones bacterianas son fenómenos asociados, y deben estudiarse juntamente.

Wieland (1922) suponía que casi todas las oxidaciones podían explicarse basándose en la separación de hidrógeno más bien que en la agregación de oxígeno, y que hacen falta receptores de hidrógeno para que las reacciones se produzcan; las oxidaciones de este género se denominaban «deshidrogenaciones». Entre las escasas excepciones se comprendían la oxidación de aldehidos o ácidos y la de las bases purínicas a ácido úrico; en estos casos, entendía Wieland que a la eliminación de hidrógeno precede una hidratación preliminar.

1. Oxidación sin hidratación preliminar:

$$\underset{\text{Alcohol}}{R\cdot CH_2OH} \rightarrow \underset{\text{Aldehido}}{R\cdot CHO} + 2\,H + \text{receptor de hidrógeno}$$

2. Oxidación con hidratación preliminar:

$$R\cdot CHO + H_2O \rightarrow R\cdot C(H)(OH)(OH)$$

Aldehido — Hidrato de aldehido

$$R\cdot C(H)(OH)(OH) \rightarrow R\cdot COOH + 2\,H + \text{receptor de hidrógeno}$$

Hidrato de aldehido — Ácido

Según parece, fue Theobald Smith quien primero demostró que los gérmenes anaerobios facultativos y aerobios poseían la facultad de reducir el azul de metileno. Avery y Neill (1924 *a*, *b*) cultivaron el neumococo, *Diplococcus pneumoniae*, en condiciones anaeróbicas, y prepararon un extracto de los microbios sometiendo una suspensión a repetidas congelaciones y descongelaciones. Después, centrifugaron la suspensión, y pasaron la capa líquida transparente de encima por un filtro de Berkefeld, en atmósfera de nitrógeno. El extracto así preparado era capaz de producir peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno, y de reducir el azul de metileno; ambas facultades desaparecen calentando el extracto a 55 hasta 60° C.

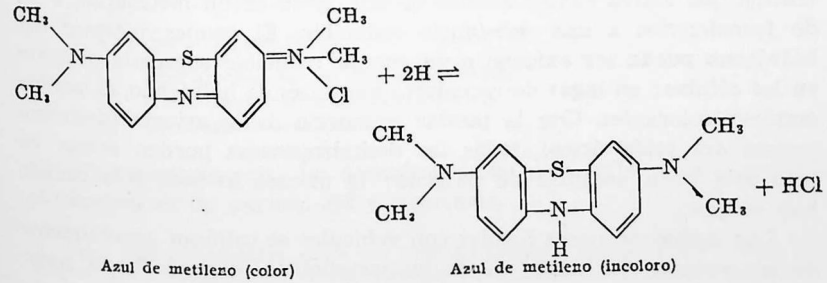
Otros colorantes que se han añadido a medios de cultivo para comprobar el poder reductor de las bacterias son rojo neutro, tornasol, índigo (azul de índigo) y carmín de índigo (indigodisulfonato sódico); pero el azul de metileno se usa indudablemetne más que ninguno de los otros con este fin.

Es probable que todas las bacterias sean capaces de reducir los mencionados colorantes, pero no en el mismo grado. Por ejemplo, la *Escherichia coli* reduce el azul de metileno con doble rapidez que el *Vibrio comma*, y lo contrario sucede con el tornasol.

Las reducciones bacterianas se producen normalmente dentro de la célula o en la superficie de ésta. No existen pruebas muy evidentes que apoyen la aseveración de que los filtrados de células bacterianas pueden reducir activamente los colorantes a sus formas incoloras. Verdad es que los filtrados de cultivos poseen algún poder reductor, probablemente a causa de las enzimas liberadas después de la autólisis de un corto número de células muertas; sin embargo, esta acción es muy restringida si se compara con la vigorosa reducción que se produce al emplear filtrados de microbios triturados.

La velocidad de decoloración de los colorantes es proporcional al número de microorganismos presentes. A la leche se añade azul de metileno para determinar con rapidez su población bacteriana aproximada; este método es útil cuando importa la brevedad. Un ensayo basado en este principio es el de la reductasa (pág. 589).

Reducción del azul de metileno. Esta substancia actúa como receptor de hidrógeno, y pierde su color al reducirla; haciendo burbujear aire u oxígeno a través del medio que contiene el compuesto reducido, reaparece el color azul. La reacción se puede representar como sigue:



Azul de metileno (color) — Azul de metileno (incoloro)

En el doble enlace del nitrógeno se fija un átomo de hidrógeno, y el compuesto de color azul pasa a la forma incolora o leucobase. La reacción es fácilmente reversible.

Mediante la técnica del azul de metileno, Thunberg (1929) demostró la presencia de enzimas respiratorias en los tejidos animales, dotadas de la facultad de activar algunos compuestos orgánicos. El azul de metileno funciona como receptor de hidrógeno, y se reduce a la forma incolora o leucobase; la rapidez de decoloración de la substancia indica el ritmo de la oxidación. Esta reacción se efectuó en un ambiente anaeróbico, pues la presencia de aire oxida pronto el azul de metileno a la forma colorada.

Thunberg descubrió que el azul de metileno añadido a suspensiones de tejidos animales triturados se decoloraba con rapidez, porque los tejidos contenían muchas substancias activadas por ciertas enzimas conocidas por «deshidrogenasas». Sometiendo primero tejidos triturados a extracción con agua, pudo separar esas substancias, pero no las deshidrogenasas, y los tejidos habían dejado de ser capaces de reducir el azul de metileno. Mediante adición de diversos productos a los tejidos lavados, Thunberg logró demostrar la presencia de un crecido número de deshidrogenasas; estas enzimas se hallan muy difundidas en los tejidos de animales y plantas superiores, células de levaduras, bacterias y otros microorganismos.

Se comprueba la presencia de deshidrogenasas en bacterias de diversos modos: 1.°, poniendo en un tubo evacuado una cantidad conveniente del substrato en solución, con amortiguador de la reacción adecuada; 2.°, añadiendo una suspensión de bacterias previamente lavadas; 3.°, añadiendo azul de metileno; 4.°, evacuando el tubo, y 5.°, incubando el tubo a la temperatura apropiada (generalmente 37° C).

Las bacterias se desarrollan en cultivo puro de caldo, se centrifugan y se retira el líquido claro que sobrenada; después se suspenden de nuevo en agua o solución salina, y se airean durante una hora, para eliminar los componentes fácilmente oxidables. De este modo, la suspensión queda dispuesta para la técnica del azul de metileno.

Deshidrogenasas. Se puede definir una deshidrogenasa como una enzima que activa ciertos átomos de hidrógeno de un metabolito, a fin de transferirlos a una substancia reducible. El primer receptor del hidrógeno puede ser oxígeno o un cuerpo reducible adecuado presente en las células; en lugar de receptores naturales de hidrógeno, es posible emplear colorantes. Con la posible excepción de la uricasa (deshidrogenasa del ácido úrico), todas las deshidrogenasas pueden actuar en presencia o en ausencia de oxígeno; la uricasa lo hace sólo cuando hay oxígeno.

Las deshidrogenasas ligadas con vehículos se califican generalmente de anaeróbicas. El hidrógeno de los metabolitos se puede hacer pasar

por varios compuestos intermedios, y finalmente se combina con oxígeno para producir peróxido de hidrógeno. Las deshidrogenasas anaeróbicas se diferencian por el primer vehículo que recibe el hidrógeno procedente de la reacción substrato-deshidrogenasa. Las enzimas que transfieren hidrógeno directamente al oxígeno sin necesidad de uno o más portadores de vehículos se denominan deshidrogenasas aeróbicas.

Deshidrogenasas aeróbicas. Estas deshidrogenasas muestran las siguientes características:

1.ª Reducen colorantes.
2.ª Actúan sin oxígeno cuando existen colorantes adecuados.
3.ª Catalizan una reacción directa entre metabolitos y oxígeno.
4.ª Producen peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno.
5.ª El cianuro puede inhibirlas o no.
6.ª No necesitan sistemas de coenzimas ni de citocromos.

Las deshidrogenasas aeróbicas comprenden:

1.° La deshidrogenasa de xantina.
2.° La de ácido úrico.
3.° La de tiramina.
4.° La de aldehidos.

Deshidrogenasas anaeróbicas. Las deshidrogenasas anaeróbicas catalizan reacciones entre metabolitos y vehículos. Se diferencian por el primero de éstos.

1. Coenzima ligada en I.
   a) Deshidrogenasa de alcoholes.
   b) Deshidrogenasa β-hidroxibutírica.
   c) Deshidrogenasa de glucosa.
   d) Deshidrogenasa málica.
   e) Deshidrogenasa láctica.
   f) Deshidrogenasa α-glicerofosfórica.
   g) Deshidrogenasa de fosfato de triosa.
2. Coenzima ligada en II.
   a) Deshidrogenasa de glucosa.
   b) Deshidrogenasa de éster de Robison.
   c) Deshidrogenasa de ácido glutámico.
3. Citocromo ligado en *c*.
   a) Deshidrogenasa de ácido succínico.
   b) Deshidrogenasa α-glicerofosfórica.
   c) Deshidrogenasa fórmica.

Las reacciones entre las deshidrogenasas y sus substratos específicos se exponen en las páginas 328 y siguientes.

Para más información sobre las deshidrogenasas, véanse Elliot (1946), Elvehjen (1949), Guggenheim (1945), McShan (1949), Sumner y Somers (1952).

Oxidasas. Las oxidasas se diferencian de las deshidrogenasas porque activan el oxígeno, para que éste oxide rápidamente cuerpos que se autooxidan despacio. El oxígeno activado puede entonces admitir hidrógeno para formar agua; en la reacción no se produce peróxido de hidrógeno. Estas enzimas son metaloproteínas (contienen cobre o hierro), y quedan entorpecidas por el cianuro potásico, el sulfuro de hidrógeno u otras substancias que estabilizan los grupos metálicos. Las oxidasas no actúan en condiciones anaeróbicas.

Las propiedades de las oxidasas de hierro se deben en gran parte a la presencia del metal, contenido en grupos prostéticos que son hematina o una substancia muy afín a ella. La hematina se une a diversas proteínas específicas o apoenzimas para constituir las enzimas completas. Se han clasificado como oxidasas de hierro las enzimas siguientes:

1. Oxidasa de citocromo.
2. Catalasa.
3. Peroxidasa.

Citocromo y oxidasa de citocromo. El citocromo es un pigmento respiratorio descubierto en 1886 por MacMunn, pero olvidado hasta 1925, en que lo redescubrió Keilin; éste le dió el nombre de citocromo, que significa pigmento celular.

El citocromo no es un cuerpo simple, sino que consiste en tres componentes designados por las letras *a*, *b* y *c*. Los citocromos *a* y *b* son sumamente inestables, y no se han preparado en forma pura; en cambio, el citocromo *c* es estable y se ha obtenido purificado. Lo que hoy se sabe del citocromo está basado casi por entero en esta última fracción.

El pigmento se halla ampliamente difundido en células animales y vegetales; lo contienen la levadura del pan, las bacterias, los músculos de mamíferos y aves, insectos, moluscos, crustáceos, etc. En condiciones apropiadas, se oxida y reduce con facilidad; en una suspensión de levadura se reduce por completo al añadir una solución de cianuro potásico, y permanece reducido, porque el cianuro entorpece o inhibe la oxidación.

Químicamente, el citocromo es un hemocromógeno de estructura muy similar a la de la hemoglobina, y funciona como transportador de oxígeno. Su presencia es normal en células oxidadas y reducidas sólo en parte, en todas las células aerobias, pero no en las bacterias anaerobias estrictas ni en algunas anaerobias facultativas. Si una suspensión de células de levadura se airea bien, el citocromo se oxida; si se expone a una atmósfera de nitrógeno, se reduce. Durante períodos de gran actividad, el citocromo se oxida en parte, pero vuelve a reducirse en los de reposo.

El citocromo *c* no reacciona directamente con oxígeno. La forma reducida se oxida únicamente por la oxidasa de citocromo, con la que

está íntimamente asociada en las células. Se supone que el citocromo funciona como vehículo de hidrógeno en la complicada cadena que lleva este elemento desde metabolitos al oxígeno, con el resultado de la formación de agua.

La oxidasa de citocromo se denomina a veces indofenolasa y oxidasa de indofenol. La enzima está ampliamente repartida en la naturaleza, y se encuentra en levaduras, mohos, algas, bacterias aerobias, plantas y animales superiores, etc.

Esta oxidasa puede transformar por oxidación *p*-fenilendiamina en indofenol. La presencia de la enzima se descubre fácilmente vertiendo una solución de *p*-fenilendiamina sobre la superficie de una placa de agar que contenga colonias bacterianas; si existe aquélla, la *p*-fenilendiamina se oxida y convierte en indofenol, y aparece un color azul. Se cree que la oxidasa oxida fenoles, aminas, etc. ,no directamente, sino mediante oxidación del citocromo *c*, que actúa de intermediario. Las bacterias aerobias y algunas de las aerobias facultativas dan una reacción fuertemente positiva; las anaerobias facultativas cultivadas al aire dan reacción positiva débil, y las anaerobias obligadas o estrictas reaccionan negativamente:

Keilin (1933) atribuye a la oxidasa de citocromo las siguientes propiedades:

1.ª Oxida rápidamente la *p*-fenilendiamina.
2.ª Es termostable, pero se destruye a temperaturas superiores a 60° C.
3.ª Se destruye por adición de un alcohol enérgico o una acetona.
4.ª El oxígeno que interviene en la oxidación de la *p*-fenilendiamina se inhibe al añadir cantidades muy pequeñas de KCN, H_2S, NaN_3 ó CO.
5.ª La *p*-fenilendiamina no necesita ser activada por una deshidrogenasa para que la oxide la oxidasa de citocromo.

Keilin y Hartree (1938) señalan que la única propiedad realmente confirmada de la oxidasa de citocromo es la oxidación del citocromo c reducido. Las reacciones se pueden representar como sigue:

$$\text{Metabolito} \cdot 2\,H + \text{deshidrogenasa} + \text{citrocromo } c \rightarrow \text{citrocromo } c \text{ reducido}$$
$$\text{Citocromo } c \text{ reducido} + \text{oxidasa de citocromo} + O_2 \rightarrow \text{citocromo } c \text{ oxidado}$$

Estas reacciones no se desarrollan añadiendo KCN, H_2S, NaN_3 o CO.

El agente reductor natural de los tres componentes de citocromo parece ser la diaforasa de flavoproteína (pág. 365), que sirve de eslabón entre el citocromo y las deshidrogenasas que requieren coenzima I o II. Los citocromos reducidos se oxidan entonces por obra de la oxidasa de citocromo, que transfiere los átomos de hidrógeno a oxígeno molecular, con formación de agua.

Se hallará una información más amplia sobre los citocromos y su oxidasa en Chais y Roncoli (1590), Potter (1949), Stephenson (1949), Sumner y Somers (1952).

Catalasa. La mayoría de las bacterias producen peróxido de hidrógeno, H_2O_2, en presencia de oxígeno libre. Como el peróxido de hidrógeno es tóxico para las células vivas, su destrucción importa sobre manera. La acumulación de peróxido en los cultivos depende de dos factores: la catalasa bacteriana y el grado de sensibilidad de los microorganismos frente al producto.

La catalasa es una enzima capaz de descomponer peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, según la ecuación

$$2\ H_2O_2 + \text{catalasa} \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Donde primero se comprobó la presencia de peróxido de hidrógeno fué en el neumococo, microbio que no produce catalasa y es moderadamente sensible a la acción tóxica de H_2O_2. Los microorganismos que no producen catalasa se pueden proteger cultivándolos con ciertos tejidos vegetales o animales, o con otros gérmenes capaces de producir la enzima.

Son muchas las bacterias que producen catalasa, unas más que otras, sobre todo las aerobias estrictas; no se ha demostrado su presencia, por el contrario, en las anaerobias forzosas.

Keilin y Hartree (1945) indicaban el siguiente mecanismo para la descomposición de peróxido de hidrógeno por la catalasa:

$$1.\quad 4\ Fe^{+++} + 2\ H_2O_2 \rightarrow 4\ Fe^{++} + 4\ H^+ + 2\ O_2$$
$$2.\quad 4\ Fe^{++} + 4\ H^+ + O_2 \rightarrow 4\ Fe^{+++} + 2\ H_2O$$
$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

En la primera reacción, el peróxido reduce el hierro de la catalasa de trivalente a divalente; en la segunda, el oxígeno gaseoso oxida la catalasa ferrosa reducida y la transforma en férrica.

La concentración de catalasa puede determinarse añadiendo peróxido de hidrógeno y anotando la cantidad descompuesta; también es útil agregar peróxido a cultivos bacterianos en tubos de fermentación de Smith y medir los volúmenes de oxígeno desprendidos (fig. 139).

Véase más información sobre la catalasa en Aussen, Boltjes y Wöstman (1950), Isaacs y Scouller (1948).

Peroxidasa. Quien primero dió a conocer la peroxidasa como enzima específica fué Linossier (1898). Esta enzima se halla muy difundida en la Naturaleza: vegetales, brotes de muchas plantas, remolacha azucarera, harina de trigo, salvado, levadura de cerveza, insectos, aves, animales, bacterias aerobias, leche, patatas, etc. El rábano rusticano es una de las reservas más ricas de peroxidasa, y se utiliza con frecuencia para prepararla.

La peroxidasa es muy resistente al calor; se destruye a una temperatura de 98° C en diez minutos; pero en reposo recupera no menos de 25 % de su actividad primitiva.

Su función consiste en transportar oxígeno de peróxidos a substancias oxidables; en ausencia de éstas, no descompone el peróxido de hidrógeno. En este aspecto difiere de la catalasa, como en la clase de oxígeno desprendido: la peroxidasa deja libre oxígeno atómico, mientras que la catalasa descompone H_2O_2 y pone en libertad oxígeno molecular. Son muchos los cuerpos capaces de fijar oxígeno y poner así en actividad

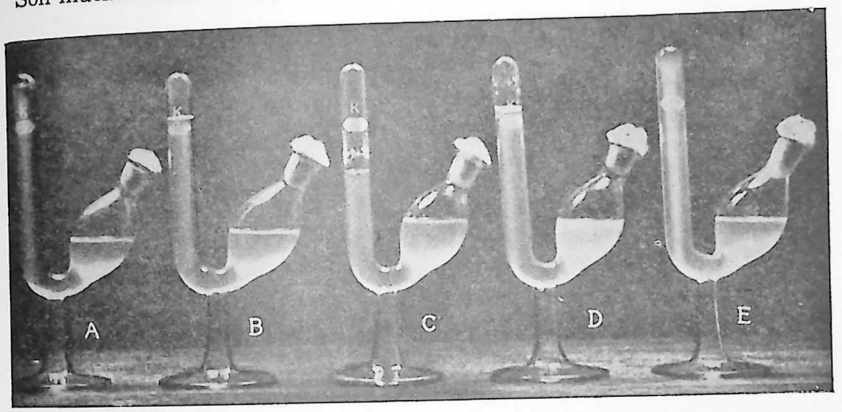


Fig. 139. — Reducción de peróxido de hidrógeno con desprendimiento de oxígeno. *A, Bacillus subtilis*; *B, Micrococcus pyogenes* var. *aureus*; *C, Pseudomonas fluorescens*; *D, Escherichia coli*; *E*, contraste. El *B. subtilis* muestra ligera descomposición, mientras que la del *P. fluorescens* es muy enérgica. Obsérvese la ausencia de gas en el tubo de contraste.

la peroxidasa; entre ellos pueden mencionarse el glutatión y el citocromo c. La acción de la enzima sobre una substancia oxidable (RH_2) en presencia de H_2O_2 puede representarse así:

$$\text{Peroxidasa} + H_2O_2 \rightarrow \text{peroxidasa}\cdot H_2O_2$$
$$\text{Peroxidasa}\cdot H_2O_2 + RH_2 \rightarrow \text{peroxidasa} + R + 2\ H_2O$$

El KCN inhibe por completo las reacciones anteriores, y el CO no produce efecto alguno.

McLeod y Gordon (1923*a*) y McLeod (1928) proponen clasificar las bacterias, a base de la producción de catalasa y peróxido, como sigue:

Grupo I. Anaerobias, sin catalasa, sumamente sensibles al H_2O_2, y consideradas como productoras potenciales de peróxido: *Clostridium perfringens, Cl. tetani, Cl. sporogenes*, etc.

Grupo II. Productoras de peróxido, sin catalasa, y sólo moderadamente sensibles al H_2O_2: neumococos, muchos tipos de estreptococos, bacterias lácticas, y algunas sarcinas.

Grupo III. No productoras de peróxido y carentes de catalasa: ciertos estreptococos, bacilos disentéricos (tipo Shiga), y algunas bacterias hemoglobinófilas.

Grupo IV. Productoras de catalasa: la inmensa mayoría de las bacterias capaces de desarrollarse en medio aeróbico, o en los medios aeróbico y anaeróbico.

Algunas oxidasas contienen en su molécula cobre en vez de hierro. En el grupo son importantes:

1. Oxidasa de ácido ascórbico.
2. Lacasa.
3. Tirosinasa (oxidasa de polifenol).

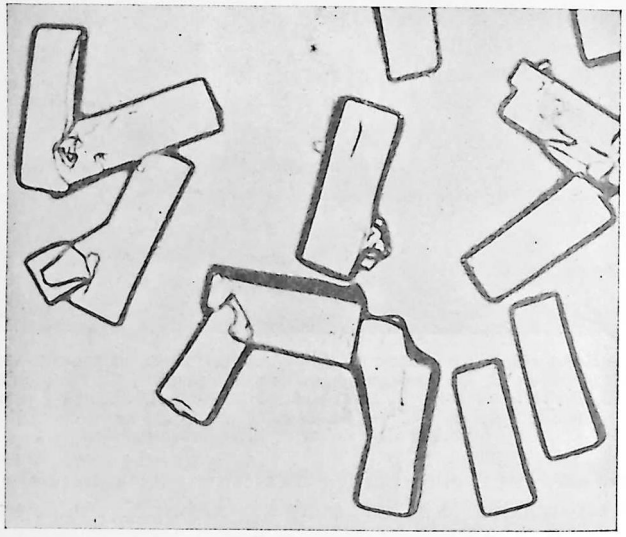


Fig. 140. — Cristales de ácido ascórbico. (Con licencia de Merck & Company, Inc.)

Oxidasa del ácido ascórbico. Tauber, Kleiner y Mishkind (1935) aislaron los primeros una enzima específica que transformaba por oxidación ácido ascórbico o vitamina C (fig. 140) en ácido deshidroascórbico; tal enzima se conoce por oxidasa de ácido ascórbico.

La oxidasa está ampliamente difundida en el reino vegetal, y se encuentra en numerosos vegetales y frutas. No se ha comprobado definitivamente su presencia en células animales.

El ácido ascórbico es sumamente inestable; se oxida con facilidad, y pasa a ácido deshidroascórbico (pág. 328). En la reacción no se produce peróxido de hidrógeno. La forma oxidada conserva aún cierta actividad antiescorbútica, que parece guardar bastante proporción con su capacidad reductora.

Generalmente se cree que el ácido ascórbico funciona como vehículo

de hidrógeno. En los tejidos animales se encuentra en cantidades compatibles con el transporte de hidrógeno o la función coenzimática. Hopkings y Morgan (1936) suponían que el glutatión era la substancia protectora principal en las células, para mantener el ácido ascórbico reducido y preservarlo de una oxidación irreversible, con pérdida consiguiente de actividad antiescorbútica. El glutatión, añadido a una mezcla de ácido ascórbico y su oxidasa, parece mantener la vitamina en su forma reducida o activa.

Véase más información sobre la oxidasa de ácido ascórbico en Burris y Little (1949), Joslyn y Miller (1949), Miller y Jolyn (1949*a*, *b*), Powers y Dawson (1944), Powers, Lewis y Dawson (1944), Summer y Somers (1952).

Lacasa. Esta oxidasa se halla en la savia del árbol japonés de la laca. La enzima está ampliamente difundida en el reino vegetal.

La lacasa transforma por oxidación fenoles en orto- y paraquinonas (pág. 327); no funciona en ausencia de oxígeno, y entorpecen su acción el ácido cianhídrico, el sulfuro de hidrógeno, la azida sódica y el dietilditiocarbamato sódico.

Tirosinasa. La coloración parda, anaranjada, roja o negra que aparece alrededor de colonias de algunas bacterias y mohos cultivados en agar es efecto de la acción de la tirosinasa sobre el aminoácido tirosina y otros cuerpos afines (pág. 327). Se conoce también esta enzima por oxidasa de polifenoles.

La tirosinasa es muy abundante en el reino vegetal, y asimismo se ha demostrado su presencia en células animales. Waksman (1932) y Skinner (1938) demostraron que un gran número de actinomicetos aerobios eran capaces de producir substancias de color oscuro en medios no sintéticos o sintéticos que contuvieran tirosina. Clark y Smith (1939) advirtieron que muchas cepas de *Bacillus niger (mesentericus)* cultivadas en varios medios de agar peptonado producían un pigmento negro, y que esta reproducción quedaba inhibida mediante adición de glucosa o maltosa. Esto inducía a suponer que la formación de pigmento se debía a la acción de los microorganismos sobre la proteína, y que al agregar un carbohidrato fermentable quedaba preservada la proteína; y los autores citados llegaron a la conclusión de que el *B. niger* daba origen a un pigmento negro en medios proteínicos que contenían tirosina libre o metabólicamente disponible; algunas peptonas comerciales sin tirosina de fácil aplicación no se ennegrecían a menos de incorporar el aminoácido. La adición de un carbohidrato fermentable a muchos medios proteínicos normalmente ennegrecidos por el *B. niger* entorpecía la fermentación hasta que se agregaba tirosina libre.

Para más información sobre tirosinasa, véanse Behn y Nelson (9144 *a*, *b*), Burris y Little (1949), Gould (1939), Griffin, Snieszko y Friddle (1953), Tenenbaum y Jensen (1943).

Oxidasas diversas:

1. Dopaoxidasa.
2. Luciferasa (véase «Bioluminiscencia»).

Dopaoxidasa. Esta enzima se denomina así por su capacidad de oxidar la 3,4-dihidroxifenil-*l*-alanina o dopa y transformarla en melanina. Como no puede oxidar muchos derivados fenólicos, se considera la más específica de las oxidasas estudiadas hasta ahora. Sólo es activa en presencia de oxígeno. La adición de dopa a células que contengan la oxidasa provoca una coloración negra (pág. 328).

Bioluminiscencia. Recibe este nombre la emisión de luz por organismos vivos; a veces se denomina fosforescencia. La luz del mar, de peces, carne o madera es efecto de la presencia de gérmenes vivos (figura 141).

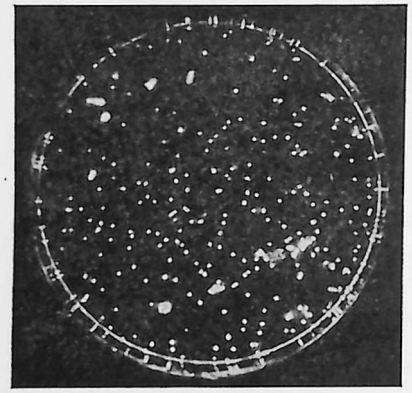


Fig. 141
Bacterias luminosas. Colonias de *Pseudomonas toyamensis* cultivadas en agar y fotografiadas con su propia luz. (De E. N. Harvey, «Living Light», Princeton University Press, 1940).

Se encuentran especies luminiscentes entre animales y plantas, y las vegetales comprenden bacterias y mohos. La mayoría de las primeras se encuentran en los géneros *Bacterium, Pseudomonas* y *Vibrio,* y son generalmente formas marinas. Sólo hay microorganismos luminosos terrestres o marinos; no se ha encontrado ninguno de agua dulce.

Las bacterias luminiscentes se pueden cultivar en medios nutritivos apropiados. Las formas halófilas se desarrollan mejor en medios preparados con agua de mar (3 % de cloruro sódico); las no halófilas se cultivan en medios que contienen un 0,9 % de cloruro sódico.

Las bacterias y los mohos luminiscentes se distinguen de otros microorganismos luminosos porque emiten luz de intensidad uniforme, de día y de noche, con independencia de cualquier estímulo; en cambio, los animales emiten luz sólo al ser molestados o estimulados.

Como los microorganismos luminosos producen muy poco calor, la bioluminiscencia se denomina a menudo «luz fría»; el aumento de temperatura en algunos de ellos no llega a 0,001° C. La luz emitida tiene propiedades similares a la de otras clases de luz; ataca la película fotográfica, y puede provocar reacciones químicas. No produce radiaciones infrarrojas ni ultravioletas, lo cual significa que su efecto útil se acerca al 100 %.

Mecanismo de la bioluminiscencia. La bioluminiscencia es una forma de luminiscencia química en la que substancias químicas específicas emiten luz durante una reacción de este carácter. Luciferina y luciferasa son nombres aplicados a los cuerpos sintetizados por microorganismos luminosos; pero es probable que la luciferina o la luciferasa de una especie o grupo difiera por completo químicamente de la de otro distinto. La enzima luciferasa actúa sobre el substrato luciferina, en presencia de oxígeno, para producir luciferina oxidada y luz; la luciferina oxidada se puede reducir de nuevo por medio de diversos agentes reductores, del siguiente modo:

1. Luciferina + 2 H (de algún donador) → luciferina·2 H.
2. Luciferina·2 H + luciferasa → luciferina + luciferasa·2 H.
3. Luciferasa·2 H + O_2 → luciferasa + H_2O_2 + luz.

En la luciérnaga no se obtiene luz disolviendo luciferina y luciferasa en agua destilada, pero sí al agregar magnesio (o sales de manganeso) y trifosfato de adenosina (ATP). La adición de esta substancia a extractos acuosos de linternas de luciérnaga produce emisión de luz; ésta dura mucho tiempo, y termina por desaparecer. En algunas especies, añadiendo más ATP se reaviva la luz; en otros no ocurre así, a menos de incorporar luciferina, y en otras especies la luciferasa es el factor que desaparece al oscurecerse un extracto. El trifosfato de adenosina no puede reemplazarse por ningún otro fosfato enérgico; esto relaciona la producción de luz con los mecanismos de fijación de fosfatos de gran energía para procesos biológicos que la originan, en general.

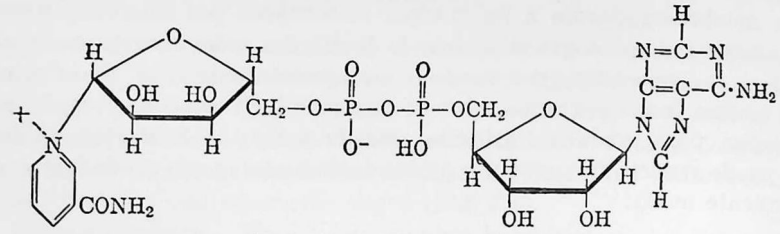
Para más información sobre luminiscencia, consúltense Anderson (1948), Farghaly (1950), Harvey (1948, 1952), Johnson y Gray (1949), Kreezer y Kreezer (1947), McElroy (1951), McElroy y Coulombre (1952), McElroy y Farghaly (1948), McElroy y Strehler (1949), Miller, Farghaly y McElroy (1949).

COENZIMAS

Pueden definirse las enzimas como agentes catalíticos orgánicos elaborados por células vivas y capaces de funcionar con independencia de ellas. Son compuestos termolábiles, no dializables, de peso molecular elevado. Las coenzimas son también catalizadores producidos por células vivas, y necesarios en reacciones enzimáticas, pero termostables, dializables y de peso molecular más pequeño.

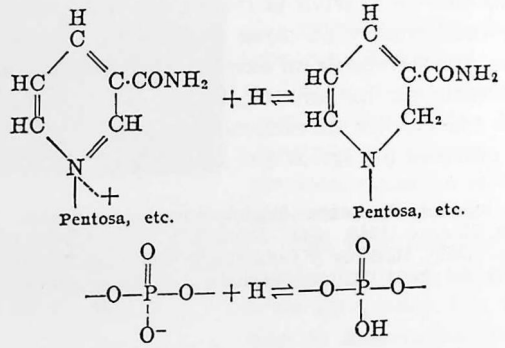
Codeshidrogenasa I. Esta coenzima consta de una molécula de amida del ácido β-nicotínico, una de adenina, dos de pentosa y dos de ácido fosfórico. Se conoce también por coenzima I y por cocimasa I; puede oxidar y reducir alternativamente, y funciona con ciertas deshidrogenasas anaeróbicas como receptor de hidrógeno. Químicamente, la

coenzima es nucleótido de difosfopiridina (DPN), y tiene la siguiente fórmula de constitución:



Nucleótido de difosfopiridina (codehidrogenasa I)

La codeshidrogenasa I está presente con carácter universal en las células vivas, y muy concentradas en levaduras. Funciona como coenzima en numerosas reacciones de deshidrogenasa; ésta transporta 2 átomos de hidrógeno del metabolito a la coenzima. El anillo piridínico de la coenzima admite un átomo de hidrógeno, y una molélula de ácido fosfórico fija el otro:



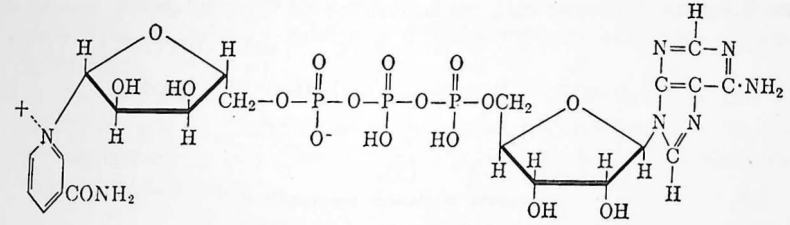
En la reacción, el metabolito se oxida por la separación de hidrógeno, y la coenzima se reduce; pero vuelve a oxidarla una segunda coenzima, la diaforasa, flavoproteína que consta del grupo prostético dinucleótido de flavinadenina asociado a una proteína (pág. 365). La coenzima I queda entonces dispuesta a recibir más hidrógeno. La diaforasa se reduce por admisión de 2 átomos de hidrógeno de la coenzima I reducida. Con la reducción de ambas enzimas termina la reacción. Si ahora se hace llegar agua al sistema, se transfiere hidrógeno a oxígeno molecular para producir peróxido de hidrógeno, y la reacción continúa hasta terminar. La diaforasa funciona con las coenzimas I y II.

La oxidación de glucosa para obtener ácido glucónico se puede representar así:

Glucosa + H_3PO_4 → monofosfato de glucosa
Monofosfato de glucosa + coenzima I + H_2O →
ácido fosfoglucónico + coenzima I·2 H
Coenzima I·2 H + diaforasa → coenzima I + diaforasa·2 H
Diaforasa·2 H + O_2 → diaforasa + H_2O_2

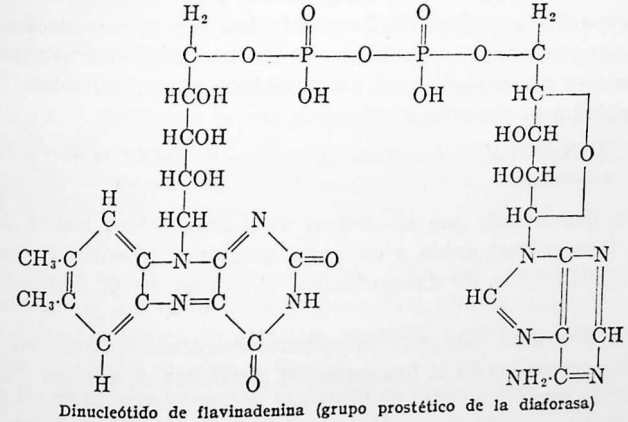
Codeshidrogenasa II. Warburg y Christian (1932) descubrieron otra coenzima similar a la precedente, y la denominaron coenzima II, caracterizándola como nucleótido de trifosfopiridina (TPN); también se conoce por cocimasa II, y está asimismo ampliamente difundida en la Naturaleza. Funciona de igual modo que la codeshidrogenasa I, de la cual difiere sólo por contener una molécula más de ácido fosfórico; con ciertas deshidrogenasas anaeróbicas actúa como receptor de hidrógeno.

Su fórmula de constitución virtual es la siguiente:



Nucleótido de trifosfopiridina (codehidrogenasa II)

Diaforasa. La diaforasa forma parte del grupo de enzimas amarillas o flavoproteínas, y se compone de un grupo prostético asociado a una proteína. El grupo prostético es dinucleótido de flavinadenina, con la siguiente fórmula estructural:



Dinucleótido de flavinadenina (grupo prostético de la diaforasa)

Es portadora de hidrógeno, y capaz de reoxidar la coenzima I reducida, en presencia de un receptor adecuado. La serie siguiente de reac-

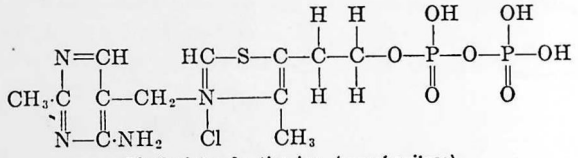
ciones ilustra la reducción de coenzima I en presencia de azul de metileno:

Coenzima I·2 H + diaforasa → coenzima I + diaforasa·2 H
Diaforasa·2 H + azul de metileno → diaforasa + azul de metileno (incoloro)
Azul de metileno (incoloro) + O_2 → azul de metileno (colorado) + H_2O_2

Hay dos diaforasas, una que reacciona con coenzima I y otra que lo hace con coenzima II. Abundan mucho en la Naturaleza, y se encuentran en levaduras, bacterias, plantas superiores, tejidos animales y leche.

Cocarboxilasa. La carboxilasa es una enzima que cataliza la descarboxilación del ácido pirúvico para obtener acetaldehido y dióxido de carbono; y carece de actividad sin el concurso de una coenzima, la cocarboxilasa, presente en levaduras, plantas y células animales.

Esta coenzima se compone de una molécula de tiamina (vitamina B_1) y dos moléculas de ácido fosfórico, y su fórmula es



Pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa)

La descarboxilación de ácido pirúvico a acetaldehido puede representarse como sigue:

$$\underset{\text{Acido pirúvico}}{CH_3\cdot CO\cdot COOH} + \text{carboxilasa} + \text{cocarboxilasa} \rightarrow \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3\cdot CHO} + CO_2$$

En tejidos animales, la coenzima parece estar íntimamente asociada a la tiamina (vitamina B_1) y al metabolismo del ácido pirúvico.

Coenzima de la oxidasa de d-aminoácidos. La oxidasa de *d*-aminoácidos es una enzima que actúa sólo sobre estos aminoácidos no naturales, y los convierte por oxidación en los cetoácidos correspondientes.

La reacción se desarrolla así:

$$\underset{\textit{d}\text{-Aminoácido}}{R\cdot CHNH_2\cdot COOH} + \textit{d}\text{-aminoácidos} + O \rightarrow \underset{\text{Cetoácido}}{R\cdot CO\cdot COOH} + NH_3$$

Se ha demostrado que la oxidasa de *d*-aminoácidos consta de una proteína (apoenzima) unida a un grupo prostético (coenzima); este último es dinucleótido de flavinadenina, el mismo de la diaforasa (página 365).

Ácido adenílico. De esta importante coenzima se trata en la página 422, a propósito de la fermentación alcohólica de glucosa mediante levadura de cerveza.

Modo de actuar las coenzimas. Las coenzimas fijan hidrógeno, que luego ceden a otros compuestos, para que termine por unirse con oxígeno. Bauman y Stare (1939) exponen:

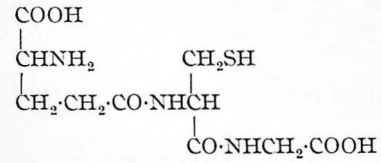
Las coenzimas no se consideran ya como aceleradores en sentido suplementario, sino como miembros esenciales que integran una complicada cadena encargada de transportar hidrógeno o fosfato de un cuerpo a otro, vaciar su contenido y volver por más; son vehículos de hidrógeno y de fosfato. Pero tiene que haber presentes enzimas proteínicas del tipo tradicional para que el transporte de hidrógeno se realice.

Para más información sobre coenzimas, véanse Baldwin (1952), Le Page (1949), Lipmann (1953), Summer y Somers (1952).

GLUTATIÓN

Hopkins (1921) aisló de extractos de levadura y músculo, que servían de sistema de oxidación-reducción, una substancia termolábil que creyó compuesta de una molécula de ácido glutámico y otra de cisteína, unidas por un enlace peptídico, y dió al compuesto el nombre de glutatión.

En una comunicación posterior, Hopkins (1929) señalaba que el cuerpo no era un dipéptido, como se supuso al principio, sino un tripéptido compuesto de glicina, cisteína y ácido glutámico, con la siguiente fórmula de estructura:



Glutatión (glutamilcisteinilglicina)

Dado que el grupo sulfhidrilo, —SH, es el que tiene importancia en las reacciones de oxidación-reducción, la fórmula precedente se puede abreviar por GSH. Dos moléculas de glutatión reducido ceden fácilmente el hidrógeno de sus grupos sulfhidrilos y, por oxidación, dan un disulfuro:

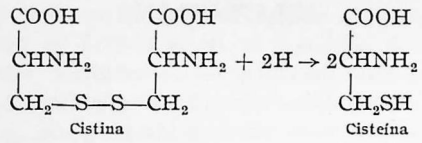
$$\underset{\substack{\text{Glutatión}\\\text{reducido}}}{2\ GSH} + B \rightleftharpoons \underset{\substack{\text{Glutatión}\\\text{oxidado}}}{GSSG} + BH_2$$

La forma disulfurada se reduce sin dificultad a la forma primitiva, por adición de 2 átomos de hidrógeno. Las células contienen sistemas que reducen rápidamente glutatión oxidado, y oxidan pronto el reducido por medio del oxígeno molecular.

Se ha comprobado que el glutatión es casi universal en los tejidos vivos, donde su concentración es aproximadamente proporcional a la actividad metabólica de las células, y superior en las de pleno crecimiento que en las ya viejas. Se dice que la sangre contiene 34 a 47 mg

de glutatión por 100 gramos. Miller y Stone (1938) demostraron la presencia de cantidades determinables de glutatión en muchas especies de bacterias, levaduras y mohos aerobios y anaerobios. El *Aerobacter aerogenes* contenía unos 27 mg por 100 g; el *Proteus vulgaris*, 29 a 31 mg; el *Chromobacterium violaceum*, 7 a 45 mg; la *Monilia sitophila* (moho), 20 a 38 mg, y el *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), 59 mg.

Como el mecanismo de oxidación-reducción del glutatión depende del enlace cistina-cisteína, se ha probado que la cistina funciona de manera análoga, a saber:



Cistina — Cisteína

POTENCIALES DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN

En Biología tienen gran importancia los potenciales de oxidación-reducción (u oxidorreducción). Las reacciones intracelulares que proporcionan energía al organismo implican el estudio de estos potenciales: se produce oxidación por adición de oxígeno o por substracción de hidrógeno; la oxidación de un cuerpo va acompañada de la reducción de otro.

Una oxidación típica por adición de oxígeno produce óxido de cobre en la reacción

$$2\ Cu + O_2 \rightarrow 2\ CuO$$

La conversión de alcohol en aldehido es un ejemplo de oxidación por substracción de hidrógeno:

$$CH_3{\cdot}CH_2OH \rightarrow CH_3{\cdot}CHO + 2\ H$$

También se producen oxidaciones retirando electrones, y reducciones añadiéndolos. Un átomo consta de un núcleo de electricidad positiva rodeada de una envoltura de electrones con cargas eléctricas negativas; la suma total de estas cargas debe ser igual a la carga positiva del núcleo. Algunos elementos pierden con facilidad electrones, y otros los toman. Una oxidación implica la pérdida de uno o más electrones; una reducción, la ganancia de electrones.

$$Cu^{+} \underset{\text{reducción}}{\overset{\text{oxidación}}{\rightleftharpoons}} Cu^{++} + (e)$$

Una substancia que desprende electrones con facilidad es un buen reductor; y a la inversa, una substancia que los admite sin inconvenientes es un buen oxidante.

El transporte de electrones de un cuerpo a otro crea entre ambos una diferencia de potencial que puede medirse con un instrumento adecuado, y cuya magnitud depende de la facilidad con que se cedan o admitan electrones. Cuanto mayor sea el poder oxidante o reductor de una substancia, mayor será el potencial eléctrico a uno u otro lado de un punto cero; al grado de mayor oxidación de una substancia corresponde un potencial eléctrico más positivo, que será más negativo cuanto más intensa sea la reducción. El sentido de una reacción depende de los electrones libres del sistema; si el número de éstos aumenta, el sistema producirá más reductor, y más oxidante si su número disminuye. El estado electrónico del sistema es una medida de su poder oxidante o reductor.

El potencial de oxidación-reducción de un sistema se expresa por el símbolo Eh. A mayor proporción de substancia reducida corresponde un Eh más bajo, y a la inversa. Cuando la concentración del oxidante es igual a la del reductor, no hay diferencia de potencial, y éste se expresa por E_0.

Medición de potenciales de oxidación-reducción. Pueden seguirse dos métodos para determinar los potenciales de oxidación-reducción de cultivos bacterianos: el colorimétrico y el potenciométrico; ambos presentan ventajas e inconvenientes, pero suele preferirse el segundo.

Con cultivos bacterianos se emplean el tornasol y el azul de metileno como indicadores de reducción. Para determinar diversos grados de reducción, hace falta una serie de indicadores escogidos; así puede cubrirse una escala de +0,300 a —0,450 voltios a un pH 7,0 y 30° C de temperatura. Por lo general, los oxidantes del sistema de oxidación-reducción son colorados, y prácticamente incoloros los reductores.

Ofrecen información detallada de los métodos potenciométrico y colorimétrico Cohen (1949) y Hewitt (1950).

ANAEROBIOSIS

Los anaerobios suelen definirse como microorganismos que pueden vivir y reproducirse sólo en medios privados totalmente de oxígeno; pero esto no es exacto, pues se ha demostrado que todas las bacterias anaerobias estrictas pueden tolerar algo de oxígeno libre, en proporciones muy variables. El *Clostridium tetani* se desarrolla en un medio líquido dentro de un ambiente gaseoso con 10 a 20 mm de presión de aire, y el *Cl. feseri* tolera hasta 40 mm. En una placa de agar-sangre se ha visto que el *Cl. tetani* medra con 5 a 15 mm de presión de aire. El *Cl. perfringens* se ha desarrollado bien en una atmósfera que contenía 200 mm de presión de aire, y aun lo hace ligeramente con 380 mm de presión.

Las bacterias anaerobias estrictas más importantes pertenecen al género *Clostridium*. Se caracterizan como microorganismos bacilares grandes, grampositivos, que producen esporas y abomban así las paredes celulares. No contienen ningún mecanismo relacionado con oxígeno molecular, como oxidasa de citocromo, peroxidasa o catalasa. Algunas especies son fuertemente fermentativas, y otras despliegan gran actividad putrefactiva. Los clostridios se suelen encontrar en el suelo y en heces humanas y animales.

Mecanismo de la inhibición por oxígeno. Ha sido objeto de múltiples investigaciones el mecanismo de la inhibición del crecimiento de gérmenes anaerobios en presencia de oxígeno molecular. Las teorías más importantes parecen ser éstas:

1.ª El oxígeno intoxica directamente las células.
2.ª Se produce peróxido de hidrógeno, y, como los microorganismos no elaboran la enzima catalasa, el producto intoxica las células.
3.ª El desarrollo de anaerobios depende de un bajo potencial de oxidación-reducción, imposible en presencia de oxígeno libre.

1. Si el oxígeno fuera efectivamente tóxico para las bacterias, los microorganismos no podrían vegetar al pasarlos a un medio favorable, como sucede; el crecimiento se restablece al exponer de nuevo a un ambiente poco oxigenado cultivos de anaerobios mantenidos en contacto con aire.

2. McLeod y Gordon (1923 *b*) sugieren que los gérmenes anaerobios elaboran pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno al exponerlos al aire, y como son muy sensibles al producto, la presencia de éste no los deja desarrollarse. Esta explicación se funda en ciertas observaciones relativas al crecimiento de anaerobios en un medio de sangre; pues los mencionados autores advirtieron que los gérmenes anaerobios producían una zona de decoloración verdosa unos 3 mm por debajo de la superficie de tubos de agar-sangre (achocolatado) calentados. El desarrollo era muy similar al del neumococo en el mismo medio, y este germen se conoce como productor de peróxido.

Avery y Morgan (1924), trabajando con varias cepas de neumococos, *Streptococus pyogenes* y *Diplococcus mucosus*, llegan a las mismas conclusiones. Para favorecer la formación y acumulación de peróxido en cultivos en caldo de los microbios citados, son condiciones favorables el acceso libre de aire y la ausencia de catalasa, peroxidasa y otros catalizadores capaces de descomponer el producto. En ausencia de oxígeno libre no se forma peróxido de hidrógeno, y en presencia de un catalizador adecuado, el peróxido no se acumula al cultivar los gérmenes en condiciones aeróbicas.

Se sabe que la función de la catalasa consiste en descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Aunque no pudo

promover el crecimiento de microorganismos anaerobios en contacto con aire, la adición de un extracto rico en catalasa elevó el nivel del desarrollo en tubos de agar casi hasta la superficie. Además, la aparición de un anillo verde en cultivos de anaerobios en agar achocolatado se retrasó mucho, y disminuyó agregando catalasa.

Es sumamente difícil demostrar que los anaerobios producen peróxido, pues su vida activa se contrarresta por exposición al aire antes de haberse acumulado en cultivos peróxido suficiente para dar una reacción positiva. Se ha demostrado que colonias de *Clostridium botulinum* formadas en la superficie de placas de agar-sangre, previamente tratadas con bencidina, producen halos oscuros al cabo de una hora de exposición al aire, lo que indica la producción de peróxido en presencia de oxígeno. Como los anaerobios estrictos no producen catalasa, los microbios no son capaces de destruir el producto tóxico.

Las bacterias productoras de peróxido poseen mecanismos reductores activos, necesarios para poner hidrógeno activo en contacto con oxígeno y formar así peróxido de hidrógeno. Todas las bacterias fuertemente reductoras y desprovistas de catalasa producen peróxido o decoloración verdosa en agar achocolatado. La cantidad de catalasa que elaboran diferentes especies varía según la sensibilidad de los microorganismos al producto.

En sus investigaciones sobre anaerobiosis, Broh-Kahn y Mirsky (1938) no se muestran de acuerdo con los descubrimientos y conclusiones de McLeod y Gordon. Estos autores destruyeron el mecanismo aeróbico de *Escherichia coli* colocando los gérmenes en un medio que contenía cianuro. El sistema respiratorio de los microorganismos así envenenados se sustituyó agregando un sistema de colorante reversible de potencial apropiado. En estas condiciones, los microbios no pudieron tolerar ya el oxígeno libre, y se condujeron como anaerobios estrictos. Según manifiestan,

> ... está demostrado que el *E. coli*, cuando no se consume oxígeno, es incapaz de formar peróxido, por lo que es natural presumir que a la producción de éste debe preceder consumo de oxígeno... Para obtener las cantidades de peróxido que se consideran capaces de detener el crecimiento, hay que consumir oxígeno más que suficiente para poderlo registrar con el manómetro. Sin embargo, nunca se ha visto que los anaerobios obligados consuman este gas (Fujita y Kodama, 1934; Stickland, 1935). Con microorganismos tales como los neumococos y la *E. coli* desarrollados en presencia de cianuro y colorante, puede comprobarse el consumo de grandes cantidades de oxígeno y la formación de peróxido, y la inhibición se puede atribuir justamente a este factor. La relativa tolerancia de los primeros al H_2O_2 les permite desarrollarse hasta que se acumula peróxido en cantidad suficiente para la inhibición.

3. Quastel y Stephenson (1926) suponían que la vegetación anaeróbica depende de un bajo potencial de oxidación-reducción, imposible

en presencia de oxígeno libre. Reed y Orr (1943) hallaron que unas quince especies de clostridios patógenos crecían con exuberancia de pequeñas resiembras en una solución simple de peptona ligeramente alcalina, siempre que se ajustara a un potencial favorable de oxidación-reducción. El Eh óptimo correspondía a la región de —0,2 voltios. Una reducida concentración de glucosa daba un potencial de oxidación-reducción aproximado al más conveniente para la especie. El tioglicolato sódico, la cisteína, el ácido ascórbico y el formaldehidosulfoxilato sódico producían potenciales de oxidación-reducción más ponderados que la glucosa.

Generalmente se cree que un potencial adecuado de oxidación-reducción es la causa principal de que los anaerobios dejen de desarrollarse en presencia de oxígeno libre. Sin embargo, como la *E. coli* tratada con cianuro se reproduce fácilmente en presencia de aire, es dudoso que el crecimiento de gérmenes anaerobios dependa por entero de un potencial adecuado de oxidación-reducción.

En conclusión, puede decirse que ninguna teoría explica del todo por qué los microorganismos anaerobios no medran en presencia de oxígeno libre.

Cultivo de bacterias anaerobias. Se han ideado diversos procedimientos para cultivar bacterias anaerobias; unos se valen de medios líquidos, y otros, de preparaciones sólidas. Todos ellos tienden a excluir el oxígeno atmosférico del ambiente; en algunos, se agregan a los medios ciertos elementos para reducir el potencial de oxígeno; y en otros, especialmente cuando se emplean medios sólidos, los cultivos se incuban en vasijas cerradas, de las cuales se desalojan el oxígeno por absorción o por separación mecánica.

Adición de productos reductores. La adición de cuerpos reductores, tales como cisteína glucosada, formaldehidosulfoxilato sódico o tioglicolato sódico a medios líquidos, permite generalmente la vegetación de gérmenes anaerobios en condiciones aeróbicas. Las resiembras grandes son más eficaces que las pequeñas, por el transporte de substancias reductoras al nuevo medio nutritivo.

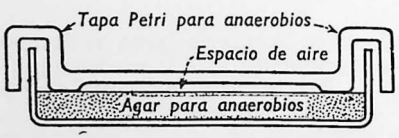


Fig. 142. — Técnica del empleo de la cubierta de Brewer para placa de Petri y del agar anaeróbico.

Brower (1942) introdujo una tapa de placa de Petri y un medio de agar que contenía tioglicolato sódico y azul de metileno, para el cultivo superficial de bacterias anaerobias (fig. 142). Se funde el agar anaeróbico, se enfría a 50° C, se vierte en una placa de Petri y se deja endurecer. En la superficie del agar se siembra el microorganismo en estrías, y la tapa de la placa se sustituye por la cubierta anaeróbica de Brewer, destinada a ponerse en contacto con el agar por la periferia y apresar un poco de aire (menos de 1 mm de espesor) por encima de la superficie del agar. El tioglicolato sódico del medio consume el oxígeno de esta pequeña capa de aire, para crear condiciones anaeróbicas. El cerco de vidrio de la cubierta forma un cierre con el agar húmedo e impide que entre más oxígeno atmosférico; el azul de metileno del agar sirve de indicador, y el centro de la placa, que es anaeróbico, se vuelve incoloro; el orbe oxigenado de la placa, en unos 5 mm de diámetro, permanece azul.

Empleo de gérmenes aerobios para absorber oxígeno. Un tubo de agar profundo, con un carbohidrato apropiado, se funde y se vierte en una placa de Petri. Cuando el agar se ha solidificado, se pone la placa en una incubadora hasta que la superficie no presente gotas de humedad. La placa se divide en dos partes, trazando una gruesa raya en el fondo con un lápiz graso; en una de las partes se siembra en estrías un cultivo de gérmenes anaerobios, y en la otra se hace lo mismo con un cultivo de microorganismos aerobios, como la *Serratia marcescens*. Se vuelve a colocar la tapa, y los bordes de las dos mitades se ocluyen cuidadosamente con plasticina o arcilla plástica. La placa se incuba en posición invertida, a fin de que no se acumule agua de condensación en la superficie del agar; la humedad puede hacer que la vegetación se extienda y no se desarrollen colonias bien aisladas.

El microorganismo aerobio facultativo aprovecha el oxígeno libre y elimina dióxido de carbono. La tensión de oxígeno disminuye pronto a un nivel que permite desarrollarse al germen anaerobio, y en la placa deben aparecer colonias bien aisladas del mismo.

Empleo de tejidos vivos o muertos. Para el cultivo de anaerobios estrictos se han utilizado trocitos de riñón, hígado, etcétera, retirados asépticamente de un animal, o tejidos de corazón o sesos de buey picados y esterilizados al calor.

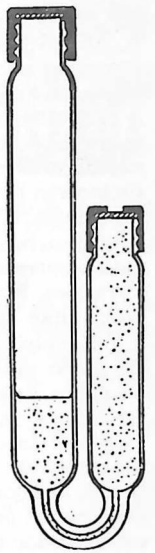


Fig. 143 Tubo de cultivo en líquido anaeróbico (según Wilson). Véase la descripción en el texto.

Los sesos picados y esterilizados se han empleado probablemente más que ninguna otra preparación de tejidos para cultivar anaerobios. Se suspenden sesos cocidos y picados de oveja en caldo glucosado. Antes de la siembra, el medio se calienta diez minutos en un esterilizador de Arnold, a fin de eliminar en lo posible el oxígeno disuelto. Se deja enfriar el tubo a una temperatura aproximada de 50° C, y se siembra con un asa o una pipeta a bastante profundidad. No es necesaria una oclusión superficial, pues los tejidos de sesos picados aumentan lo suficiente el poder reductor del medio. El desarrollo anaeróbico se inicia primero junto al fondo del tubo.

Uso de un tubo de cultivo con líquido anaeróbico. Wilson (1950) ha descrito un sencillo artificio para cultivar bacterias anaerobias en un medio líquido sin añadir productos reductores ni trozos de tejidos (fig. 143). Consiste en dos tubos de ensayo de distinto tamaño, provistos por arriba de cápsulas de rosca y unidos por abajo mediante un tubo capilar de paredes gruesas. La cubierta plástica del tubo más pequeño presenta un pequeño agujero, y ambas cápsulas llevan unas empaquetaduras gruesas de goma que constituyen cierres herméticos una vez atornilladas aquéllas.

Los tubos se preparan como sigue: Se introduce caldo de la composición que convenga, para llenar el tubo pequeño y se impide que pase al grande apretando la cápsula de éste. Una vez lleno el tubo pequeño, se atornilla bien su cápsula se retira entonces la del tubo grande, y se introducen unos 25 mm de caldo. Se vuelve a colocar la cápsula, sin apretar, y el aparato, con el caldo que contiene, se esteriliza en posición vertical en autoclave, a

121° C, durante veinte minutos. Cuando el tubo se retira de la autoclave y se deja enfriar, la rama menor se llena de medio nutritivo, el cual se mantiene reducido, mientras que el de la rama mayor se oxida pronto por contacto con aire.

El material de siembra se puede incorporar al caldo del tubo grande mediante una pipeta que se inserta en el orificio del capilar, o en el tubo pequeño, a través de la empaquetadura de goma, utilizando una jeringa con aguja.

El desarrollo de los microorganismos anaerobios comienza en la rama pequeña, pero cuando es particularmente vigoroso, se observa en ambos tubos, y estará reducido en consecuencia.

Empleo de agar semisólido. La adición de 0,05 a 0,2 % de agar a un medio apropiado proporciona generalmente condiciones insuperables para el rápido desarrollo de gérmenes anaerobios. El agar ocasiona diversos grados de tensión de oxígeno, y permite la vegetación de anaerobios sin precauciones especiales. El medio debe inocularse a bastante profundidad si la concentración de oxígeno es muy baja; la parte superior del mismo se presta bien a este desarrollo, y por debajo, el agar produce concentraciones de oxígeno muy variables, proporcionando así un medio adecuado para el cultivo de numerosos tipos de bacterias.

Exclusión del oxígeno atmosférico. Se hace una resiembra en un tubo de caldo nutritivo profundo o en un caldo carbohidratado conveniente, y se cubre luego con una capa de unos 12 mm de vaspar (mezcla a partes iguales de vaselina y parafina) fundido estéril. Aunque esto no impide por completo la entrada de oxígeno, basta generalmente para que se inicie el desarrollo de los anaerobios menos molestos. Una vez comenzado el desarrollo, la eliminación de dióxido de carbono por los microorganismos crea unas condiciones óptimas para su reproducción. Conviene calentar el medio en un esterilizador de Arnold durante diez minutos, antes de la resiembra, a fin de eliminar en lo posible el oxígeno disuelto.

En lugar de caldo puede emplearse agar. El medio se funde y se enfría a unos 50° C, y entonces se siembra en el agar el anaerobio, mezclándolo bien por agitación suave y rotación del tubo; se deja solidificar en posición vertical, y luego se cubre la superficie con una capa de 12 mm de vaspar fundido.

Este método es útil porque proporciona un medio muy sencillo de medir la tensión de oxígeno; en la superficie, la presión es atmosférica, y en el fondo, las condiciones son anaeróbicas. El cilindro de agar se extrae cortando el tubo por su mitad, separando las dos partes y recogiendo el agar en una placa de Petri esterilizada. Entonces se pueden tomar del medio las colonias para examinarlas.

Absorción del oxígeno atmosférico. En un medio de agar inclinado se siembra el microorganismo que ha de cultivarse. El tapón de algodón se corta a ras de la embocadura del tubo, y se empuja hasta unos 12 mm por debajo de ella; la superficie del tapón se cubre con una capa de cristales de pirogalol, y se humedece luego con unas gotas de solución de hidróxido sódico. Se inserta en la boca del tubo un tapón ajustado de goma, para excluir el oxígeno atmosférico. El pirogalol alcalino absorbe oxígeno del ambiente y crea condiciones compatibles con el desarrollo de los gérmenes anaerobios. Este procedimiento suele ser satisfactorio para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

Una disposición más conveniente es utilizar una placa de Bray o de Spray para cultivos de anaerobios (fig. 144). La placa está dividida por el

fondo mediante un relieve central; en uno de los compartimientos se pone solución de pirogalol, y en el otro, solución de hidróxido sódico. Se vierte en una placa de Petri agar fundido, y se deja endurecer; en la superficie se siembran estrías del germen anaerobio. Luego se invierte la placa por encima del platillo de cultivo, y los bordes se ocluyen con un material apropiado, como plasticina, para que no entre oxígeno atmosférico. Por último, las soluciones del fondo se mezclan inclinando ligeramente el platillo.

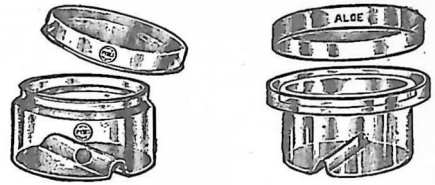


Fig. 144. — Izquierda, platillo de Bray para cultivo de anaerobios. Derecha, platillo de Spray para cultivo de anaerobios.

Sustitución del oxígeno atmosférico por hidrógeno. En este procedimiento, los tubos inoculados se colocan en una vasija cerrada, de la que se extrae el aire, que se reemplaza con hidrógeno; seguidamente se lleva el recipiente a la estufa.

Esto no resulta siempre satisfactorio, porque suele quedar en el medio oxígeno suficiente para impedir la proliferación. El método mejora notablemente vertiendo en la vasija una solución alcalina de pirogalol cuando se está a punto de desalojar el aire; es preferible colocar unos cristales de pirogalol, y añadir luego suficiente solución de hidróxido potásico para disolver el producto. A continuación se vuelve a poner la tapa y se elimina el aire cuanto antes; el pirogalol absorbe cualquier indicio de oxígeno remanente en el medio, y así pueden desarrollarse los gérmenes anaerobios estrictos.

Con frecuencia, en vasijas de cultivo anaeróbico se pone una solución de azul de metileno como indicador; este colorante permanece azul en estado de oxidación, y se vuelve incoloro al reducirlo.

Una solución de indicador se prepara muy bien como sigue:

Solución A: 6 ml. de NaOH N/10, diluída hasta 100 ml con agua destilada.

Solución B: 3 ml de una solución acuosa de azul de metileno al 0,5 %, diluída hasta 100 ml con agua destilada.

Solución C: 6 g de glucosa disueltos en 100 ml de agua destilada, con un pequeño cristal de timol como preservativo.

Se mezclan partes iguales de las tres soluciones en un tubo de ensayo, se pone éste en agua hirviente, y se calienta el contenido hasta que desaparezca el color. Se llena el tubo a la vasija que contiene los microorganismos que han de cultivarse, y en seguida se evacua aquélla; si la solución permanece incolora, el recipiente está bien desoxigenado, y, si vuelve el color azul, las condiciones no son anaeróbicas. La mezcla de las tres soluciones habrá de prepararse de nuevo en cada caso.

Combustión de oxígeno con hidrógeno. Las colonias superficiales son realmente esenciales para purificar e identificar gérmenes anaerobios. La eliminación de oxígeno por combustión con hidrógeno constituye probablemente el método más eficaz para obtener colonias superficiales de anaerobios.

La primera realización práctica de una vasija de este tipo fué anunciada por Fildes (1931). En la figura 145 se reproduce una modificación conveniente de Evans, Carlquist y Brewer (1948).

Para más información sobre anaerobiosis, véanse Brown y Brewer (1938), McClung (1943), y Morton (1943).

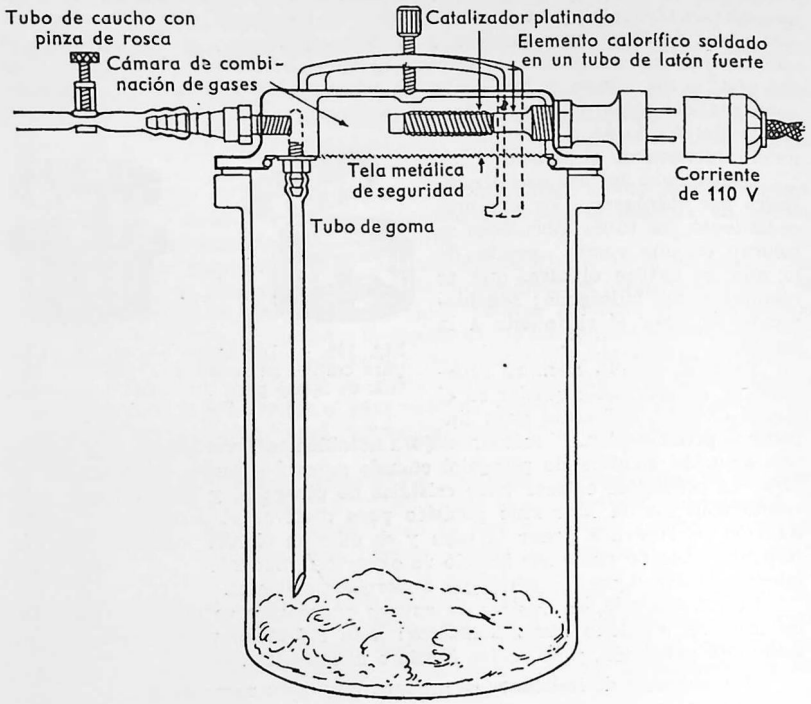


Fig. 145. — Sección transversal de la vasija anaeróbica de Brewer modificada, con detalles constructivos. (Según Evans, Carlquist y Brewer.)

REDUCCIÓN DE NITRATOS

La reducción de nitratos viene empleándose desde hace mucho tiempo como ensayo para separar bacterias en varios grupos (fig. 146), y sirve para identificar y clasificar estos microorganismos.

El término reducción de nitratos comprende todos los procesos en que el nitrato desaparece por obra de la acción bacteriana y se presenta en un estado algo menos oxidado. En muchos casos, la reducción se detiene en la fase de nitrito; pero se conocen ejemplos de reducción de nitrato a nitrógeno molecular. Este último proceso parece responder exclusivamente a la influencia de bacterias.

Un microorganismo que toma nitrato del medio y lo utiliza para la síntesis de su proteína celular, puede considerarse también como reductor de nitratos. Sin embargo, existen motivos fundados para distinguir entre organismos que asimilan nitrato y los que tienen la propiedad

de reducir el compuesto y excretar la mayoría de los productos de la reducción en el medio circundante.

Partiendo de las consideraciones que anteceden, las reducciones biológicas de nitratos pueden clasificarse en tres tipos:

1. Reducción asimilatoria o asimilación de nitratos.
2. Reducción incidentalmente disimilatoria de nitratos, en la que éstos actúan como simples receptores de hidrógeno, no esenciales.
3. Reducción disimilatoria verdadera de nitratos, en la que éstos funcionan como receptores de hidrógeno, esenciales para el crecimiento.

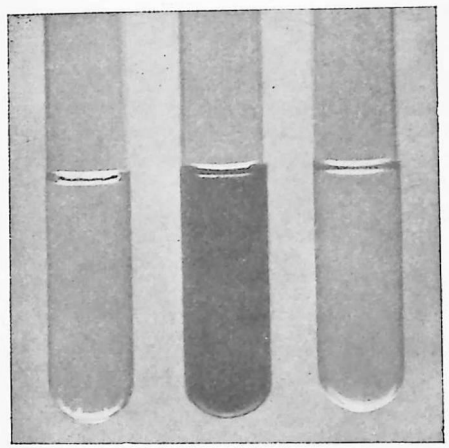


Fig. 146. — Reducción de nitrato a nitrito. Izquierda, contraste no inoculado. Centro, medio inoculado con *Proteus vulgaris*; nitrato reducido a nitrito: color rojo con soluciones indicadoras de ácido sulfanílico + α-naftilamina. Derecha, medio inoculado con *Pseudomonas fluorescens*; no se ha reducido el nitrato.

En el tipo tercero, sólo reducen nitratos los microorganismos anaerobios que se desarrollan en condiciones anaeróbicas. Estos gérmenes medran muy bien en ausencia de nitrato, si en el medio existe una provisión adecuada de nitrógeno. En ambiente anaeróbico, el nitrato puede substituir al oxígeno como receptor de hidrógeno; en consecuencia, el nitrato se reduce. Esto no sucede cuando el cultivo está bien aireado.

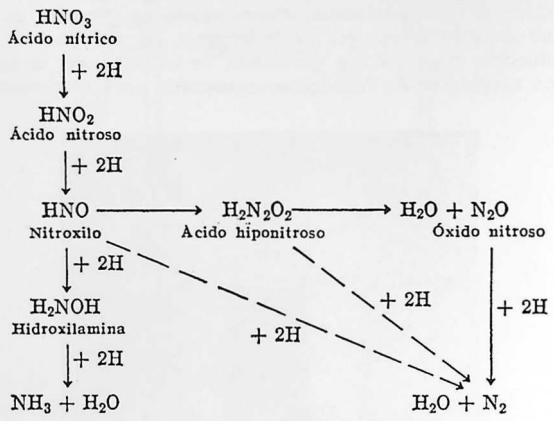
La oxidación anaeróbica de ácido láctico en presencia de deshidrogenasa láctica y nitrato potásico como receptor de hidrógeno se puede representar así:

$$\underset{\text{Ácido láctico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}COOH} + KNO_3 \rightarrow \underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH} + H_2O + KNO_2$$

Sacks y Barker (1952) han cultivado *Pseudomonas denitrificans*, en condiciones desnitrificantes, en un medio sintético que contenía nitrato

potásico y succinato sódico, e informan que el succinado, donador de hidrógeno, queda completamente oxidado a dióxido de carbono, mientras que el nitrato se reduce a nitrógeno.

Verhoeven (1952) ha propuesto el siguiente esquema de la reducción de nitratos:



Los productos finales comprenden nitrito, óxido nitroso, amoníaco y nitrógeno, y los forman regularmente las bacterias aerobias esporíparas del género *Bacillus*.

Es posible reconocer las especies bacterianas capaces de reducir nitrato a nitrógeno gaseoso poniendo un medio con nitrato en tubos de ensayo que contengan ampolletas invertidas, donde el gas nitrógeno queda alojado y puede observarse.

Al efectuar ensayos de reducción de nitratos, hay que observar la reducción de nitrato a nitrito, la desaparición de nitrito para dar amoníaco y la presencia de nitrógeno gaseoso. Es muy importante hacer reacciones de estos tres productos.

La presencia de nitrito indica que el nitrato se ha reducido; la de gas, que el nitrito se ha reducido a amoníaco, y finalmente a nitrógeno. Resultados negativos pueden significar que el microorganismo ensayado no es capaz de reducir nitratos, o que el medio no es adecuado para su desarrollo. El medio se puede mejorar aumentando o disminuyendo la proporción de peptona, aumentando la concentración de nitrato, ajustando la reacción del medio a un pH más favorable, añadiendo un carbohidrato fácilmente asimilable para estimular la vegetación o incorporando una pequeña cantidad de agar para hacer más viscoso el medio.

La prueba del nitrito puede resultar negativa aunque el desarrollo haya sido bueno; esto indica falta de acción sobre el nitrato, o reducción del mismo hasta rebasar la fase de nitrito. Por consiguiente, si la

reacción de nitritos es negativa, deberá recurrirse a las de nitratos, empleando difenilamina y ácido sulfúrico concentrado; una coloración azul indica la presencia de nitrato. Como los nitritos dan la misma reacción, no se debe hacer la prueba en su presencia. Si en los ensayos no se comprueba la reducción de nitratos, es probable que el germen no sea capaz de atacarlos.

Para más datos sobre reducción de nitratos, véanse Allen y Van Niel (1952), Sacks y Barker (1949).

REDUCCIÓN DE SULFATOS

Ya en 1864 se sugirió que el sulfuro de hidrógeno producido en el lodo provenía de la reducción de sulfatos por microorganismos. Generalmente se cree que Beijerinck (1895) fué quien primero cultivó un germen sulfatorreductor procedente del lodo, y le dió el nombre de *Spirillum desulfuricans*.

Para aislar satisfactoriamente el microbio, Van Delden (1904) utilizó el siguiente medio:

Gelatina	10 g
Lactato sódico	0,5 g
Asparagina	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,1 g
K_2HPO_4	0,05 g
Sulfato ferroamónico	Indicios
Agua, cantidad suficiente para 1000 ml.	

Los microorganismos adquieren energía por reducción anaeróbica del sulfato, acompañada de oxidación simultánea del lactato. Se obtienen así anhídrico carbónico y sulfuro de hidrógeno en la proporción de 2: 1. De aquí dedujo Van Delden la siguiente reacción:

$$2\,CH_3 \cdot CHOH \cdot COONa + 3\,MgSO_4 \rightarrow 3\,MgCO_3 + Na_2CO_3 + 2\,CO_2 + 2\,H_2O + 3\,H_2S$$

En presencia de malato sódico, en vez de lactato, la reacción es como sigue:

$$2\,COONa \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot COONa + 3\,MgSO_4 \rightarrow 3\,MgCO_3 + 2\,Na_2CO_3 + 3\,CO_2 + H_2O + 3\,H_2S$$

donde la relación molecular entre el anhídrido carbónico y el sulfuro de hidrógeno es de 8: 3, aproximadamente.

La reducción de sulfatos se puede representar por esta ecuación general:

$$2\,C + MeSO_4 + H_2O \rightarrow MeCO_3 + CO_2 + H_2S$$

en la que C designa el substrato orgánico y Me un metal.

Según Baars (1930), el lactato o el malato se pueden substituir por numerosos compuestos orgánicos que se oxidan en un medio sulfatado idóneo inoculado con el germen específico. Las substancias orgánicas se oxidan por eliminación de hidrógeno, es decir, actúan como donadores de éste. He aquí algunos ejemplos típicos:

$$\underset{\text{Ácido fórmico}}{H\cdot COOH} \rightarrow CO_2 + 2\,H$$

$$\underset{\text{Ácido acético}}{CH_3\cdot COOH} + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CO_2 + 8\,H$$

$$\underset{\text{Ácido láctico}}{CH_3\cdot CHOH\cdot COOH} + 3\,H_2O \rightarrow 3\,CO_2 + 12\,H$$

$$\underset{\text{Glicerina}}{CH_2OH\cdot CHOH\cdot CH_2OH} + 3\,H_2O \rightarrow 3\,CO_2 + 14\,H$$

En la reducción de sulfato, cada molécula requirió 8 átomos de hidrógeno para convertirse en gas sulfhídrico. La deshidrogenación del substrato orgánico fué gradual, seguida de una hidrogenación correspondiente del sulfato para producir sulfuro de hidrógeno:

$$H_2SO_4 + 8\,H \rightarrow H_2S + 4\,H_2O$$

Se ha comprobado que no es completa la oxidación de no estar presente el compuesto orgánico en considerable exceso.

Microorganismos. Los reductores de sulfatos se incluyen ahora en el género *Desulfovibrio*, del que se han identificado tres especies: *D. desulfuricans, D. aestuarii* y *D. rubentschickii.* ZoBell caracteriza el género como sigue: «bastoncitos ligeramente curvados, de longitud variable, generalmente sueltos, a veces en cadenas breves con aspecto de espirilos; son corrientes las formas pleomórficas hinchadas; se mueven activamente por medio de un solo flagelo polar; anaerobios estrictos, que reducen sulfatos a sulfuro de hidrógeno; se encuentran en agua de mar, fango marino, agua dulce y en el suelo». Las bacterias pueden utilizar sulfito, tiosulfato y acaso azufre elemental, en substitución de sulfato.

Los gérmenes se pueden cultivar sembrando tierra o lodo en medios sintéticos que contengan 0,5 % de sulfato sódico, e incubando el cultivo en ambiente anaeróbico. Postgate (1951 *a*) recomienda un medio compuesto de 5 g de peptona, 4 g de extracto de levadura, 1,5 g de Na_2SO_4, 1,5 g de $MgSO_4\cdot 7\,H_2O$, 10 g de glucosa y 100 ml de agua destilada, ajustado a un pH de 7,2. En este medio ha resultado preferible la glucosa al lactato. El extracto de levadura hace falta por su contenido en factores de crecimiento, y la peptona aporta ciertos aminoácidos esenciales.

Se obtienen colonias aisladas sembrando en estría una asa de cultivo líquido sobre la superficie de un medio de agar-sulfato con indicios de una sal de hierro como indicador. El sulfuro de hidrógeno producido por los microbios reacciona con la sal de hierro para producir sulfuro ferroso, que da a las colonias color negro.

Según Starkey (1948), estas bacterias son las únicas capaces de reducir directamente sulfatos a sulfitos; a causa de esta reacción, se cuenta entre los gérmenes nocivos acuáticos. Además de que el sulfuro hace el agua impotable y fétida, las bacterias pueden corroer el acero y el hierro fundido en sistemas de distribución de agua.

Se dice que estos microorganismos contribuyen a la formación de petróleo y a su modificación ulterior. Una propiedad de ciertas cepas, recién descubierta y útil en potencia, es la de separar aceite mineral de sedimentos que lo contengan.

Véase más información sobre el tema en Bromfield (1953), Butlin, Adams y Thomas (1949), y Postgate (1951 *b*, 1952).

REDUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO Y FORMACIÓN DE METANO

Söhngen (1910) fué probablemente quien primero hizo saber que ciertas bacterias podían descomponer sales de diversos ácidos grasos en dióxidos de carbono y metano. No pudo aislar cultivos puros de ellas, pero empleando mezclas de especies demostró que el formiato se descomponía según la ecuación

$$4\,H\cdot COOH \rightarrow CH_4 + 3\,CO_2 + 2\,H_2O$$

El cultivo mixto productor de la precedente reacción era también capaz de sintetizar metano a partir de dióxido de carbono e hidrógeno:

$$CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O$$

Las importantes bacterias del metano son todas anaerobias estrictas, y se encuentran en tres géneros: *Methanobacterium, Methanococcus* y *Sarcina,* con los siguientes caracteres:

1. *Methanobacterium.* Bastoncillos rectos o ligeramente curvos, a veces unidos en paquetes o cadenas largas; generalmente inmóviles, a veces forman esporas. Oxidan varios compuestos orgánicos e inorgánicos, y reducen el dióxido de carbono a metano; suelen ser gramnegativos; se encuentran en fango de canales, alcantarillas, sedimentos de agua dulce en condiciones anaeróbicas. Se han identificado dos especies: *M. soehngenii* y *M. omelianskii.*

2. *Methanococcus.* Células esféricas, sueltas o en masas agregadas; inmóviles; no producen esporas. Reacción variable al gram; fermentan diversos compuestos orgánicos, y producen metano; se encuentran en tierra de jardín, fango sulfhídrico y heces. Se conoce una especie: *M. mazei.*

3. *Sarcina.* Células esféricas, divididas por tres planos para producir paquetes; generalmente variables al gram; inmóviles. Fermentan acetato y butirato cálcicos, para dar metano, dióxido de carbono y carbonato cálcico; se encuentran en el lodo. Hay una especie productora de metano: *S. methanica.*

Barker ha comprobado que los *Methanobacterium* obtenían su energía de la oxidación de alcoholes. Los alcoholes primarios dan los ácidos grasos respectivos al oxidarse, y los secundarios dan las correspondientes cetonas. Como las reacciones son anaeróbicas, el dióxido de carbono actúa de receptor de hidrógeno, que se reduce a metano, según las ecuaciones

$$\underset{\text{Alcohol etílico}}{2\ C_2H_5OH} + CO_2 \rightarrow \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + CH_4$$

$$\underset{\text{Alcohol butílico}}{2\ C_4H_9OH} + CO_2 \rightarrow 2\ \underset{\text{Ácido butírico}}{C_3H_7{\cdot}COOH} + CH_4$$

$$\underset{\text{Alcohol isopropílico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_3} + CO_2 \rightarrow 4\ \underset{\text{Acetona}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_2} + CH_4 + 2\ H_2O$$

Véase más información en Stadtman y Barker (1949).

NECESIDAD DE DIÓXIDO DE CARBONO PARA LAS BACTERIAS

Dado que el dióxido de carbono es un producto del metabolismo orgánico, antes se tenía por un gas inútil y tóxico; pero hoy no puede pensarse así.

Es bien sabido que no se desarrollan bacterias cuando falta por completo dióxido de carbono; tiene que acumularse determinada cantidad de gas para que se inicie el crecimiento. Muchas bacterias vegetan mejor en presencia de dióxido de carbono bastante concentrado. Algunos microorganismos recién aislados de enfermos no crecen, o lo hacen débilmente, a menos que la concentración de ese gas en el ambiente se eleve hasta 5 a 10 %. Una vez iniciado el desarrollo en medios artificiales, ya no hace falta que el gas esté tan concentrado.

Ciertas bacterias contienen un pigmento conocido por bacterioclorofila, que les permite elaborar sus propios carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua, en presencia de luz; tales son las bacterias fotosintéticas. Sin embargo, la mayoría de sus congéneres no contienen bacterioclorofila, y son incapaces de sintetizar su propio carbohidrato del modo indicado.

Hoy se admite generalmente que el dióxido de carbono desempeña un papel importante en el metabolismo de diversos microorganismos heterotróficos, que lo utilizan e incorporan sobre todo a los grupos carboxilo de los ácidos carboxílicos (véase también pág. 432).

Variación de la producción de dióxido de carbono con la edad. Las células jóvenes muestran un metabolismo mucho más rápido que el de las viejas. Huntington y Winslow (1937) informaron que la producción de dióxido de carbono de bacterias de una hora constituía el triplo o el cuádruplo de la de bacterias de 24 horas, y que alcanza su máximo por célula dos a cinco horas después de resembrar células viejas en un

medio nuevo. Rahn (1941) comunicó resultados similares. La separación de dióxido de carbono absorbiéndolo en una solución de hidróxido potásico no impidió el crecimiento de células jóvenes, a menos de ser muy pequeño su número por gota; si en una gota había menos de 10 gérmenes, no se observaba crecimiento en ausencia de dióxido de carbono.

Efectos de siembras grandes y pequeñas. Rahn ha demostrado que grandes concentraciones celulares producen dióxido de carbono con rapidez superior a la necesaria para retirarlo, con lo que las bacterias se desarrollan aunque se emplee hidróxido potásico para absorber el gas. En cambio, las concentraciones celulares ligeras no producen suficiente gas para crecer en presencia de hidróxido potásico. La probabilidad de vegetación disminuye con el número de células por gota. El hecho de que una siembra de muchas células produzca más dióxido de carbono que otra menos concentrada, parece explicar que dure menos la fase lenta en siembras de alguna consistencia (pág. 294).

Estudios sobre trazadores de carbono radiactivo. Slade, Wood, Nier, Hemingway y Werkman (1942) han empleado dióxido de carbono con carbono pesado ($C^{13}O_2$) como trazador, y comprobado que la asimilación del gas era general entre las bacterias heterotróficas. El carbono fijado se hallaba en los grupos carboxilo de los ácidos succínico, láctico y acético; el ácido succínico contenía carbono fijado siempre que se formaba, mientras que con el lactato y el acetato no ocurría lo mismo en todos los casos. Por consiguiente, existen notables diferencias en el mecanismo de formación de estos compuestos por las bacterias heterotróficas.

Se ha indicado el siguiente mecanismo de formación de ácido succínico a partir del ácido pirúvico:

$$C^{13}O_2 + \underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH} \rightleftharpoons \underset{\text{Ácido oxalacético}}{C^{13}OOH{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH}$$

$$C^{13}OOH{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH + 4\ H \rightleftharpoons \underset{\text{Ácido succínico}}{C^{13}OOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + H_2O$$

Barker y Kamen (1945) han señalado que el *Clostridium thermoaceticum* fermentaba carbohidratos, como glucosa y xilosa, con producción de ácido acético exento de dióxido de carbono. Emplearon esta substancia con carbono pesado ($C^{14}O_2$) en calidad de trazador, y de los resultados obtenidos deducen que la fermentación acética de glucosa por el *Cl. thermoaceticum* implicaba una oxidación parcial del substrato para dar dos moléculas de ácido acético y dos de dióxido de carbono, seguida de reducción y condensación del dióxido de carbono en una tercera molécula de ácido acético:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ CH_3{\cdot}COOH + 8\ H + 2\ CO_2$$

$$8\ H + 2\ CO_2 \rightarrow CH_3{\cdot}COOH + 2\ H_2O$$

La reacción de conjunto es

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3\ CH_3{\cdot}COOH$$

Durante la fermentación desaparece un 94 % del C^{14} del dióxido de carbono agregado, y se recupera un 81 % en el ácido acético.

Barker, Kamen y Haas (1945) cultivaron *Butyribacterium rettgeri* en un medio que contenía lactato y $C^{14}O_2$, y observaron que los productos principales eran dióxido de carbono y ácidos acético y butírico. La fermentación fué extraordinaria, por el escaso rendimiento en dióxido de carbono y la abundante producción de ácidos grasos. Los análisis revelaron que todas las posiciones de carbono de estos ácidos contenían el isótopo C^{14} señalado. Estos autores proponen el siguiente esquema de la síntesis de ácidos grasos a partir de lactato y $C^{14}O_2$:

$$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}COOH + H_2O \rightarrow CH_3{\cdot}COOH + CO_2 + 4\,H$$
$$2\,CO_2 + 8\,H \rightarrow CH_3{\cdot}COOH + 2\,H_2O$$
$$2\,CH_3{\cdot}COOH + 4\,H \rightarrow CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH + 2\,H_2O$$

McLean, Robinson y Purdie (1951) han estudiado la fijación de dióxido de carbono por la *Serratia marcescens*, empleando bicarbonato señalado con C^{14}; según ellos, sus datos indican que el dióxido de carbono se utilizó para sintetizar proteína. No sólo es proteína el producto principal de la asimilación de amoníaco, sino que, a juzgar por análisis químicos preliminares de las bacterias, la actividad preponderante no es exclusiva de la fracción lípida, sino también de la proteínica.

Estudios sobre la substitución del dióxido de carbono. Ajl, White y Werkman (1947), y Ajl y Werkman (1948 *a*, *b*; 1949 *a*, *b*), han comprobado que la *Escherichia coli* y el *Aerobacter aerogenes* no crecen en ausencia de dióxido de carbono. Como las bacterias son capaces de fijar este cuerpo en ácido pirúvico para formar ácido succínico a través del ácido oxalacético, conjeturaron que sería posible reemplazar dióxido de carbono con cuerpos resultantes de la fijación, y su razonamiento resultó acertado. Los compuestos de C_3, o sea el ácido glutámico y el ácido α-cetoglutárico, lo substituían más ampliamente que cualquier otro de los ensayados. De esto deducen que los cuerpos añadidos no se limitan a proporcionar dióxido de carbono a los microbios; si así fuera, la inclusión de este gas, después de haber conseguido un crecimiento máximo en su ausencia, habría proporcionado un aumento correspondiente, lo que no sucedió.

En cambio, Gerhardt y Wilson (1950), utilizando *Brucella abortus*, comprobaron que el ácido glutámico y el ácido α-cetoglutárico no sustituían al dióxido de carbono en este microorganismo, como se vió que ocurría con *E. coli* y *A. aerogenes*.

Más información sobre el tema se encontrará en Barker y Elsden (1947), Foster, Carson, Ruben y Kamen (1941), Krampitz, Wood y Werkman (1943), Lynch y Calvin (1952), Van Niel, Ruben, Carson, Kamen y Foster (1942), y Wood (1946).

NECESIDAD DE OXÍGENO DE LAS BACTERIAS

Puede decirse que todas las plantas y animales vivos consumen oxígeno y eliminan dióxido de carbono. Igual sucede con las bacterias, que utilizan oxígeno libre o combinado.

Según Rahn y Richardson (1940), el oxígeno proporcionado a las bacterias en los métodos usuales de cultivo distaba mucho de ser suficiente. Por ejemplo, el bacilo tuberculoso requiere 1,22 % de oxígeno para la oxidación completa de 1 % de glicerina; el medio, a 37° C, con tiene sólo 0,00065 % de oxígeno. La desproporción entre el suministro y el consumo es tan grande, que probablemente mueren por falta de oxígeno la mayoría de las células de un cultivo.

Sensibilidad de los microorganismos al oxígeno. Los microbios difieren considerablemente de este aspecto. Algunos atenúan su desarrollo al aumentar un poco la concentración del oxígeno del aire; otros vegetan con más vigor con concentraciones hasta de 60 %.

Gérmenes aerobios sembrados en medios de cultivo favorables crecen con tensiones reducidas de oxígeno, pero el ritmo de multiplicación es más lento que en condiciones atmosféricas corrientes. Sin embargo, se obtienen resultados muy distintos cultivando tales microbios en condiciones de inedia más o menos intensa. Cahn-Bronner (1940) cultivó *Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella typhosa, S. Schottmuelleri, Shigella dysenteriae, S. paradysenteriae, Corynebacterium diphtheriae, Micrococcus pyogenes* var. *aureus* y *M. pyogenes* var. *albus*, en condiciones de inanición parcial, en tubos que contenían una alta columna de agar, y comprobaron que los gérmenes se desarrollaban en una capa delgada y densa debajo de la superficie del medio, donde más propicia era la relación entre el material nutritivo y el oxígeno. Aumentando la inanición (medio más diluído), las bacterias se fueron haciendo cada vez más sensibles al oxígeno. Cuanto más baja es la concentración de los compuestos de carbono en el medio, los cuales pueden servir de receptores de oxígno, más inhibitoria es la acción del oxígeno frente a los microorganismos.

Potter (1942) restringió la provisión de oxígeno a bacilos de tuberculosis humana, bovina y aviar, en presencia de humedad y calor, y comprobó que los gérmenes perdían poco a poco su capacidad de ulterior desarrollo, tanto en cultivos como en tejidos animales.

COCIENTES RESPIRATORIOS DE LAS BACTERIAS

Se conoce por cociente respiratorio la relación entre el dióxido de carbono eliminado y el oxígeno consumido. Puede expresarse así:

$$\frac{CO_2}{O_2} = R.Q.$$

La oxidación total de un carbohidrato, como la glucosa, da CO_2 y H_2O, según la ecuación

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

Y como el volumen de CO_2 eliminado es igual al de oxígeno consumido, el cociente respiratorio teórico para un carbohidrato es

$$\frac{6\ CO_2}{6\ O_2} = 1$$

La combustión de grasas suele representarse por la oxidación de palmitina como sigue:

$$2\ (C_{15}H_{31}COO)_3C_3H_5 + 145\ O_2 \rightarrow 102\ CO_2 + 98\ H_2O$$

de modo que el cociente respiratorio para una grasa es

$$\frac{102\ CO_2}{145\ O_2} = 0{,}70$$

Análogamente, el cociente respiratorio de una proteína totalmente quemada sería 0,80.

La presencia de un carbohidrato fácilmente utilizable en un medio da un cociente aproximado de 1; en ausencia de tal carbohidrato, el cociente se acerca al de una proteína. El cociente respiratorio permite darse una idea de las substancias nutritivas que consume un microorganismo.

TABLA 24. COCIENTES RESPIRATORIOS DE ALGUNAS BACTERIAS EN DISTINTOS MEDIOS

Microorganismo	Agar nutritivo	Agar glicerina	Agar glucosa	Agar suero
Mycobacterium tuberculosis var. *hominis*	.....	0,856	0,992	0,904
Mycobacterium tuberculosis var. *bovis*	0,888	0,903	1,036	0,852
Bacillus subtilis	0,912	0,843	1,278	0,874
Malleomyces mallei	0,841	0,859	0,972	
Cociente teórico	0,810	0,857	1,000	0,810

Soule (1928) dió a conocer los cocientes respiratorios de diversos gérmenes desarrollados en medios de cultivo de diferentes tipos. Los resultados se exponen en la tabla 24, por la que puede apreciarse que la adición de glucosa a los medios hizo subir los cocientes respiratorios. Como la combustión de glucosa pura da un cociente de 1, en varios casos se obtuvo un valor próximo a éste; los inferiores a la unidad indican que el microbio utiliza aminoácidos a la vez que glucosa. A falta de ella, los cocientes respiratorios se acercan al de la proteína pura.

Un factor que hace inciertos los cocientes es la descarboxilación de aminoácidos y ácidos orgánicos, con rendimiento mayor en dióxido de carbono del correspondiente al consumo de óxígeno; es posible que esto explique los cocientes superiores a 1.

ASIMILACIÓN Y RESPIRACIÓN

Barker (1936) expuso que la oxidación de carbohidratos por ciertos microbios, en presencia de oxígeno abundante, no es completa ($CO_2 + H_2O$), sino que las células asimilaban parte del substrato. Este autor representa la asimilación oxidativa de acetato por el microorganismo *Prototheca Zopfii* del siguiente modo:

$$\underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + O_2 \rightarrow (CH_2O) + CO_2 + H_2O$$

El ácido acético se transforma por oxidación en dióxido de carbono, agua y un compuesto con fórmula empírica de carbohidrato. En opinión de Barker, la oxidación de compuestos orgánicos por la *P. Zopfii* es un proceso de asimilación oxidativa que conduce a la síntesis de un carbohidrato, el cual se acumula en las células.

Clifton (1937) realizó experimentos con *Pseudomonas calcoacetica*, y sus resultados son similares a los comunicados por Barker. La asimilación oxidativa de acetato y butirato por el microbio se representa por las ecuaciones

$$\underset{\text{Acetato}}{2\ CH_3{\cdot}COOH} + 3\ O_2 \rightarrow (CH_2O) + 3\ CO_2 + 3\ H_2O$$

$$\underset{\text{Butirato}}{2\ C_3H_7{\cdot}COOH} + 7\ O_2 \rightarrow 3\ (CH_2O) + 5\ CO_2 + 5\ H_2O$$

Añadiendo yodoacetato, azida sódica, 2,4-dinitrofenol o metiluretano a concentraciones adecuadas, Clifton logró envenenar selectivamente las células e impedir así la asimilación, pero no la respiración, con lo que todo el substrato se oxidó por completo, dando dióxido de carbono y agua. En ausencia de tóxicos de la asimilación, el cociente respiratorio del butirato durante la fase de oxidación rápida resultó ser 0,68; habiendo tóxicos (oxidación completa), fué de 0,8.

Han comunicado resultados análogos Giesberger (1936), a base del estudio de tres especies de *Spirillum*; Clifton y Logan (1939), respecto

a la *Escherichia coli*; Stier, Newton y Sprince (1939); Stier y Newton (1939); Winzler y Baumberger (1938); Pickett y Clifton (1943), y Van Niel y Anderson (1941), con referencia a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como Burris y Wilson (1942) en cuanto a especies de rizobios.

Véase más información en Clifton (1947).

CICLO DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

Krebs (1940) señala que, en la mayoría de los tejidos animales ya investigados, la ruta principal de la respiración termina con el ciclo del ácido cítrico. A juicio de Ajl (1951),

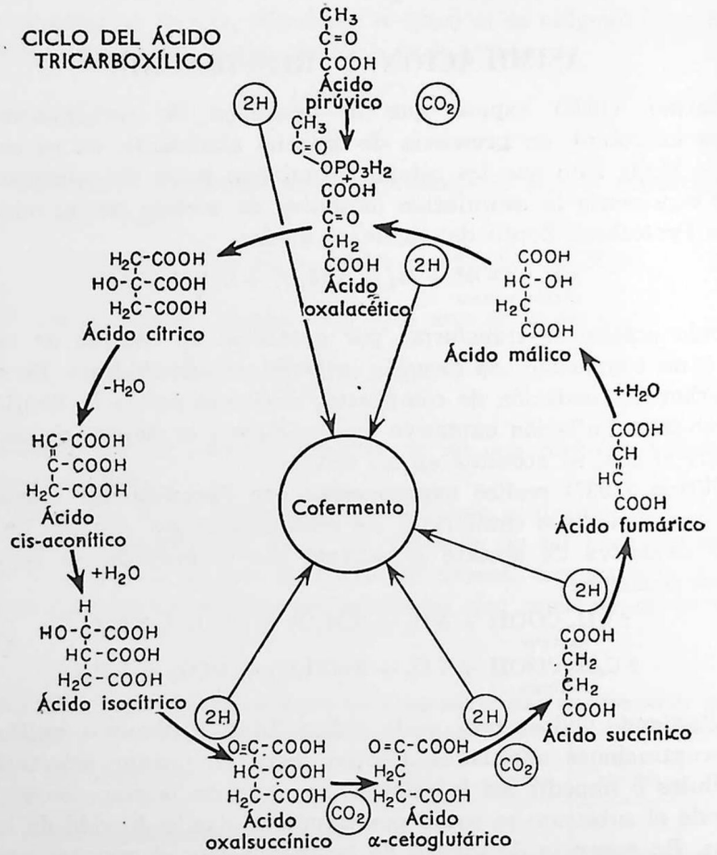


Fig. 147. — Ciclo del ácido tricarboxílico de Krebs. (Según Kuyver.)

El ciclo de ácido tricarboxílico es el único mecanismo que ha sido objeto de amplia consideración, porque explica las reacciones terminales comprendidas en la oxidación biológica que proporciona dióxido de carbono y agua,

y se supone que los datos adversos al desarrollo de este ciclo en algunas células deben descartarse por su escasa o nula importancia. El hecho es que, aunque el ciclo está bien establecido en tejidos animales, en lo que atañe a las bacterias continúa sometido a amplias investigaciones y no pocas controversias.

La figura 147 es un dibujo esquemático del ciclo, según Krebs.

Lo demostrado hasta ahora indica que existe en ciertas bacterias un mecanismo cíclico para la oxidación de piruvatos y acetatos, pero no en todas, lo cual no quiere decir que no haya enzimas en las células intactas. Se han citado ejemplos de aislamiento de algunas enzimas que atacan esos ácidos, a partir de bacterias trituradas.

Véase más información en Delwiche y Carson (1953), Johson y Cohn (1952), Kluyver (1952), Stone y Wilson (1952*a*, *b*, *c*).

CROMOGÉNESIS

Muchas bacterias producen compuestos colorados no fotosintéticos, conocidos por pigmentos. Esto ocurre sobre todo con bacterias aerobias estrictas, y los colores resultantes son numerosos, entre el rojo y el violeta.

En cuanto a la composición química de los pigmentos, se sabe muy poco, en particular por ser difícil obtener pigmento suficiente de gran pureza. Algunos pigmentos permanecen confinados en el interior de las células bacterianas; otros son segregados en el medio circundante, y le comunican un aspecto característico. Sólo unos pocos son hidrosolubles; los demás se disuelven en solventes de grasas, como alcohol, acetona, éter y cloroformo.

Condiciones necesarias para la producción de pigmentos. Es probable que se originen pigmentos únicamente en presencia de oxígeno. Cuando se ponen cultivos pigmentados en un ambiente anaeróbico, el color se desvanece gradualmente, hasta desaparecer. Al exponerse tales cultivos a la acción del oxígeno, la coloración reaparece poco a poco. Se necesitan ciertos medios especiales para producir mucho pigmento; los medios sólidos son mejores que los líquidos, y en ciertos casos hacen falta determinadas sales inorgánicas. La concentración de hidrogeniones del medio influye en el color de algunos pigmentos, y la temperatura más propicia parece ser la de 20° C; al aumentar la temperatura, la producción de pigmento disminuye paulatinamente.

Chapman (1943) recomienda emplear agar-leche evaporado al 10 % para demostrar la producción de pigmentos por especies de *Micrococcus*. Mayer (1944 *a*, *b*) informa que una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* formaba un pigmento amarillo brillante al desarrollarse en presencia de ácido *p*-aminobenzoico (PAB), por la acción de una enzima que parecía ser una oxidasa específica.

Burton, Eagles y Campbell (1947) han comprobado que un medio compuesto de hidrolizado de caseína, glicerina y una mezcla de sales, e inoculado con *Pseudomonas aeruginosa*, daba un excelente rendimiento en piocianina, pigmento verde. Sin embargo, se ha demostrado que para la producción de piocianina por cinco cepas representativas de *P. aeruginosa*, el más idóneo es un medio específico consistente en 0,4 % de *dl*-alanina o glicina combinado con 0,8 % de *l*-leucina, 1 % de glicerina y una mezcla de sales.

Efecto de la luz. Con pocas excepciones (en particular bacterias fotosintéticas verdes y purpúreas), los pigmentos se obtienen mejor en la obscuridad. Baker (1938) examinó 185 cepas de microbios acidorresistentes y comprobó que 12 de ellas producían su pigmento característico sólo en presencia de luz. No había pigmento alguno cuando los microorganismos se cultivaban en la obscuridad absoluta.

Tipos de pigmentos bacterianos. La mayoría de los pigmentos bacterianos se clasifican como carotenoides, antocianinas y melaninas.

Carotenoides. Los carotenoides son pigmentos rojos, anaranjados o amarillos, solubles en disolventes de grasas, como alcohol, éter o cloroformo. Toman su nombre del caroteno, $C_{40}H_{56}$, hidrocarburo no saturado, que es la materia colorante de la manteca, la yema de huevo, la harina y la zanahoria. El caroteno oxidado, $C_{40}H_{56}O_2$ se conoce por xantofila. Ambos pigmentos suelen encontrarse juntos en estado natural.

Entre los microorganismos productores de pigmentos carotenoides se cuentan los siguientes:

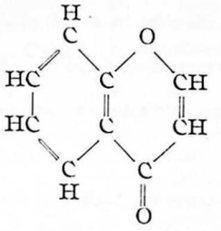
1. *Sarcina lutea*, que produce bacterioxantofila.
2. *S. aurantiaca*, que muestra la presencia de β-caroteno y zeaxantina.
3. *Micrococus pyogenes* var. *aureus*, que da zeaxantina.
4. *Mycobacterium phlei*, que proporciona luteína, criptoxantina y carotenos α, β y γ.
5. *Torula rubra*, levadura roja, productora de β-caroteno y toruleno.

Wheeler y Foley (1942), por análisis espectrofotométrico, informaron de la presencia de pigmentos carotenoides en estreptococos hemolíticos. Sobin y Stahly (1942) extrajeron pigmentos de 12 cepas de *M. pyogenes* var. *aureus*, y comprobaron que en todas ellas había γ-caroteno y rubixantina. Haas y Bushnell (1944) aislaron una cepa de *Mycobacterium lacticola* del fango, en contacto con aceite mineral crudo, y observaron que producía pigmentos carotenoides en un medio de sales inorgánicas con aceite de parafina.

Turian (1950) informa que con hierro o manganeso agregado a un medio aumenta la producción de pigmentos carotenoides por obra del *M. phlei*.

Antocianinas. Las antocianinas comprenden los pigmentos rojos y azules y matices intermedios contenidos en los pétalos de numerosas

flores y de algunas bacterias. Son solubles en agua y en alcohol, pero no en éter. La mayoría de ellos, si no todos, son indicadores naturales, que hacen virar el color de rojo en soluciones ácidas a verde en las alcalinas. Son glucósidos, y por hidrólisis dan un azúcar y algún derivado de la benzopirona:



Benzopirona (cromona)

Entre los principales derivados descuellan la pelargonidina, la cianidina, la delfinidina y la enidina.

Se ha informado que algunas especies de *Actinomyces* son capaces de producir antocianinas.

Melaninas. Las melaninas comprenden ciertos pigmentos pardos, negros, anaranjados y rojos insolubles en casi todos los solventes. Los disuelve el ácido sulfúrico concentrado, y reprecipitan al añadir agua. Los pigmentos se forman por descomposición de proteínas al hervir ácidos minerales concentrados, o por la acción de la enzima tirosinasa sobre el aminoácido tirosina; la enzima ataca además a otros compuestos, entre ellos al triptófano.

Producen melaninas los siguientes microorganismos:

1. *Azotobacter chrococcum*, que forma una melanina negra.
2. *Clostridium perfringens*, que elabora, al parecer, un pigmento negro.
3. *Aspergillus niger*, productor de un pigmento negro de melanina, conocido por aspergilina.
4. Muchas especies de *Actinomices*, que dan diversos pigmentos colorados de melanina.

Función de los pigmentos. Se sabe muy poco de las funciones fisiológicas de los pigmentos no fotosintéticos. Como los pigmentos se forman generalmente en presencia de oxígeno, hay quien supone que actúan de vehículos respiratorios. Sin embargo, por ahora no se dispone de datos suficientes para mantener tal hipótesis.

Más información sobre pigmentos se encontrará en Bancroft (1943), Conn (1943), Crowe y Walker (1949) y Weiss (1949).

REFERENCIAS

Ajl, S. J.: Terminal respiratory patterns in microorganisms, *Bact. Rev.*, **15**: 211, 1951.

— y C. H. Werkman: Replacement of CO_2 in heterotrophic metabolism, *Arch. Biochem.*, **19**: 483, 1948*a*.

— y —: Enzymatic fixation of carbon dioxide in α-ketoglutaric acid, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **34**: 491, 1948*b*.

— y —: Anaerobic replacement of carbon dioxide, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**: 522, 1949*a*.

— y —: On the mechanism of carbon dioxide replacement in heterotrophic metabolism, *J. Bact.*, **57**: 579, 1949*b*.

—, A. G. C. White, y C. H. Werkman: Replacement of carbon dioxide in heterotrophic metabolism, *ibid.*, **54**: 23. 1947.

Allen, M. B., y C. B. van Niel: Experiments on bacterial denitrification, *J. Bact.*, **64**: 397, 1952.

Anderson, R. E.: The growth requirements of luminous bacteria at various temperatures, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **32**: 97, 1948.

Aussen, B. S., T. Y. K. Boltjes, y B. S. J. Wöstmann: Some fundamental remarks on the polarographic determination of the catalase activity and the H_2O_2 production of bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **16**: 65, 1950.

Avery, O. T., y H. J. Morgan: Studies on bacterial nutrition. V. The effect of plant tissue upon the growth of anaerobic bacilli, *J. Exp. Med.*, **39**: 289, 1924.

— y J. M. Neill: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. II. The production of peroxide by sterile extracts of pneumococcus, *ibid.*, **39**: 357, 1924*a*; III. Reduction of methylene blue by sterile extracts of pneumococcus, *ibid.*, **39**: 543, 1924*b*.

Baars, J. K.: «Over Sulfaatheductie Door Bakterien», traducción inglesa disertación, Delft, 1930.

Baker, J. A.: Light as a factor in the production of pigment by certain bacteria, *J. Bact.*, **35**: 625, 1938.

Baldwin, E.: «Dynamic Aspects of Biochemistry», Nueva York, The Macmillan Company, 1952.

Bancroft, W. D.: The biochemistry of anthocyanins, *Science*, **98**: 98, 1943.

Barker, H. A.: The oxidative metabolism of the colorless alga, *Prototheca zopfii*, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **8**: 231, 1936.

— y S. R. Elsden: Carbon dioxide utilization in the formation of glycine and acetic acid, *J. Biol. Chem.*, **167**: 619, 1947.

— y M. D. Kamen: Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **31**: 219, 1945.

— —, y V. Haas: Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic and butyric acids by *Butyribacterium rettgeri*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **31**: 355, 1945.

Baumann, C. A. y F. J. Stare: Coenzymes, *Physiol. Rev.*, **19**: 353, 1939.

Behm, R. C. y J. M. Nelson: The activity of tyrosinase toward phenol, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**: 709, 1944*a*.

— y —, The aerobic oxidation of phenol by means of tyrosinase, *ibid.*, **66**: 711, 1944*b*.

Beijerinck, M. W.: Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulfatreduktion, *Centr. Bakt*, II, **1**: 1, 1895.

Brever, J. H.: A new Petri dish cover and tecnique for use in the cultivation of anaerobes and microaerophiles, *Science*, **95**: 587, 1942.

Broh-Kahn, R. H., y I. A. Mirsky: Studies on anaerobiosis. I. The nature of the inhibition of growth of cyanide-treated *E. coli* reversible oxidation-reduction systems, *J. Bact.*, **35**: 455, 1938.

Bromfield, S. M.: Sulphate reduction in partially sterilized soil exposed to air, *J. Gen. Microbiol*, **8**: 378, 1953.

Brown, J. H., y J. H. Brewer: A method for utilizing illuminating gas in the Brown, Fildes, and McIntosh or other anaerobe jars of the Laidlaw principle, *J. Lab. Clin. Med.*, **23**: 870, 1938.

Burris, R. H., y H. N. Little: Oxidases, peroxidases and catalase. From, «Respiratory Enzymes», ed. por Henry A. Lardy, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1949.

— y P. W. Wilson: Oxidation and asimilation of glucose by the root nodule bacteria, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **19**: 361, 1942.

Burton, M. O., B. A. Eagles, y J. J. R. Campbell: The amino acid requirements for pyocyanin production, *Can. J. Research*, C. **25**: 121, 1947.

Butlin, K. R., M. E. Adams, y M. Thomas: The isolation and cultivation of sulfate-reducing bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **3**: 46, 1949.

Cahn-Bronner, C. E.: Oxygen requirement of pathogenic bacteria under starving conditions, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**: 454, 1940.

Chaix, P., y G. Roncoli: A propos de la variabilité du système des cytochromes chez certains microorganismes, *Biochim. et Biophys. Acta*, **6**: 268, 1950.

Chapman, G. H.: Determination of the chromogenic property of staphylococci, *J. Bact.*, **45**: 405, 1943.

Clark, F. E., y N. R. Smith: Cultural requirements for the production of black pigments by bacili, *J. Bact.*, **37**: 277, 1939.

Clarck, W. M., B. Cohen, M. X. Sullivan, H. D. Gibbs, y R. K. Cannan: Studies on oxidation-reduction. I. Introduction, *Pub. Health, Reports*, **38**: 443, 1923.

Clifton, C. E.: On the possibility of preventing assimilation in respiring cells, *Enzymologia*, **4**: 246, 1937.

—: Oxidative assimilation by various microorganisms, *Antonie van Leeuwenhoek*, **12**: 186, 1947.

— y W. A. Logan: On the relation between assimilation and respiration in suspensions and in cultures of *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **37**: 523, 1939.

Cohen, B.: The measurement of pH, titratable acidity, and oxidation-reduction potentials. De «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Génove, N. Y., Biotech Publications, 1949.

Conn, J. E.: The pigment production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceus-ruber*, *J. Bact.*, **46**: 133, 1943

Crowe, M. O'L., y A. Walker: Pterin-like pigment derived from the tubercle bacillus. Fluorescence and absorption spectral data for erythropterin-like pigment isolated by ultramatographic analysis, *Science*, **110**: 166, 1949.

Delwiche, E. A., y S. F. Carson: A citric acid cycle in *Propionibacterium pentosaceum*, *J. Bact.*, **65**: 318, 1953.

Elliott, K. A. C.: Biological oxidations and reductions, *An. Rev. Bio.*, **15**: 1, 1946.

Elvehjem, C. A.: Historical introduction. De «Respiratory Enzymes», ed. por Henry A. Lardy, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1949.

Evans, J. M., P. R. Carlquist, y J. H. Brewer: A modification of the Brewer anaerobic jar, *J. Clin. Path.*, **18**: 745, 1948.

Farghaly, A.-H.: Factors influencing the growth and light production of luminous bacteria, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **36**: 165, 1950.

Fildes, P.: «A System of Bacteriology», vol. 9, Londres, Medical Research Council, 1931.

Foster, J. W., S. F. Carson, S. Ruben, y M. D. Kamen: Radioactive carbon as an indicator of carbon dioxide utilization. VII. The assimilation of carbon dioxide by molds, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **27**: 590, 1941.

Fujita, A., y T. Kodama: Untersuchungen über Atmung und Gärung pathogener Bakterien. III. Über Cytochrom und das sauerstoffübertragende Ferment, sowie die Atmungshemmung der patogenen Bakterien durch CO und HCN, *Biochem, Z.*, **273**: 186, 1934.

Gerhardt, P., y J. B. Wilson: Attempts to replace the added carbon dioxide required by some strains of *Brucella abortus*, *J. Bact.*, **59**: 311, 1950.

Giesberger, G.: Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* Ehbg., Disertación, Utrecht, 1936 (cit. de Clifton, 1939).

Gould, B. S.: The nature of animal plant tyrosinase. The oxidation of mono- and dihydric phenols as a function of temperature, *Enzymologia*, **7**: 292, 1939.

Griffin, P. J., S. F. Snieszko, y S. B. Friddle: Pigment formation by *Bacterium salmonicida*, *J. Bact.*, **65**: 652, 1953.

Guggenheim, K.: The effect of various chemical and physical agents on the

dehydrogenating enzymes of *Eberthella typhosa*, *Biochem. J.*, 39: 419, 1945.
Haas, E., y L. D. Bushnell: The production of carotenoid pigments from mineral oil by bacteria, *J. Bact.*, 48: 219, 1944.
Harvey, E. N.: Introductory remarks: A general survey of bioluminescence, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 49: 329, 1948.
—: Luminescent organisms, *Am. Scientist*, 40: 468, 1952.
Hewitt, L. F.: «Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry», Edinburgh, E., y S. Livingstone, Ltd., 1950.
Hopkins, F. G.: On an autoxidizable constituent of the cell, *Biochem. J.*, 15: 286, 1921.
—: On glutathione: a reinvestigation, *J. Biol. Chem.*, 84: 269, 1929.
— y E. J. Morgan: Some relations between ascorbic acid and glutathione, *Biochem. J.*, 30: 1446, 1936.
Huntington, E. y C.-E. A. Winslow: Cell size and metabolic activity at various phases of the bacterial culture cycle, *J. Bact.*, 33: 123, 1937.
Isaacs, A. y J. M. Scouller: Catalase production by gram-positive cocci: A simple test for differentiating enterococci from micrococci, *J. Path. Bact.*, 60: 135, 1948.
Johnson, B. C. y E. M. Cohn: Effect of certain acids of the tricarboxylic acid cycle on the growth of *Escherichia coli*, *J. Bact.*, 63: 735, 1952.
Johnson, F. H. y D. H. Gray: Nuclei and large bodies of luminous bacteria in relation to salt concentration, osmotic pressure, temperature, and urethane, *J. Bact.*, 58: 675, 1949.
Joslyn, M. A. y J. Miller: *Effect* of sugars on oxidation of ascorbic acid. 1. Kinetics of auto-oxidation of ascorbic acid, *Food Research*, 14: 325, 1949.
Keilin, D.: On cytochrome, a respiratory pigment common to animals, yeast, and higher plants, *Proc. Roy. Soc. (London), Series B*, 98: 312, 1925.
—: Cytochrome and intracellular respiratory enzymes, *Ergeb. Enzymforsch.*, 2: 239, 1933.
— y E. F. Hartree: Cytochrome oxidase, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Series B, 125: 171, 1938.
— y —: Properties of azidecatalase, *Biochem. J.*, 39: 148, 1945.
Kluyver, A. J.: Microbial metabolism and its industrial implications, *Chemistry & Industry*, pág. 136, 1952.
Krampitz, L. O., H. G. Wood y C. H. Werkman: Enzymatic fixation of carbon dioxide in oxalacetate, *J. Biol. Chem.*, 147: 243, 1943.
Krebs, H. A.: The citric acid cycle, *Biochem. J.*, 34: 460, 1940.
Kreezer, G. L. y E. H. Kreezer: The form of the light-response of luminous bacteria to a sudden increase in temperature and its analysis as a transient, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 30: 173, 1947.
LePage, G. A.: Coenzymes and activators. De «Respiratory Enzymes», ed. por H. A. Lardy, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1949.
Linossier, M. G.: Contribution à l'étude des ferments oxydants sur la peroxydase du pus, *Compt. rend. Soc. Biol.*, 50: 373, 1898.
Lipmann, F.: On chemistry and function of coenzyme A, *Bact. Rev.*, 17: 1, 1953.
Lynch, V. H. y M. Calvin: Carbon dioxide fixation by microorganisms, *J. Bact.*, 63: 525, 1952.
McClung, L. S.: The study of obligately anaerobic bacteria. De «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Geneva, N. Y., Biotech Publications, 1943.
McElroy, W. D.: Phosphate bond energy and bioluminescence, *Phosphorus Metabolism*, 1: 585, 1951.
— y J. Coulombre: The immobilization of adenosine triphosphate in the bioluminescent reaction, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 39: 475, 1952.
— y A.-H. Farghaly: Biochemical mutants affecting the growth and light production in luminous bacteria, *Arch. Biochem.*, 17: 379, 1948.
— y B. L. Strehler: Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphospate, *ibid.*, 22: 420, 1949.
McLean, D. J., N. H. Robinson y E. F. Purdie: The influence of the metabolic

state and of the medium on carbon dioxide fixation by *Serratia marcescens*, *J. Bact.*, 61: 617, 1951.
McLeod, J. W.: Bacterial oxidations and reductions. De «The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology», ed. por E. O. Jordan y I. S. Falk, Chicago, University of Chicago Press, 1928.
— y J. Gordon: Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: With a scheme of classification based on these properties, *J. Path. Bact.*, 26: 326, 1923*a*.
— y —: The problem of intolerance of oxygen by anaerobic bacteria, *ibid.*, 26: 332, 1923*b*.
MacMunn, C. A.: Researches on myohaematin and the histohaematins, *Trans. Roy. Soc. (London)*, 177: 267, 1886.
McShan, W. H.: Dehydrogenases. De «Respiratory Enzymes», ed. por Henry A. Lardy, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1949.
Mayer, R. L.: The influence of sulfanilamide upon the yellow pigment formed by *Mycobacterium tuberculosis* from *p*-aminobenzoic acid, *J. Bact.*, 48: 93, 1944*a*.
—: A yellow pigment formed from *p*-aminobenzoic acid by *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, *ibid.*, 48: 337, 1944*b*.
Miller, H., A.-H. Farghaly y W. D. McElroy: Factors influencing the recovery of biochemical mutants in luminous bacteria, *J. Bact.*, 57: 595, 1949.
Miller, J. y M. A. Joslyn: Effect of sugars on oxidation of ascorbic acid. II. General and specific effects. *Food Research*, 14: 340, 1949*a*; III; Influence of pH and type of buffer, *ibid.*, 14: 354, 1949*b*.
Miller, T. E. y R. W. Stone: Occurrence of glutathione in microorganisms, *J. Bact.*, 36: 248, 1938.
Morton, H. E.: An improved technic for growing microorganisms under anaerobic conditions, *J. Bact.*, 46: 373, 1943.
Pickett, M. J. y C. E. Clifton: On the relation between the oxidation and assimilation of simple substrates by yeast, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 21: 77, 1943.
Postgate, J. R.: On the nutrition of *Desulphovibrio desulphuricans*, *J. Gen. Microbiol.*, 5: 714, 1951*a*.
—: The reduction of sulfur compounds by *Desulphovibrio desulphuricans*, *ibid.*, 5: 725, 1951*b*.
—: Competitive and non-competitive inhibitors of bacterial sulfate reduction, *ibid.*, 6: 128, 1952.
Potter, T. S.: The death of tubercle bacilli subjected to oxygen deprivation in the presence of moisture and of warmth, *J. Infectious Diseases*, 71: 220, 1942.
Potter, V. R.: Cytochrome systems. De «Respiratory Enzymes», ed. por Henry A. Lardy, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1949.
Powers, W. H. y C. R. Dawson: On the inaction of ascorbic acid oxidase, *J. Gen. Physiol.*, 27: 181, 1944.
—, S. Lewis y C. R. Dawson: The preparation and properties of highly purified ascorbic acid oxidase, *ibid.*, 27: 167, 1944.
Quastel, J. H. y M. Stephenson: Experiments on «strict» anaerobes. 1. The relation of *B. sporogenes* to oxygen, *Biochem. J.*, 20: 1125, 1926.
Rahn, O.: Notes on the CO_2 requirement of bacteria, *Growth*, 5: 113, 1941.
— y G. L. Richardson: Oxygen demand and oxygen supply, *J. Bact.*, 41: 225, 1940.
Reed, G. B. y J. H. Orr: Cultivation of anaerobes and oxidation-reduction potentials, *J. Bact.*, 45: 309, 1943.
Sacks, L. E. y H. A. Barker: The influence of oxygen on nitrate and nitrite reduction, *J. Bact.*, 58: 11, 1949.
— y —: Substrate oxidation and nitrous oxide utilization in denitrification, *ibid.*, 64: 247, 1952.
Skinner, C. E.: The «tyrosinase reaction» of the actinomycetes, *J. Bact.*, 35: 415, 1938.
Slade, H. D., H. G. Wood, A. O. Nier, A. Hemingway y C. H. Werkman: Assimilation of heavy carbon dioxide by heterotrophic bacteria, *J. Biol. Chem.*, 143: 133, 1942.
Sobin, B. y G. L. Stahly: The isolation and adsorption spectrum maxima of bacterial carotenoid pigments, *J. Bact.*, 44: 265, 1942.

Soule, M. H.: Gas metabolism of bacteria. De «The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology», ed. por E. O. Jordan y I. S. Falk, Chicago, University of Chicago Press, 1928.
Stadtman, T. C. y H. A. Barker: Studies on the methane fermentation. VII. Tracer experiments on the mechanism of methane formation, *Arch. Biochem.*, **21**: 256, 1949.
Starkey R. L.: Characteristics and cultivation of sulfate-reducing bacteria, *J. Am. Walter Works Assoc.*, **40**: 1291, 1948.
Stephenson, M.: «Bacterial Metabolism», Nueva York, Longmans, Green & Co., Inc., 1949.
Stickland, L. H.: Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*). III. The oxidation of alanine by *Cl. sporogenes*, *Biochem. J.*, **29**: 889, 1935.
Stier, T. J. B. y I. Newton: Changes in the rate of respiration of bakers' yeast during assimilation, *J. Cellular Camp. Physiol.*, **13**: 345, 1939.
— —, y H. Sprince: Relation between the increase in opacity of yeast suspensions during glucose metabolism and assimilation, *Science*, **89**: 85, 1939.
Stone, R. W. y P. W. Wilson: Respiratory activity of cell-free extracts from *Azotobacter*, *J. Bact.*, **63**: 605, 1952.
— y —: The effect of oxalacetate on the oxidation of succinate by *Azotobacter* extracts, *ibid.*, **63**: 619, 1952.
— y —: The incorporation of acetate in acids of the citric acid cycle by *Azotobacter* extracts, *J. Biol. Chem.*, **196**: 221, 1952.
Sumner, J. B. y G. F. Somers: «Chemistry and Methods of Enzymes», Nueva York, Academic Press, Inc., 1952.
Tauber, H., I. S. Kleiner y D. Mishkind: Ascorbic acid (vitamin C) oxidase, *J. Biol. Chem.*, **110**: 211, 1935.
Tenenbaum, L. E. y H. Jensen: Catecholase (tyrosinase): Reversible inactivation and reactivation, *J. Biol. Chem.*, **147**: 27, 1943.
Thunberg, T.: «Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden», Lfg. 414, Abt. 4, Tl. 1, Heft 7, 1929.
Thurlow, Silva: Studies on xanthine oxidase. IV. Relation of xanthine oxidase and similar oxidizing systems to Bach's oxygenase, *Biochem. J.*, **19**: 175, 1925.
Turian, G.: I. Exaltation de la pigmentation par le fer et par le manganèse, *Helv. Chim. Acta*, **33**: 13, 1950.
Van Delden, A.: Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduktion durch Bakterien, *Centr. Bakt*, II, **11**: 81 y 113, 1904.
Van Niel, C. B. y E. H. Anderson: On the occurrence of fermentative assimilation, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **17**: 49, 1941.
—, S. Ruben, S. F. Carson, M. D. Kamen y J. W. Foster: Radioactive carbon as an indicator of carbon dioxide utilization. VIII. The role of carbon dioxide in cellular metabolism, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **28**: 8, 1942.
Verhoeven, W.: Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria, Delft, Holanda, Uigeverij Waltman, 1952.
Waksman, S. A.: «Soil Microbiology», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1952.
Weiss, C. M.: Spectrophotometric and chromatographic analyses of the pigment produced by members of the genus *Serratia*, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **34**: 467, 1949.
Wheeler, S. M. y G. E. Foley: Pigment observed in cultures of hemolytic streptococci belonging to Lancefield group A, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **49**: 421, 1942.
Wieland, H.: Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge, *Ergeb. Physiol.*, **20**: 477, 1922.
—: «On the Mechanism of Oxidation», New Haven, Yale University Press, 1932.
Wilson, A. T.: A simple device for the growth of anaerobic organisms in liquid media, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **75**: 515, 1950.
Winzler, R. J. y J. P. Baumberger: The degradation of energy in the metabolism of yeast cells, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **12**: 183, 1938.
Wood, H. G.: The fixation of carbon dioxide and the interrelationships of the tricarboxylic acid cycle, *Physiol. Rev.*, **26**: 198, 1946.

CAPÍTULO XIV

HIDRÓLISIS Y PUTREFACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas, substancias en extremo complejas, son componentes esenciales de toda célula viva, animal o vegetal. Su nombre proviene del griego πρωτειος, que significa preeminencia o principalidad. Todas las proteínas contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno; y el azufre no falta más que en ciertas proteínas básicas conocidas por protaminas. Las proporciones aproximadas de estos componentes son: C, 51 %; H, 7 %; N, 16 %; O, 25 %, y S, 1 %.

Propiedades generales de proteínas y aminoácidos. Casi todas las proteínas solubles forman soluciones coloidales, lo cual significa que están compuestas de moléculas muy grandes o que las moléculas forman agregados de dimensiones coloidales. Una de las propiedades de los coloides en solución es que no pueden atravesar ciertas membranas, como las de pergamino o colodión, y las animales. La mayoría de las proteínas dan soluciones opalescentes, otro indicio de que son moléculas grandes; por lo general se trata de substancias amorfas, pero se han obtenido algunas en forma cristalina.

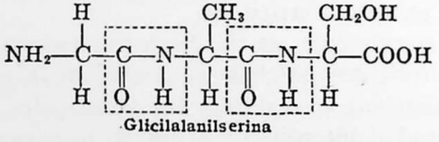
Las substancias coloidales se clasifican en suspensoides y emulsoides. Las suspensoides (coloides liófobos) no muestran la menor afinidad por el medio de dispersión; en cambio, las emulsoides (coloides liófilos) presentan una afinidad intensa por el medio dispersante. Las proteínas forman soluciones de tipo emulsoide; se precipitan de las mismas por medio de sales de metales pesados, como cloruro mercúrico y nitrato argéntico; de ácidos, como el tánico y el fosfotúnstico, y de ciertos colorantes y detergentes. Las proteínas son compuestos anfóteros, capaces de reaccionar con ácidos y con bases para formar sales ionizables.

Otra propiedad de las proteínas es la de descomponerse en una mezcla de α-aminoácidos cuando se tratan con enzimas proteolíticas, o se hierven con ácidos minerales o álcalis fuertes. La hidrólisis ácida, especialmente en presencia de carbohidratos, suele acarrear la destrucción completa del aminoácido triptófano; por hidrólisis alcalina se des-

truyen en parte o del todo los aminoácidos cistina, cisteína y arginina. A veces se mencionan los aminoácidos como sillares o elementos constructivos de la molécula de proteína; al reducirse por hidrólisis o aminoácidos, las proteínas pierden por completo sus caracteres coloidales.

Se han reconocido como componentes de las moléculas de proteínas unos 20 aminoácidos, todos ellos, con excepción de la glicocola, ópticamente activos. Son solubles en agua, salvo la tirosina y la cistina; la tirosina se disuelve un poco en agua fría, pero más en la caliente, y la cistina apenas se disuelve en agua fría o caliente. Todas las proteínas son solubles en ácidos y álcalis diluídos, menos la cistina, que se disuelve con dificultad en amoníaco líquido diluído. Los aminoácidos poseen por lo menos un grupo amino libre (NH_2) y un grupo carboxilo libre (COOH), excepto la prolina y la oxiprolina, que contienen un grupo imino (NH) en vez del grupo amino; tal constitución indica que son cuerpos anfóteros, capaces de reaccionar con ácidos y con bases (pág. 225). Los que contienen un grupo amino y otro carboxilo libres se conocen por ácidos monoamino-monocarboxílicos, y dan reacción neutra; los de dos grupos amino y uno carboxilo se llaman ácidos diamino-monocarboxílicos, con reacción alcalina; y los de un grupo amino y dos carboxilo son ácidos monoamino-dicarboxílicos.

Estructura de la molécula de proteína. Se han expuesto muchas teorías para explicar cómo los aminoácidos se unen entre sí para componer una molécula de proteína. En general se admite que están ligados principalmente por sus grupos α-amino y carboxilo, formando un enlace peptídico (R·CONH·R'); probablemente existen enlaces de otro tipo, pero, por lo que se sabe, el peptídico es el principal. Por ejemplo, si un tripéptido se compone de glicina, alanina y serina, los aminoácidos se unirán, mediante enlace peptídico, del siguiente modo:



La hidrólisis de proteínas por enzimas proteolíticas da origen a las fracciones enumeradas por orden a continuación:

Proteínas → proteosas (albumosas) → peptonas → péptidos → aminoácidos

Más información sobre la estructura de las proteínas se encontrará en Wrinch (1948 *a*, *b*).

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas que deshacen o hidrolizan enlaces peptídicos se agrupan entre las proteasas; éstas se subdividen en proteinasas y peptidasas. Las proteinasas hidrolizan verdaderas proteínas, y producen sobre todo polipéptidos y dipéptidos, así como, algunas veces, pequeñas cantidades de aminoácidos; la peptidasas hidrolizan polipéptidos y dipéptidos hasta la fase de aminoácidos. Esto puede representarse esquemáticamente en la forma expuesta en la figura 148.

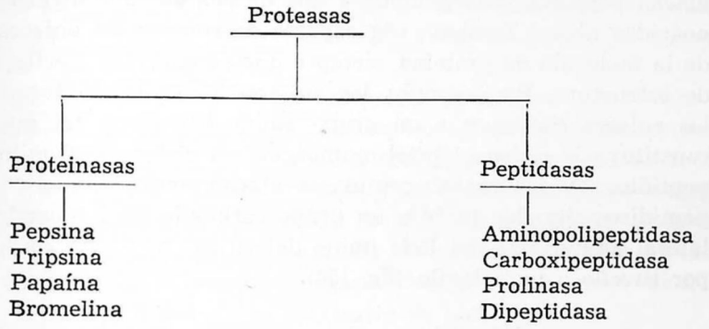


Fig. 148. — Clasificación de algunas proteasas.

Hidrólisis de proteínas. La hidrólisis de proteínas se puede definir como la acción de proteinasas sobre una proteína para disgregar la molécula en substancias difusibles. Se conocen numerosas proteasas, con la propiedad común de romper el enlace —CO—NH— por adición de agua, dejando en libertad un grupo carboxilo, —COOH, y un grupo amino, $—NH_2$.

Probablemente todas las proteinasas son enzimas extracelulares, cuya función es convertir proteínas no difusibles en polipéptidos y dipéptidos difusibles de dos, tres o cuatro aminoácidos, que puede absorber la célula bacteriana. Los compuestos obtenidos se suponen carentes de olor. Las enzimas extracelulares no toman parte en las actividades respiratorias de la célula, que están a cargo de las enzimas intracelulares.

Las proteinasas atacan proteínas y péptidos, en determinadas condiciones. Por ejemplo, la tripsina rompe los enlaces que contienen el grupo básico arginilo o lisilo unido al miembro carbonilo del enlace peptídico. De manera análoga, la pepsina ataca los enlaces que contienen los grupos tirosilo o fenilalanilo ligados al miembro imino de dicho enlace (fig. 149).

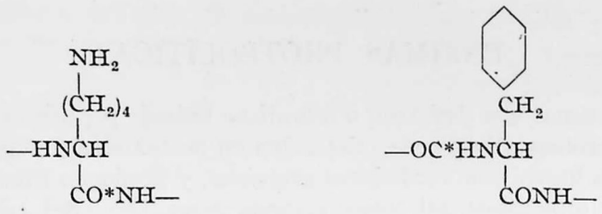


Fig. 149. — Izquierda, estructura necesaria para que actúe la tripsina. Derecha, estructura necesaria para que actúe la pepsina. * denota el enlace peptídico hidrolizado.

Todas las peptidasas son probablemente enzimas intracelulares, y atacan péptidos, reduciéndolos a una mezcla de cuerpos menores y aminoácidos libres. También son capaces de romper los enlaces peptídicos de la molécula de proteína, siempre que se cumplan ciertas condiciones de estructura. Por ejemplo, las aminopolipeptidasas atacan solamente los enlaces contiguos a un grupo amino libre, con tal que el leucilo constituya la cadena lateral aminoácida en el lado carbonilo del enlace peptídico; y las carboxipeptidasas atacan exclusivamente los enlaces peptídicos situados junto a un grupo carboxilo libre, cuando la cadena lateral aminoácida del lado imino del enlace peptídico está constituída por tirosilo o fenilalanilo (fig. 150).

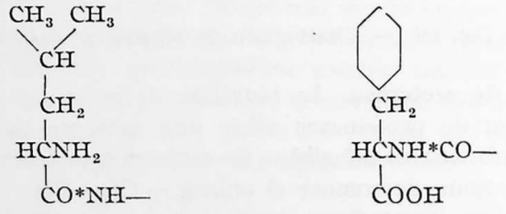


Fig. 150. — Izquierda, estructura necesaria para la acción de aminopolipeptidasas. Derecha, estructura necesaria para la acción de las carboxipeptidasas. * denota el enlace peptídico hidrolizado.

Estos datos son resultado de estudios de las proteasas de origen animal. Como todavía no se ha trabajado de igual modo con proteasas bacterianas, no es posible deducir respecto a ellas conclusiones similares.

Putrefacción. Puede definirse la putrefacción como descomposición anaeróbica de proteínas, productos de su desdoblamiento y compuestos nitrogenados de naturaleza análoga, con formación de cuerpos de olor fétido. Es probable que todas las reacciones se desarrollen en el interior de las células, por medio de las enzimas intracelulares o respiratorias. Las alteraciones putrefactivas son resultados de la acción de microorganismos sobre los distintos aminoácidos. Entre los cuerpos importantes formados figuran: metilmercaptán, sulfuro de hidrógeno, aminas, alcoholes, glicoles, ácidos orgánicos, hidroxiácidos, indol, fenol, cresol, amoníaco, y los gases metano, dióxido de carbono e hidrógeno.

La capacidad de las bacterias para degradar proteínas o sus productos de escisión varía considerablemente. Los microorganismos se califican de putrefactivos o fermentativos, según que su acción sea más potente sobre proteínas o sobre substancias fermentables. Muchos de los productos resultantes de la putrefacción provienen sólo de aminoácidos; otros pueden derivar de más de un ácido.

Disipación. Es la descomposición aeróbica de proteínas, en la que los productos de la putrefacción se oxidan por completo a compuestos estables no hediondos. En la Naturaleza es obra de microorganismos aerobios, en presencia de abundante aire, después de haberse producido los cambios putrefactivos; si el substrato se airea bien desde el primer momento, las reacciones serán aeróbicas, y no se formarán cuerpos malolientes.

Una aplicación práctica de este principio es el aprovechamiento de aguas residuales. En una de sus variantes, las aguas sucias son primero digeridas por los gérmenes anaerobios, con desprendimiento de malos olores; el substrato se airea luego bien, y los microorganismos aerobios digieren entonces los cuerpos fétidos, con lo que desaparece el hedor. Otro procedimiento consiste en mantener las aguas sucias bien aireadas desde el comienzo, para que no se desarrollen gérmenes anaerobios. La digestión aeróbica no ocasiona compuestos de olor repulsivo.

Para más información sobre enzimas proteolíticas, véanse Fruton (1938, 1941), Gale (1940, 1943, 1952), Grob (1946 *a*, *b*), Stephenson (1949), Sumner y Somers (1953).

ACCIÓN DE LAS BACTERIAS SOBRE LAS PROTEÍNAS

Bainbridge (1911) fué quien por primera vez señaló que las proteínas naturales resisten los ataques de bacterias, incluso de la mayoría de las proteolíticas. Empleó un medio inorgánico, al que añadió albúmina de huevo y otras proteínas como únicas fuentes de nitrógeno y carbono, e hizo ensayos con *Escherichia coli, Salmonella typhosa, Proteus vulgaris, Micrococcus pyogenes* var. *aureus, Pseudomonas aeruginosa, S. enteritidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Estos microbios, no sólo no degradaron las proteínas puras, sino que no aumentaron tampoco en número; sin embargo, al agregar al medio una pequeña cantidad de peptona, se reprodujeron los gérmenes, y las proteínas experimentaron degradación.

Más tarde, Sperry y Rettger (1915) confirmaron y ampliaron las observaciones de Bainbridge, utilizando especies aerobias, anaerobias y facultativas en medios no sintéticos y sintéticos. Ninguna de las especies

empleadas fué capaz de degradar las proteínas, que se descompusieron, en cambio, al añadir indicios de peptona.

Estos resultados parecen indicar que para convertir las proteínas no difusibles en compuestos difusibles es necesaria una enzima extracelular. En ausencia de una provisión de nitrógeno y carbono aprovechable, los gérmenes no pueden multiplicarse ni elaborar la enzima o las enzimas necesarias. La adición de peptona proporciona nitrógeno y carbono utilizables, lo cual permite a los microorganismos reproducirse y elaborar las enzimas proteolíticas extracelulares que hacen falta.

Según Berman y Rettger (1916, 1918), las proteosas son igualmente inmunes a los ataques de bacterias. Las proteosas o albumosas son productos intermedios de la digestión de proteínas por enzimas proteolíticas. En este caso también, al añadir un poco de peptona al medio se estimula la segregación bacteriana de enzimas proteolíticas que ataquen las proteosas.

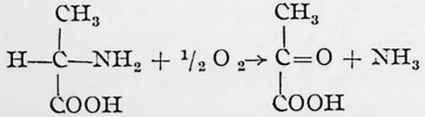
Todo ello indica que las proteínas y sus primeras fracciones, como las proteosas, no constituyen fuentes de nitrógeno y carbono asimilables. Péptidos y aminoácidos parecen ser componentes nutritivos nitrogenados indispensables, lo cual explica que se empleen tanto peptonas comerciales en medios bacteriológicos de cultivo.

ACCIÓN DE LAS BACTERIAS SOBRE LOS AMINOÁCIDOS

Las bacterias pueden actuar sobre los aminoácidos de diversos modos. Son mayoría las que los desaminizan (separando el grupo amino como amoníaco), y el amoníaco se emplea como provisión de nitrógeno; otras los descarboxilan (por separación del grupo carboxilo en forma de dióxido de carbono), y dan origen a aminas. Por lo regular, hay desaminación de bacterias cultivadas en un medio neutro o débilmente alcalino, y descarboxilación en las cultivadas en medio ácido. A continuación estudiaremos estos y otros tipos de reacciones químicas producidas por bacterias sobre los aminoácidos.

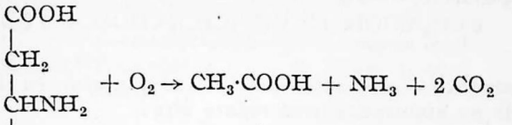
La desaminación sigue varios cursos, según las enzimas presentes en los microorganismos y las condiciones del ambiente.

1. Desaminación oxidativa, con formación de un α-cetoácido:



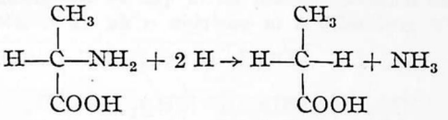
Alanina — Ácido pirúvico

Algunos gérmenes pueden producir una desaminación oxidativa de los ácidos dicarboxílicos, aspártico y glutámico, con formación de los correspondientes α-cetoácidos; otros metabolizan los compuestos para dar ácido acético, amoníaco y dióxido de carbono:



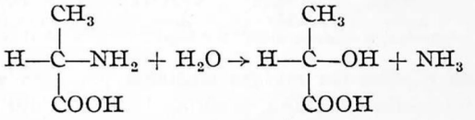
Ácido aspártico — Ácido acético

2. Desaminación reductiva, con formación de un ácido saturado:



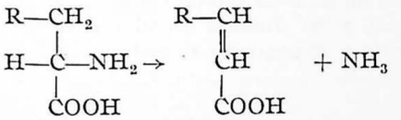
Alanina — Ácido propiónico

3. Desaminación hidrolítica, con formación de un hidroxiácido:



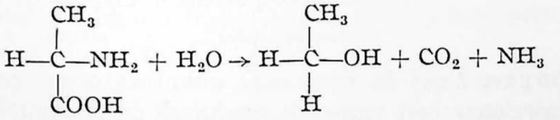
Alanina — Ácido láctico

4. Desaminación y desaturación en el enlace α, β, con formación de un ácido no saturado:



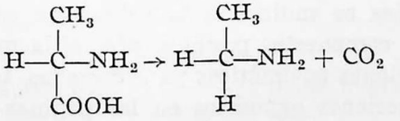
Aminoácido — Ácido no saturado

5. Desaminación hidrolítica y descarboxilación, con formación de un alcohol primario con un átomo de carbono menos:



Alanina — Alcohol etílico

6. Descarboxilación o eliminación de óxido de carbono, con formación de una amina con un átomo de carbono menos:



Alanina — Etilamina

Las descarboxílasas se producen generalmente cultivando bacterias a pH bajo; para ello se ponen en un medio carbohidratado fermentable.

7. Descomposición anaeróbica, con liberación de hidrógeno:

$$5\ COOH\cdot(CH_2)_2\cdot CHNH_2\cdot COOH + 6\ H_2O \rightarrow 6\ CH_3\cdot COOH + 2\ CH_3\cdot(CH_2)_2\cdot COOH + 5\ CO_2 + 5\ NH_3 + H_2$$

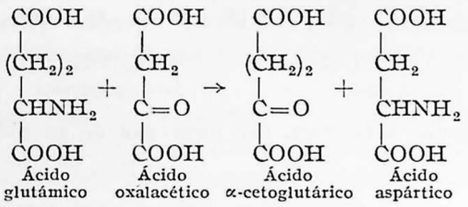
Ácido glutámico — Ácido acético — Ácido butírico

8. Descomposición mediante reacción de mutasa, en la que se oxida una molécula de un aminoácido y se reduce otra:

$$3\ CH_3\cdot CHNH_2\cdot COOH + 2\ H_2O \rightarrow 2\ CH_3\cdot CH_2\cdot COOH + CH_3\cdot COOH + 3\ NH_3 + CO_2$$

Alanina — Ácido propiónico — Ácido acético

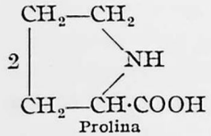
9. Reacción de transaminación, en la que se transfiere un grupo amino de ácido aspártico o glutámico a la posición α de un α-cetoácido:



Ácido glutámico — Ácido oxalacético — Ácido α-cetoglutárico — Ácido aspártico

10. Oxidación y reducción mutuas mediante pares de aminoácidos.

Algunos aminoácidos (alanina, valina, leucina, fenilalanina) pueden oxidarse al actuar como donadores de hidrógeno, y otros (glicina, prolina, hidroxiprolina, ornitina, arginina) se reducen sirviendo de receptores de hidrógeno. Esta reacción es obra de anaerobios cultivados en condiciones anaeróbicas. Si se mezclan un aminoácido de cada grupo, o sea un donador, y un receptor de hidrógeno, y se siembra en el medio un germen anerobio, el ácido primero se oxida y el segundo se reduce:



Prolina

Alanina

$$+ CH_2\cdot CHNH_3\cdot COOH + H_2O \rightarrow 2\ NH_2(CH_2)_4\cdot COOH + CH_3\cdot COOH + NH_3 + CO_2$$

Ácido δ-aminovalérico — Ácido acético

Los anteriores tipos de reacciones químicas, o sus combinaciones, pueden proporcionar casi todos los productos de descomposición y putrefacción que las bacterias originan de los aminoácidos.

En la tabla 25 figuran los nombres y fórmulas de casi todos los aminoácidos presentes en proteínas, y los cuerpos producidos por bacterias; las fórmulas se indican a la cabeza de cada división. No se incluyen todos los compuestos posibles, pero sí la mayoría de los resultantes de las reacciones enzimáticas ya estudiadas. Las cifras se refieren a los tipos de reacciones expuestos en las páginas 402 a 404. Algunos compuestos no van precedidos de número, y esto indica que no se conoce bien el mecanismo de su formación.

Véase más información en Czkalowski y Skarzynski (1948), y Evans (1947).

TABLA 25. — ACCIÓN DE LAS BACTERIAS SOBRE LOS AMINOÁCIDOS

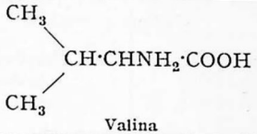
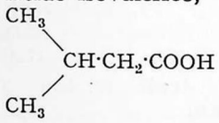
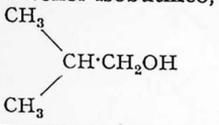
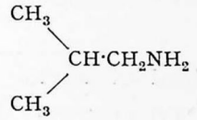
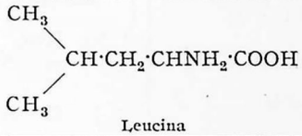
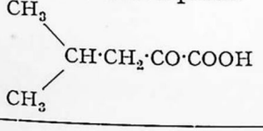
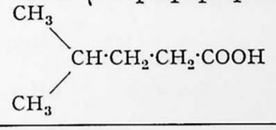
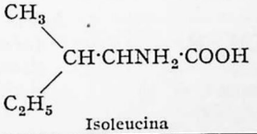
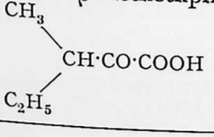
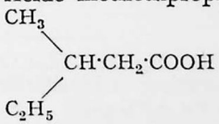
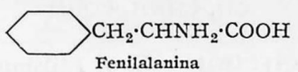
$CH_2NH_2\cdot COOH$ Glicocola o glicina	
1) Ácido glioxílico, $CHO\cdot COOH$ 2) Ácido acético, $CH_3\cdot COOH$	8) Ácido acético $CH_3\cdot COOH + CO_2 + NH_3$ 10) Ácido acético, $CH_3\cdot COOH + NH_3$
$CH_3\cdot CHNH_2\cdot COOH$ Alanina	
1) Ácido pirúvico, $CH_3\cdot CO\cdot COOH$ 2) Ácido propiónico, $CH_3\cdot CH_2\cdot COOH$	6) Etilamina, $CH_3\cdot CH_2NH_2$ 8) Ác. propiónico, $CH_3\cdot CH_2\cdot COOH$ y ácido acético, $CH_3\cdot COOH$
 Valina	
2) Ácido isovalérico,  5) Alcohol isobutílico, 	6) Isobutilamina, 
 Leucina	
1) Ácido cetoisocaproico 	2) Ácido β-isopropilpropiónico 
 Isoleucina	
1) Ácido β-metiletilpirúvico 	2) Ácido metiletilpropiónico 

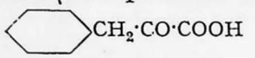
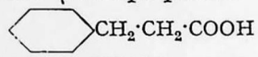
TABLA 25. *(Continuación.)*

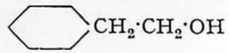
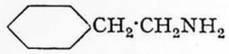
$CH_2OH{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$
Serina

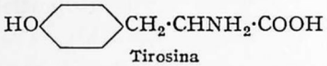
5) Etilenglicol, $CH_2OH{\cdot}CH_2OH$

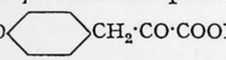
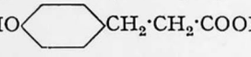
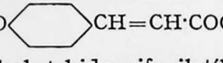
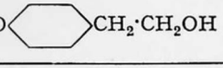
8) Ácido propiónico, $CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$ y ácido acético, $CH_3{\cdot}COOH$

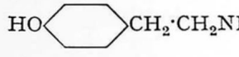
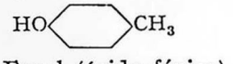
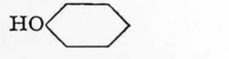

Fenilalanina

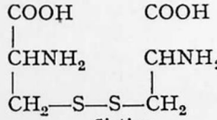
1) Ácido β-fenilpirúvico

2) Ácido β-fenilpropiónico


5) Alcohol feniletílico

6) Feniletilamina,



Tirosina

1) Ácido *p*-hidroxifenilpirúvico

2) Ác. *p*-hidroxi-β-fenilpropiónico,

4) Ácido *p*-hidroxi-β-fenilacrílico

5) Alcohol *p*-hidroxifeniletílico


6) *p*-hidroxi-β-feniletilamina (tiramina)

p-cresol,

Fenol (ácido fénico),



Cistina

Cisteína, $COOH{\cdot}CHNH_2{\cdot}CH_2SH$

Sulfuro de hidrógeno, H_2S

7) Ácido acético, $CH_3{\cdot}COOH$; ácido fórmico, $H{\cdot}COOH$; hidrógeno y dióxido de carbono
Ácido pirúvico, $CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH$, y sulfuro de hidrógeno, H_2S

$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$
Treonina

8) Ác. butírico, $CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$; ácido acético, $CH_3{\cdot}COOH$, y dióxido de carbono

TABLA 25. *(Continuación.)*

$COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$
Ácido aspártico

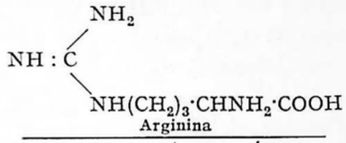
1) Ácido oxalacético, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH$, y ácido acético, $CH_3{\cdot}COOH$
2) Ácido succínico, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$
3) Ácido málico, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHOH{\cdot}COOH$
4) Ácido fumárico, $COOH{\cdot}CH = CH{\cdot}COOH$

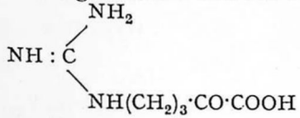
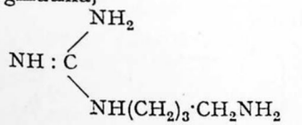
6) β-Alanina, $NH_2CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$
7) Hidrógeno y dióxido de carbono
9) Ácido oxalacético, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH$, y alanina, $CH_3{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$

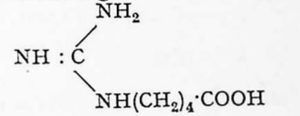
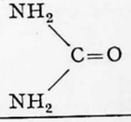
$COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$
Ácido glutámico

1) Ácido α-cetoglutárico, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH$
1) Ácido acético, $CH_3{\cdot}COOH$, y dióxido de carbono
2) Ácido glutárico, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$
5) Ácido γ-hidroxybutírico, $CH_2OH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$

6) Ácido γ-aminobutírico, $NH_2CH_2{\cdot}CH_2CH_2{\cdot}COOH$
7) Ácido butírico $CH_3{\cdot}CH_2CH_2{\cdot}COOH$, ácido acético, $CH_3{\cdot}COOH$, dióxido de carbono e hidrógeno,
9) Ácido α-cetoglutárico, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH$, y ácido aspártico, $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$.


Arginina

1) Ácido δ-guanidin-*a*-cetovalérico,

2) Agmatina,


10) Ácido δ-guanidinvalérico,

Ornitina, $NH_2(CH_2)_3{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$, y urea,


$NH_2(CH_2)_3CHNH_2{\cdot}COOH$
Ornitina

2) Ác. δ-aminovalérico (putridina), $NH_2(CH_2)_4{\cdot}COOH$
5) Alcohol γ-aminobutílico, $NH_2(CH_2)_3CH_2OH$

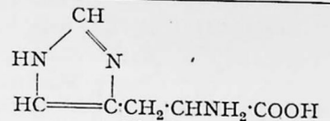
6) Tetrametilendiamina (putrescina), $NH_2(CH_2)_3CH_2NH_2$

$NH_2(CH_2)_4{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH$
Lisina

2) Ácido ε-aminocaproico, $NH_2(CH_2)_5{\cdot}COOH$

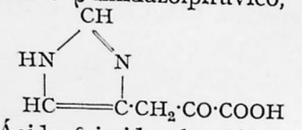
6) Pentametilendiamina (cadaverina), $NH_2(CH_2)_4{\cdot}CH_2NH_2$

TABLA 25. *(Continuación.)*

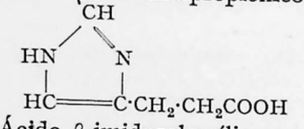


Histidina

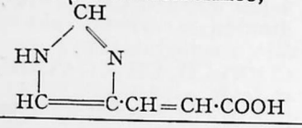
1) Ácido β-imidazolpirúvico,



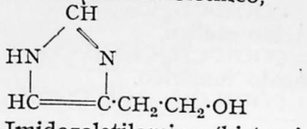
2) Ácido β-imidazolpropiónico



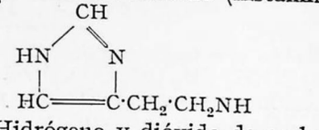
4) Ácido β-imidazolacrílico,



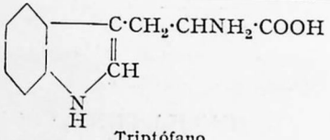
5) Alcohol β-imidazoletílico,



6) β-Imidazoletilamina (histamina),

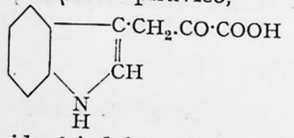


7) Hidrógeno y dióxido de carbono,

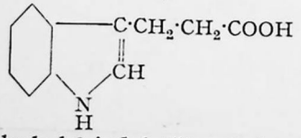


Triptófano

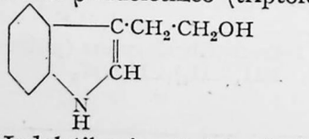
1) Ácido β-indolpirúvico,



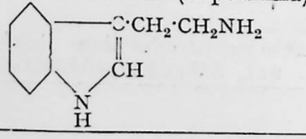
2) Ácido β-indolpropiónico (ácido escatolacético),



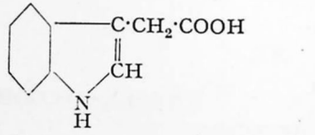
5) Alcohol β-indoletílico (triptofol),



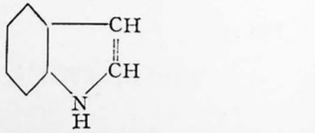
6) β-Indoletilamina (triptamina),



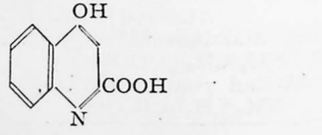
β-Ácido indolacético,



Indol



Ácido cinurénico



Ácido antranílico

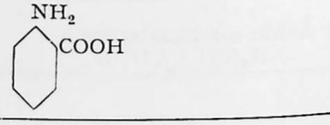
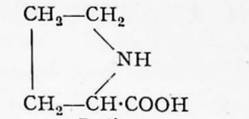


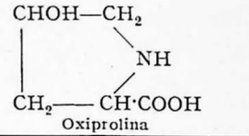
TABLA 25. *(Continuación.)*



Prolina

2) Ácido δ-aminovalérico, $NH_2(CH_2)_4 \cdot COOH$

10) Ácido δ-aminovalérico, $NH_2(CH_2)_4 \cdot COOH$, y dióxido de carbono



Oxiprolina

10) Ácido δ-amino-γ-hidroxivalérico, $NH_2CH_2 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$

TOMAÍNAS

Las tomaínas se pueden definir como aminas y diaminas básicas resultantes de la acción de bacterias putrefactivas sobre aminoácidos y bases orgánicas. Se obtienen de aminoácidos por un proceso de descarboxilación (reacción 7, pág. 404). En la tabla 26 se enumeran las tomaínas formadas por descarboxilación de la mayoría de los aminoácidos; se incluye la base orgánica colina como ejemplo de compuesto nitrogenado no aminoácido.

TABLA 26. — ALGUNAS TOMAÍNAS FORMADAS POR ACCIÓN BACTERIANA

Aminoácido	Tomaína
Glicina (glicocola)	Metilamina
Alanina	Etilamina
Valina	Isobutilamina
Leucina	Isoamilamina
Fenilalanina	β-feniletilamina
Tirosina	*p*-hidroxi-β-feniletilamina (tiramina)
Serina	Hidroxietilamina
Cistina (cisteína)	Tioetilamina
Metionina	γ-metiltiolpropilamina
Treonina.	β-hidroxipropilamina
Arginina.	δ-guanidinbutilamina (agmatina)
Ornitina	Tetrametilendiamina (putrescina)
Lisina	Pentametilendiamina (cadaverina)
Histidina.	β-imidazoletilamina (histamina)
Triptófano	β-indoletilamina (triptamina)
Colina	Trimetilamina

RESERVA O AHORRO DE PROTEÍNAS

Kendall y Walker (1915) descubrieron que la presencia de glucosa escasa en un medio de gelatina inhibía la secreción de una enzima gelatinolítica hasta que todo el carbohidrato quedaba consumido; en cambio, con un exceso de glucosa no aparecía nunca la enzima. Los experimentos de comprobación han descartado la posibilidad de que la glucosa estorbara la acción de la enzima después de segregada ésta. También se desechó la hipótesis de que la enzima no pudiese ejercer su acción por la presencia de una acidez considerable, puesto que la enzima se presentaba después de haber fermentado todo el carbohidrato. Los autores llegan a la conclusión de que los microorganismos prefieren un carbohidrato fermentable a la proteína con fines energéticos, pues los componentes nitrogenados se utilizan sólo como alimento asimilable. Sin un carbohidrato fermentable, las bacterias se ven obligadas a utilizar componentes proteínicos, tanto para reforzar su estructura como para reponer energía.

Berman y Rettger (1918) y otros analizaron las conclusiones de Kendall y su escuela, y comprobaron que gérmenes como el *Bacillus subtilis,* que fermentan glucosa muy despacio, o como el *Aerobacter cloacae,* que no dan productos fuertemente ácidos, parecen desprovistos de la virtud de economizar proteínas, ya que éstas se descomponen como si hubiera carbohidratos. En cambio, microorganismos como la *Escherichia coli* o el *Proteus vulgaris,* que en poco tiempo producen abundante ácido, dejaban de crecer y de actuar químicamente al cabo de un breve período de incubación. Los microbios de este grupo parecen preservar las proteínas en gran escala. En presencia de un exceso de atemperante, tal como una mezcla de fosfatos monobásico y dibásico, no se alcanzó nunca la concentración límite de hidrogeniones, y la descomposición de proteínas fué rápida, tanto con carbohidrato fermentable como sin él. No se observó ahorro de proteínas.

Stephenson y Gale (1937) demostraron que la glucosa no influía en el metabolismo de *E. coli,* una vez que la célula había formado sus enzimas, pero sí sobre la formación de las enzimas durante el crecimiento. El efecto inhibitorio no se modificó haciendo burbujear oxígeno a través de los cultivos, lo cual indica que no obedece a las condiciones anaeróbicas provocadas por los gases de fermentación. De manera análoga, la regulación del pH del medio durante el desarrollo, agregando carbonato cálcico, no produce efecto sobre la actividad inhibitoria.

En conclusión, puede decirse que la presencia de un carbohidrato fermentable reduce el consumo de proteínas sólo cuando se utiliza rápidamente al acumularse una cantidad relativamente grande de ácido en poco tiempo. El carbohidrato inhibe la elaboración de proteasas,

pero no puede concretarse si esto se debe a la producción de ácido o a la inhibición de la de enzimas proteolíticas. Tomando medidas para neutralizar la acidez, por adición de compensador suficiente al medio, se impide el efecto inhibitorio del carbohidrato.

ALGUNAS REACCIONES FISIOLÓGICAS CORRIENTES PARA IDENTIFICAR BACTERIAS

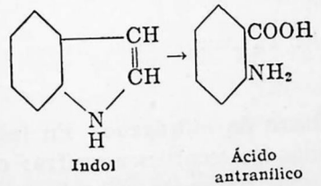
Se emplean numerosas reacciones bioquímicas para identificar y clasificar bacterias. Algunas se basan en la descomposición de carbohidratos, y otras dependen de ciertos cambios en los componentes nitrogenados del medio.

Descomposición de triptófano. El triptófano se desdobla de diversos modos por obra de microorganismos, y se convierte en ácido β-indolpropiónico, ácido β-indolpirúvico, β-indoletilamina, alcohol β-indoletílico, ácido β-indolacético, indol, ácido cinurénico, ácido antranílico e indigotina.

Indol. El indol es un compuesto resultante de la putrefacción del triptófano por algunas bacterias, y con frecuencia se realizan ensayos para descubrir su presencia (pág. 408). El triptófano es el único aminoácido natural que contiene el anillo de indol, por lo que la prueba es también específica en cuanto a la presencia de aquél. Como las bacterias se pueden dividir en dos grupos a base de la presencia o ausencia de indol, la prueba es útil para identificarlas y clasificarlas.

No todas las proteínas contienen triptófano. Los fabricantes de peptona eligen sólo aquellas en que la proporción de este aminoácido es elevada. La caseína, proteína principal de la leche, se usa a menudo por ello para preparar peptona cuando interesa una fuerte reacción de indol.

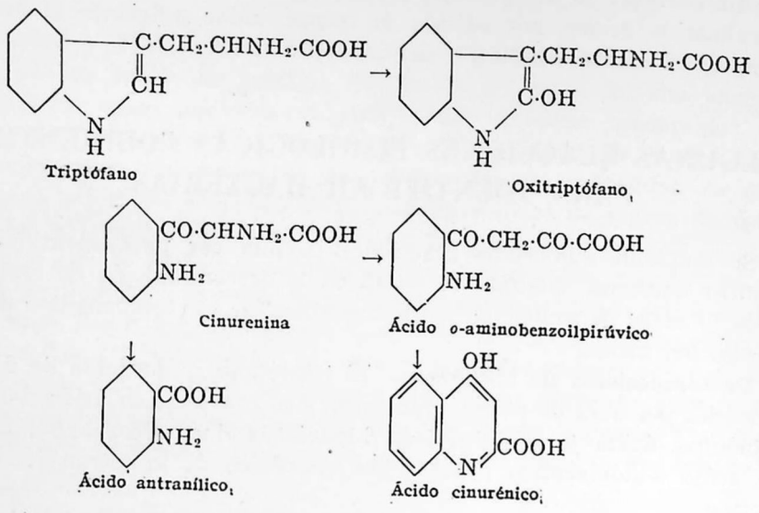
Existen datos demostrativos de que algunos microorganismos pueden oxidar el anillo de indol. Supniewski (1924) hizo notar que la *Pseudomonas aeruginosa* transforma por oxidación el indol en ácido antranílico; y Sasaki (1923) comprobó que el *Bacillus subtilis* no sólo produce indol del triptófano, sino que lo oxida y convierte en ácido antranílico:



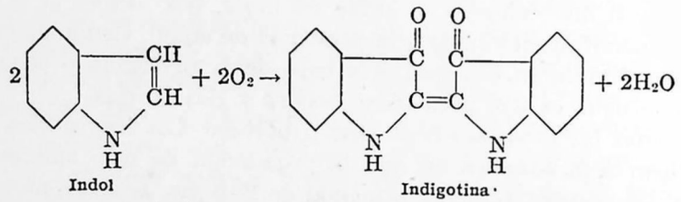
Indol — Ácido antranílico

Según Kotake (1933), el *B. subtilis* era también capaz de producir ácido cinurénico y ácido antranílico a partir de triptófano, en presencia

de glicerina y fosfato de aluminio, y proponía el siguiente esquema de formación:



En 1928, Gray aisló del suelo el germen *Pseudomonas indoloxidans*, que por oxidación transforma indol en indigotina (azul de índigo):



En placas de agar aparecían cristales del compuesto en torno a colonias del germen, que, contra lo esperado, era incapaz de oxidar triptófano y proporcionar indol.

A fin de evitar un posible ahorro de proteínas, para descubrir indol en cultivos bacterianos deben emplearse medios que no contengan carbohidratos.

Véase más información en Dawes (1948), Dawes y Happold (1949), y Happold (1950).

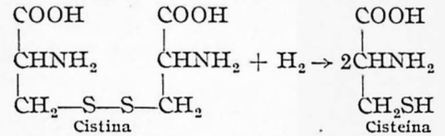
Producción de sulfuro de hidrógeno. En las proteínas se han encontrado dos aminoácidos que contienen azufre: cistina y metionina; la primera parece ser la más frecuente, y la de mayor importancia desde el punto de vista bacteriológico.

Algunos microorganismos pueden atacar la cistina, con desprendimiento de sulfuro de hidrógeno; otros son incapaces de hacerlo. Este ensayo sirve para identificar y clasificar bacterias.

No hay cistina en todas las proteínas. Para la producción de peptona se escogen las que con seguridad la contienen en gran proporción.

Ransmeier y Stekol (1942 *a*, *b*) descubrieron que las especies *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa* y *Pasteurella tularensis* separaban sulfuro de hidrógeno de la cistina y no de la metionina.

Lo primero que ocurre parece ser una reducción de cistina a dos moléculas de cisteína. Según Tarr (1933), la cisteína se descompone luego en sulfuro de hidrógeno, amoníaco, ácido acético y ácido fórmico:



$$\underset{\text{Cisteína}}{COOH\cdot CHNH_2\cdot CH_2SH} + 2H_2O \rightarrow H_2S + NH_3 + \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3\cdot COOH} + \underset{\text{Ácido fórmico}}{HCOOH}$$

Fromageot y Tchen (1943), trabajando con *Bacillus subtilis*, llegan a la conclusión de que se produce ácido pirúvico, en vez de una mezcla de ácidos acético y fórmico:

$$\underset{\text{Cisteína}}{COOH\cdot CHNH_2\cdot CH_2SH} + H_2O \rightarrow H_2S + NH_3 + \underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_3\cdot CO\cdot COOH}$$

El sulfuro de hidrógeno reacciona con metales pesados para producir compuestos de color; las sales metálicas se incorporan a medios sólidos. La presencia de sulfuro de hidrógeno se descubre por oscurecerse el medio a lo largo de la línea de siembra (fig. 151). Los metales comúnmente empleados son plomo, hierro, bismuto, cobalto y níquel. Tittsler y Sandholzer (1937) hallaron que el hierro es más sensible que el plomo. Hunter y Crecelius (1938) señalan que el bismuto era más sensible que el plomo o el hierro para descubrir sulfuro de hidrógeno; los microorganismos que producen este compuesto en pequeñas cantidades dan resultados negativos con plomo o hierro, y un color pardo apreciable con sulfuro de bismuto. Utermohlen y Georgi (1940) emplearon un medio que contenía una mezcla de sales de cobalto y níquel, y comprobaron que era tan bueno como uno de bismuto. En 1944, Georgi y McMaster (1944) han estudiado veinte peptonas distintas y tres iones metálicos, y declaran que el bismuto era superior para poner de manifiesto la producción de sulfuro de hidrógeno por diversas bacterias; la sensibilidad de los iones detectores a este sulfuro sigue este orden: $Bi > Pb > Fe$.

Puede decirse, por tanto, que no basta afirmar simplemente que un microbio produce o no sulfuro de hidrógeno, sin exponer las condiciones en que se realizó la investigación.

Licuación de gelatina. La licuación de gelatina por bacterias es el resultado de la acción de una enzima conocida por gelatinasa. Es una enzima extracelular, que interviene en la hidrólisis de la proteína no difusible antes de su aprovechamiento en el interior de las células.

La presencia de la enzima puede demostrarse sembrando en un tubo con gelatina el microbio que se estudia, e incubando el cultivo a temperatura adecuada; a más de 20° C, funde la gelatina. En estas condiciones, la presencia de gelatinasa se puede determinar colocando el cultivo en gelatina dentro de la nevera y observando si se endurece o no; si la gelatina permanece líquida, es que el microorganismo en examen na segregado una gelatinasa en el medio de cultivo.

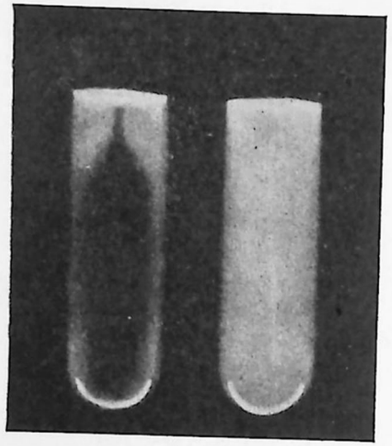


Fig. 151. — Producción de sulfuro de hidrógeno. Izquierda, medio de agar-peptona-hierro inoculado con *Proteus vulgaris*; se forma sulfuro de hidrógeno, que reacciona con el hierro para dar sulfuro ferroso negro. Derecha, el mismo medio con *Escherichia coli*; no se produce sulfuro de hidrógeno.

El carácter extracelular de la enzima se puede demostrar filtrando el cultivo de un germen apropiado, y vertiendo algo del filtrado en un tubo con gelatina; la presencia de gelatina se traducirá en licuación del medio.

Otro método de comprobar que existe esta enzima en un cultivo consiste en añadir germicida (fenol) en la cantidad justa para matar los gérmenes, pero sin producir efecto apreciable sobre la enzima. La adición de un poco de este cultivo fenicado a un tubo con gelatina producirá licuación si el microorganismo en estudio es capaz de elaborar una gelatinasa.

En presencia de un carbohidrato fermentable puede producirse ahorro de proteína. Un ensayo de licuación de gelatina resultará probablemente negativo entonces, aunque el germen de que se trate pueda atacar la proteína. Por consiguiente, no deben emplearse medios sin carbohidratos para demostrar que un microorganismo es o no capaz de segregar gelatinasa. Este experimento sirve para identificar y clasificar bacterias.

Producción de amoníaco. El desprendimiento de amoníaco en cultivos bacterianos es resultado, en gran parte, de la desaminación de aminoácidos presentes en los medios nutritivos.

Generalmente se supone que los aminoácidos han de desaminarse antes de su asimilación. Cuando falta un carbohidrato fermentable, los microorganismos asimilan el amoníaco para reforzar su estructura, y las cadenas desaminadas de carbono como fuentes de energía; y como

se necesita más carbono energético que nitrógeno asimilable, se acumulará amoníaco en el medio. En presencia de un carbohidrato fermentable, puede sobrevenir un ahorro de proteínas, y en este caso el microbio asimila los aminoácidos, pero no los utiliza como alimentos energéticos. Esto se puede atribuir a dos factores: 1.° Los microbios utilizan carbohidratos mejor que aminoácidos desaminados como proveedores de energía; dado que para este objeto no se necesita el carbono de los aminoácidos, se produce menos amoníaco. 2.° La adición de un carbohidrato fermentable a un medio estimula la vegetación bacteriana (numéricamente), lo cual implica un aprovechamiento mayor de amoníaco, cuya concentración disminuye así en el medio. Se admite la posibilidad de que participen ambos factores, de modo que, tratándose de gérmenes vigorosamente fermentativos, al añadir carbohidrato a un cultivo se acumula menos amoníaco libre que cuando el mismo cultivo no contiene carbohidrato.

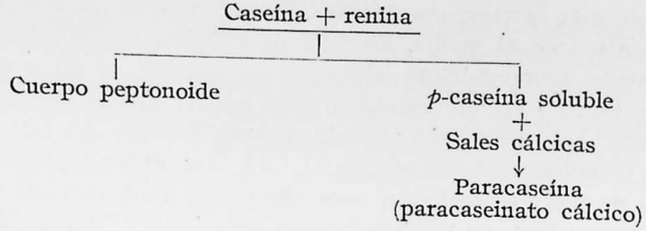
Para evitar un posible ahorro de proteína, deben emplearse medios sin carbohidrato cuando interese descubrir amoníaco en cultivos bacterianos.

Peptonización y fermentación de leche. La leche contiene los siguientes componentes principales:

Agua.
Grasa (de mantequilla).
Caseína.
Albúmina.
Sales (de potasio, sodio, cloro, calcio, magnesio, fosfato inorgánico, ácido cítrico).
Vitaminas (cloruro de tiamina o B_1, riboflavina o B_2, ácido ascórbico o C, calciferol o D, A, y ácido nicotínico.

El empleo de leche como medio de cultivo data de los comienzos de la Bacteriología. Se utiliza como medio diferencial para demostrar que un microorganismo puede producir fermentación, peptonización, o ambos efectos a la vez.

La caseína es una proteína capaz de reaccionar como ácido débil o como base poco enérgica (anfótera). En la leche se halla enteramente en suspensión coloidal. Algunas bacterias segregan una enzima parecida a la renina, capaz de hidrolizar caseína y transformarla en paracaseína soluble y un cuerpo similar a la peptona. La paracaseína soluble reacciona entonces con las sales cálcicas disueltas, y se forma un precipitado de paracaseína o de paracaseinato cálcico; el líquido claro que rodea el coágulo de paracaseína se conoce por suero. Esto puede representarse en esquema como sigue:



Las bacterias que atacan enérgicamente la lactosa producen una intensa acidez, que se traduce en precipitación o coagulación de la

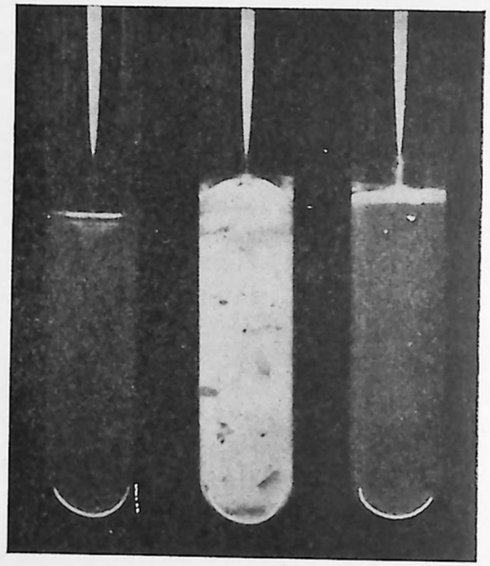


Fig. 152. — Fermentación y peptonización de leche. Izquierda, leche con tornasol, en la que se han sembrado gérmenes de *Bacillus subtilis*; la caseína está completamente peptonizada, en solución purpúrea clara. Centro, leche con tornasol, que contiene *Escherichia coli*; la lactosa ha fermentado, la caseína se ha coagulado después, y el indicador está totalmente reducido. Derecha, leche con tornasol no inoculada.

caseína. El líquido claro que sobrenada es también suero; el pH final basta para impedir que prosiga la acción bacteriana, y no ocurren alteraciones putrefactivas, pues los carbohidratos preservan las proteínas (figura 152).

La coagulación con renina suele ir seguida de peptonización de la caseína, lo cual significa que los gérmenes no atacan la lactosa o la hacen fermentar muy despacio. En el primer caso, la caseína se hidroliza ante todo, y se descompone luego, formándose diversos productos solubles; en el segundo, una acción lenta de la lactosa provoca a la vez fermentación y descomposición de proteínas, pues este azúcar no muestra acción preservativa de las mismas.

A la leche se añade con frecuencia el indicador tornasol para descubrir cambios de pH en el medio y comprobar si un microorganismo lo puede reducir a su forma incolora; es un colorante débil, algo inadecuado como indicador. Los más modernos de sulfonftaleína, de brillo más intenso, como el púrpura de bromocresol y el azul de bromotimol, muestran una sensibilidad mayor y son superiores al tornasol para apreciar cambios en la reacción de la leche. Sin embargo, el tornasol indica también el potencial de oxidación-reducción del medio, lo que no pueden hacer los indicadores sintéticos de sulfonftaleína, y esta propiedad suele ser de importancia para el diagnóstico. Por eso, el tornasol continúa siendo muy utilizado para añadir a la leche como medio de cultivo.

REFERENCIAS

Bainbridge, F. A.: The action of certain bacteria on proteins, *J. Hyg.*, **11**: 341, 1911.

Berman, N. y L. F. Rettger: Bacterial nutrition. A brief note on the production of erepsin (peptolytic enzyme) by bacteria, *J. Bact.*, **1**: 537, 1916.

— y —: The influence of carbohydrate on the nitrogen metabolism of bacteria, *ibid.*, **3**: 389, 1918.

Czekalowski, J. W. y B. Skarzynski: The breakdown of phenols and related compounds by bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **2**: 231, 1948.

Dawes, E. A.: Production of indole by *Escherichia coli*, *Nature*, **162**: 229, 1948.

— y F. C. Happold: The tryptophanase-tryptophan reaction. 9. The nature characteristics and partial purification of the tryptophanase complex, *Biochem. J.*, **44**: 349, 1949.

Evans, W. C.: Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria, *Biochem. J.*, **41**: 373, 1947.

Fromageot, C. y P. K. Tchen: Influence des sucres sur la décomposition anaérobie de la Cysteine par *Bacillus subtilis*, *Bull, soc. chim. biol.*, **25**: 1006, 1943.

Fruton, J. S.: Protein structure and proteolytic enzymes, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **6**: 50, 1938.

—: Proteolytic enzymes as specific agents in the formation and breakdown of proteins, *ibid.*, **9**: 211, 1941.

Gale, E. F.: Enzymes concerned in the primary utilization of amino acids by bacteria, *Bact. Rev.*, **4**: 135, 1940.

—: Factors influencing the enzymic activities of bacteria, *ibid.*, **7**: 139, 1943.

—: «The Chemical Activities of Bacteria», Nueva York, Academic Press, Inc., 1952.

Georgi, C. E. y M. E. McMaster: Influence of bacteriologic peptones on hydrogen sulfide, indol and acetyl methyl carbinol production by *Enterobacteriaceae*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**: 185, 1944.

Gray, P. H. H.: The formation of indigotin from indol by soil bacteria, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Series B, **102**: 263, 1928.

Grob, D.: Proteolytic enzymes. I. The control of their activity, *J. Gen. Physiol.*, **29**: 219, 1946*a*; II. The physiological significance of the control of their activity, especially with respect to bacterial growth, *ibid.*, **29**: 249, 1946b.

Happold, F. C.: Tryptophanase-tryptophan reaction. De «Advances in Enzymology», Vol. 10, ed. por F. F. Nord, Nueva York, Interscience Publishers, Inc., 1950.

Hunter, C. A. y H. G. Crecelius: Hydrogen sulfide studies. I. Detection of hydrogen sulfide in cultures, *J. Bact.*, **35**: 185, 1938.

Kendall, A. I. y A. W. Walker: Observations on the proteolytic enzyme of *Bacillus proteus*, *J. Infectious Diseases*, **17**: 442, 1915.
Kotake, Y.: Studien über den intermediaren Stoffwechsel des Tryptophans, *Z physiol. Chem.*, **214**: 1, 1933.
Ransmeier, J. C. y J. A. Stekol: Effect of sulfur-containing compounds on growth and hydrogen sulfide production by *Bacterium tularense*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **51**: 85, 1942*a*.
— y —: Production of hydrogen sulfide from sulfur-containing compounds by various bacteria. II. Experiments with synthetic medium., *ibid.*, **51**: 92, 1942*b*.
Sasaki, T.: Über die Bildung der Anthranilsäure aus *l*-Tryptophan durch Subtilisbacterien, *J. Biochem.*, **2**: 251, 1923.
Sperry, J. A. y L. F. Rettger: The behavior of bacteria towards purified animal and vegetable proteins, *J. Biol. Chem.*, **20**: 445, 1915.
Stephenson, M.: «Bacterial Metabolism», Nueva York, Longmans, Green & Co., Inc., 1949.
— y E. F. Gale: Factors influencing bacterial deamination. I. The deamination of glycine *dl*-alanine and *l*-glutamic acid by *Bacterium coli*, *Biochem. J.*, **31**: 1316, 1937.
Sumner, J. B. y G. F. Somers: «Chemistry and Methods of Enzymes», Nueva York, Academic Press, Inc., 1953.
Supniewski, J.: Der Stoffwechsel der zyklischen Verbindungen bei *Bacillus pyocyaneus*, *Biochem. Z.*, **146**: 522, 1924.
Tarr, H. L. A.: The anaerobic decomposition of *l*-cystine by washed cells of *Proteus vulgaris*, *Biochem. J.*, **27**: 759, 1933.
Tittsler, R. P. y L. A. Sandholzer: Advantages of peptone iron agar for the routine detection of hydrogen sulfide production, *Am. J. Pub. Health*, **27**: 1240, 1937.
Utermohlen, W. P., Jr. y C. E. Georgi: A comparison of cobalt and nickel salts with other agents for the detection of hydrogen sulfide in bacterial cultures, *J. Bact.*, **40**: 449, 1940.
Wrinch, D.: The protein—a physicochemical individual, *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**: 175, 1948*a*.
—: The native proteins as polycondensations of amino acids, *Science*, **107**: 445, 1948*b*.

CAPÍTULO XV

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y OTRAS SUBSTANCIAS

Durante el primer tercio del siglo XIX, la teoría biológica de la fermentación hizo pocos progresos, porque la mayoría de los hombres de ciencia de entonces eran químicos y físicos. Berzelius y sus discípulos Liebig y Wöhler creían que todos los fenómenos vitales podían explicarse sobre bases puramente químicas. A su juicio, fermentación y putrefacción eran obra de cuerpos conocidos por fermentos (enzimas). Se suponía que los fermentos derivaban de cierto componente de la solución, al exponer ésta al aire, pero que no se necesitaba oxígeno después de iniciarse la fermentación.

Pasteur creía que en la fermentación había siempre células vivas de levadura, sin las cuales era imposible aquélla.

Más tarde, Buchner demostró que el extracto de levadura, añadido al azúcar, podía provocar la fermentación alcohólica. Esta observación hizo ver que ambas opiniones eran correctas, es decir, que la fermentación era obra de enzimas, pero que se necesitaban células vivas para elaborar estas últimas.

La palabra fermentación ha experimentado muchos cambios de sentido desde los tiempos de Pasteur, pero generalmente se define como oxidación incompleta de carbohidratos y substancias similares por la acción de microorganismos. Los diversos tipos de fermentación producen muchas clases de ácidos orgánicos y otros compuestos.

La acción bacteriana sobre los carbohidratos puede ser aeróbica o anaeróbica. En presencia de suficiente oxígeno, la descomposición de carbohidratos puede llegar hasta los productos finales, dióxido de carbono y agua. Si no hay oxígeno libre, se desarrolla combustión incompleta y descomposición anaeróbica.

Desde el descubrimiento del oxígeno por Lavoisier, los fisiólogos se familiarizaron con la idea de que el oxígeno era un atributo esencial del mantenimiento de la vida, y veían en la combustión lenta de las substancias nutritivas orgánicas la fuente de la energía vital. En tales condiciones, es fácil comprender cómo Pasteur dedujo que la caracterís-

tica principal de los agentes de fermentación era su capacidad de utilizar el oxígeno de compuestos orgánicos; dicho de otro modo, que no se necesitaba oxígeno libre para que hubiese oxidaciones. Es bien notoria la expresión de Pasteur: «*La fermentation est la vie sans air*».

En la descomposición anaeróbica, los microorganismos no pueden obtener la cantidad máxima de energía existente en substancias fermentables. Tomando como ejemplo la glucosa, la oxidación total, la oxidación parcial y la descomposición anaeróbica proporcionan las calorías que se indican a continuación:

1. Oxidación total:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 674\ \text{Cal.}$$

2. Oxidación parcial:

$$C_6H_{12}O_6 + 4\,{}^1/_2\,O_2 \rightarrow \underset{\text{Ácido oxálico}}{3\,(COOH)_2} + 3\,H_2O + 493\ \text{Cal.}$$

3. Descomposición anaeróbica:

a) $$C_6H_{12}O_6 \rightarrow \underset{\text{Ácido láctico}}{2\,CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}COOH} + 22\,{}^1/_2\ \text{Cal}$$

b) $$C_6H_{12}O_6 \rightarrow \underset{\text{Alcohol etílico}}{2\,CH_3{\cdot}CH_2OH} + 2\,CO_2 + 22\ \text{Cal.}$$

c) $$C_6H_{12}O_6 \rightarrow \underset{\text{Ácido acético}}{3\,CH_3{\cdot}COOH} + 15\ \text{Cal.}$$

La fermentación de glucosa por la *Escherichia coli* produce ácidos fórmico, acético, láctico y succínico, alcohol etílico, hidrógeno y dióxido de carbono. Grey (1919) señaló que 100 g de los citados productos, completamente oxidados, daban aproximadamente 316 Cal., de las cuales sólo 58 se liberan en la reacción. La oxidación incompleta de glucosa por la *Escherichia coli* no rinde más que un 16 % de la energía potencial.

Fermentación de compuestos nitrogenados. Generalmente se dice que en el proceso de fermentación no participan más que substancias semejantes a carbohidratos; pero esto no es rigurosamente cierto. Hoy se sabe que unas pocas especies de anaerobios, o de gérmenes facultativos desarrollados en condiciones aneróbicas, pueden satisfacer total o parcialmente sus necesidades de energía por fermentación de simples aminoácidos u otros cuerpos nitrogenados. Probablemente se separa primero como amoníaco el grupo amino de los aminoácidos, y luego fermenta el residuo de carbono.

Cardon (1942) informó que los anaerobios *Clostridium tetanomorphum* y *Cl. cochlearium* fermentaban ácido glutámico, y que el *Cl. acidiurici* y el *Cl. cylindrosporum* fermentaban ácido úrico para producir energía. Se ha descubierto una especie anaerobia, no identificada, que fermenta alanina, según la ecuación

$$\underset{\text{Alanina}}{3\,CH_3{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH} + 2\,H_2O \rightarrow 3\,NH_3 + \underset{\text{Ác. propiónico}}{2\,C_2H_5{\cdot}COOH} + \underset{\text{Ác. acético}}{CH_3COOH} + CO_2$$

Según Clifton (1942), el *Cl. tetani* fermenta ácido aspártico, ácido glutámico y serina, con producción de amoníaco, ácido acético, ácido láctico, ácido butírico, alcohol y dióxido de carbono. Los mismos cuerpos, en lo esencial, se obtienen al descomponer ácido pirúvico, producto intermedio en la fermentación de carbohidratos. Picket (1943), trabajando con el mismo germen, dió cuenta de resultados similares.

Barker (1943) ha cultivado *Streptococcus allantoicus* en presencia de alantoína, en condiciones anaeróbicas, y comprobado que este microbio fermenta el compuesto y produce amoníaco, urea, ácido fórmico, ácido láctico, ácido oxámico y dióxido de carbono.

Cardon y Baker (1946, 1947) aislaron de fango marino dos bacterias anaerobias estrictas capaces de fermentar simples aminoácidos. El *Clostridium propionicum* provoca una fermentación propiónica de alanina y serina. La ecuación de descomposición de la alanina es

$$\underset{\text{Alanina}}{3CH_3{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH} + 2H_2O \rightarrow 3NH_3 + \underset{\text{Ác. propiónico}}{2CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + \underset{\text{Ác. acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + CO_2$$

El otro microorganismo, *Diplococcus glycinophilus*, fermenta glicina según la ecuación

$$\underset{\text{Glicina}}{4\,CH_2NH_2{\cdot}COOH} + 2\,H_2O \rightarrow 4\,NH_3 + \underset{\text{Ác. acético}}{3\,CH_3{\cdot}COOH} + 2\,CO_2$$

Barker y Wiken (1948) han dado a conocer también la fermentación del aminoácido treonina por el *Cl. propionicum*, para dar ácidos butírico y propiónico:

$$\underset{\text{Treonina}}{3\,CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Ácido butírico}}{CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + \underset{\text{Ácido propiónico}}{2\,CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + 2\,CO_2 + 3\,NH_3$$

Barker, Volcani y Cardon (1948) han comprobado que el *D. glycinophilus* fermenta glicina y da ácido acético:

$$\underset{\text{Glicina}}{4\,CH_2NH{\cdot}{}_2COOH} + 2\,H_2O \rightarrow 4\,NH_3 + \underset{\text{Ác. acético}}{3\,CH_3{\cdot}COOH} + 2\,CO_2$$

Véase más información en Whiteley y Douglas (1951).

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El alcohol se produce industrialmente por la acción de levaduras sobre un carbohidrato apropiado. Por lo regular se usa con este fin *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura corriente del pan o de la cerveza. Este microorganismo convierte un 90 % del azúcar en cantidades equimoleculares de alcohol y dióxido de carbono. La ecuación conjunta se puede expresar así:

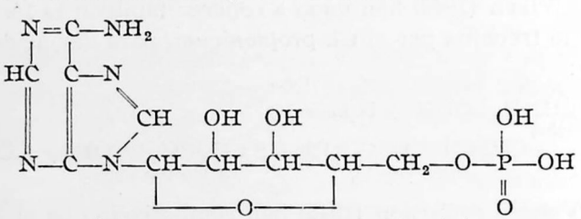
$$\underset{d\text{-Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow 2\,CO_2 + \underset{\text{Alcohol}}{2\,C_2H_5OH}$$

Efecto de Pasteur. La fermentación alcohólica se desarrolla con aire o sin él, si bien la reacción se hace más lenta en el primer caso. En presencia de oxígeno, la respiración (admisión de oxígeno) aumenta, y disminuye la fermentación; y sucede lo contrario cuando no hay oxígeno. Esto es lo que se llama a veces «efecto de Pasteur».

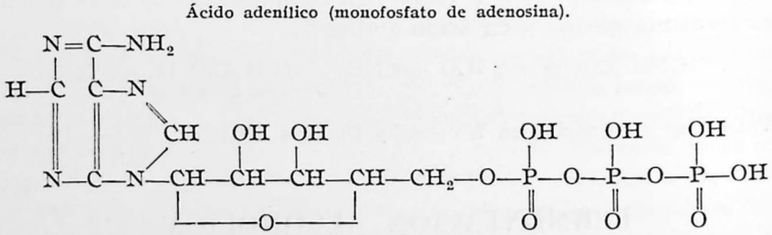
Véase más información en Istin (1947).

Mecanismo de la fermentación alcohólica. Meyerhof (1949) y otros han propuesto el siguiente esquema para convertir azúcar en alcohol. Consta de catorce operaciones conocidas, e intervienen por lo menos 51 enzimas y 3 sistemas coenzimáticos en la reducción de glucosa a alcohol; a cada enzima corresponde una sola operación. Antes, Buchner llamó «cimasa» a todo el grupo de enzimas y coenzimas: las primeras sirven para el transporte de fosfato, la oxidación-reducción, la descarboxilación; la aldolasa, para romper la cadena de carbonos; la mutasa, para el traslado de enlaces de fosfato, la isomerización, etc.

La operación primera consiste en fosforilar la hexosa por el sistema coenzimático respectivo, que comprende ácido adenílico (monofosfato de adenosina), difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina; las dos primeras coenzimas recogen fosfato, y la tercera lo transporta. Las fórmulas del ácido adenílico y del trifosfato de adenosina son:



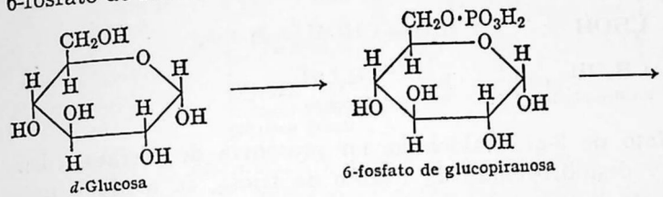
Ácido adenílico (monofosfato de adenosina).



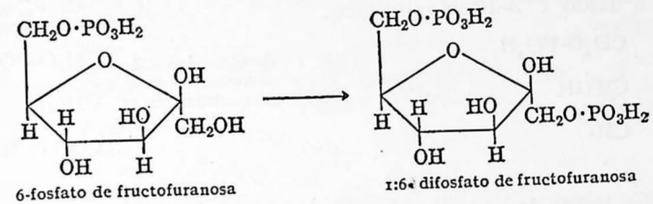
Trifosfato de adenosina

El sistema coenzimático existe en el extracto de levadura, y puede transportar fosfato a la hexosa, convirtiendo primero el azúcar en monofosfato de hexosa, y luego en difosfato; la pérdida de una molécula de fosfato convierte la coenzima en difosfato de adenosina. El fosfato no se utiliza en la reacción. Cuando la fermentación alcanza la fase pirúvica, se libera el fosfato y queda disponible de nuevo para fosforilar más azúcar.

La fosforilización de glucosa en presencia de la coenzima trifosfato de adenosina proporciona primero 6-fosfato de glucopiranosa, luego 6-fosfato de fructofuranosa y, por último, 1 : 6-difosfato de fructofuranosa:

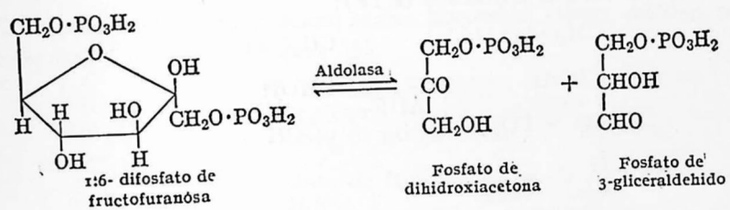


d-Glucosa — 6-fosfato de glucopiranosa



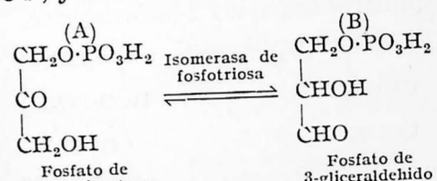
6-fosfato de fructofuranosa — 1:6-difosfato de fructofuranosa

El 1 : 6-difosfato de fructofuranosa se desdobla para formar una molécula de fosfato de dihidroxiacetona y otra de fosfato de 3-gliceraldehido:



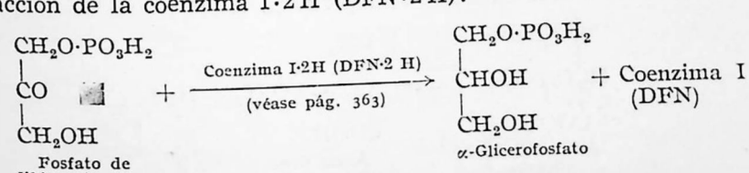
1:6-difosfato de fructofuranosa — Aldolasa — Fosfato de dihidroxiacetona + Fosfato de 3-gliceraldehido

El fosfato de dihidroxiacetona y el fosfato de 3-gliceraldehido están en equilibrio entre sí, y se convierten ampliamente en el primero:



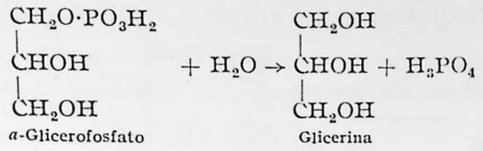
Fosfato de dihidroxiacetona ⇌ (Isomerasa de fosfotriosa) Fosfato de 3-gliceraldehido

A) El fosfato de dihidroxiacetona se reduce a α-glicerofosfato por la acción de la coenzima I·2H (DFN·2H):

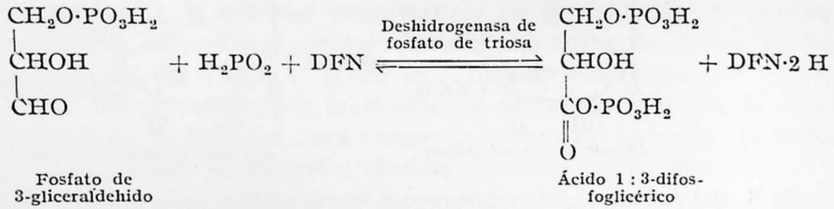


Fosfato de dihidroxiacetona + Coenzima I·2H (DFN·2 H) (véase pág. 363) → α-Glicerofosfato + Coenzima I (DFN)

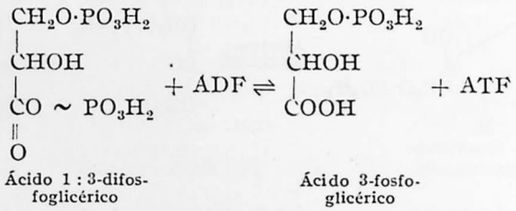
El α-glicerofosfato se convierte por hidrólisis en glicerina y ácido fosfórico:



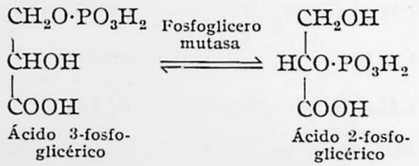
B) El fosfato de 3-gliceraldehido, en presencia de fosfato, coenzima I (DFN) y deshidrogenasa de fosfato de triosa, se oxida y pasa a ácido 1 : 3-difosfoglicérico:



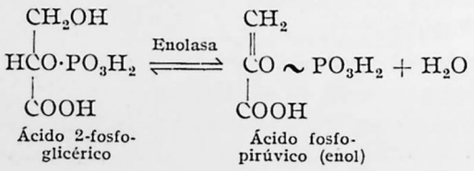
El ácido 1 : 3-difosfoglicérico cede el enérgico grupo fosfato al difosfato de adenosina (ADF), para formar ácido 3-fosfoglicérico; el difosfato de adenosina pasa a trifosfato (ATF):



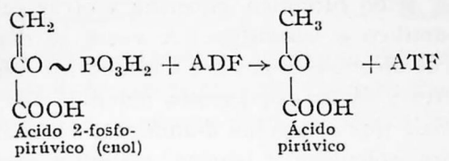
El ácido 3-fosfoglicérico, en presencia de la enzima fosfogliceromutasa, está en equilibrio con ácido 2-fosfoglicérico:



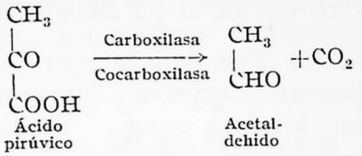
El ácido 2-fosfoglicérico, por obra de la enolasa, pierde una molécula de agua y se convierte en ácido fosfopirúvico (enol):



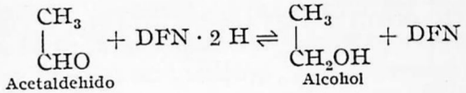
El ADF substrae al ácido 2-fosfopirúvico (enol) el enlace de fosfato, muy enérgico, y da ácido pirúvico y ATF:



Luego, la enzima carboxilasa y su coenzima cocarboxilasa descarboxilan el ácido pirúvico, para dar acetaldehido y dióxido de carbono:



Finalmente, el acetaldehido admite hidrógeno del DFN, para producir alcohol:



Los pasos de la fermentación, según Meyerhof (1949), pueden representarse como muestra la figura 153.

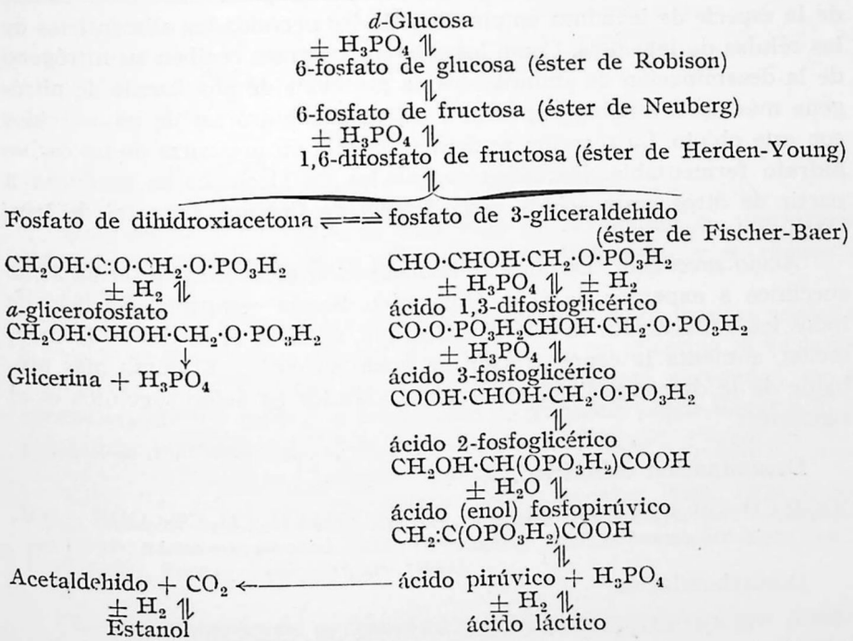
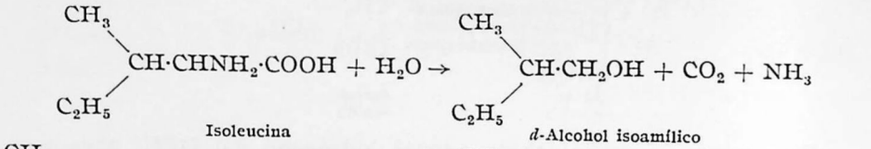


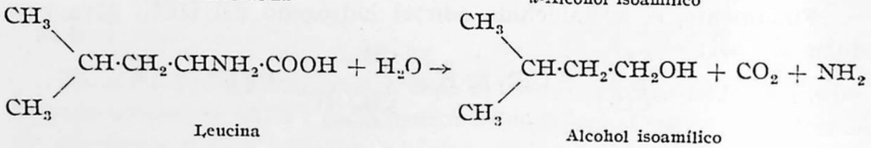
Fig. 153. — Esquema de la fermentación alcohólica. (Según Meyerhof.)

Subproductos de la fermentación alcohólica. Además de alcohol y dióxido de carbono, se producen pequeñas porciones de alcohol *d*-amílico, alcohol isoamílico, ácido succínico, glicerina y otras substancias.

Alcoholes d-amílico e isoamílico. A veces se denomina aceite de fusel una mezcla de alcoholes *d*-amílico e isoamílico con indicios de otros alcoholes superiores y éteres compuestos obtenidos de líquidos fermentados. Ehrlich señaló que el alcohol *d*-amílico y el isoamílico se derivan de los aminoácidos isoleucina y leucina, respectivamente; estos ácidos pueden provenir de los componentes del medio o de la proteína de células de levadura muertas y autolisadas. Los alcoholes se producen por desaminación y descarboxilación de los aminoácidos:



Isoleucina — *d*-Alcohol isoamílico

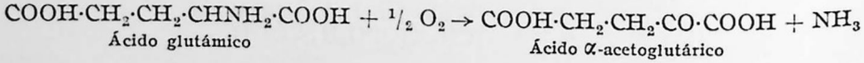


Leucina — Alcohol isoamílico

Las cantidades resultantes de los dos alcoholes dependen de las concentraciones de los aminoácidos específicos presentes en el medio, de la especie de levadura empleada y de las necesidades alimenticias de las células de levadura. Como los microorganismos reciben su nitrógeno de la desaminación de aminoácidos, la presencia de una fuente de nitrógeno más aprovechable impedirá o diferirá la hidrólisis de aminoácidos con este objeto. La reacción se desarrolla sólo en presencia de un carbohidrato fermentable. Pequeñas cantidades de alcoholes se producen a partir de otros aminoácidos, como tirosol de tirosina, triptofol de triptófano, etc.

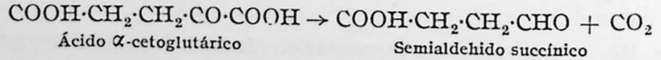
Ácido succínico. Durante la fermentación alcohólica se forma ácido succínico a expensas de ácido glutámico. Según comprobó Ehrlich, de todos los aminoácidos es este el único que, añadido al medio de fermentación, aumenta la concentración de ácido succínico. El curso más probable de la descomposición de ácido glutámico en ácido succínico es el siguiente:

Desaminación oxidativa



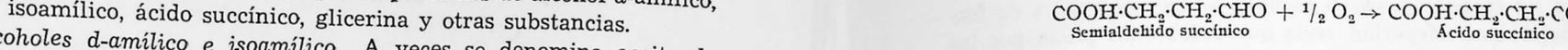
Ácido glutámico — Ácido α-acetoglutárico

Descarboxilación



Ácido α-cetoglutárico — Semialdehido succínico

Oxidación

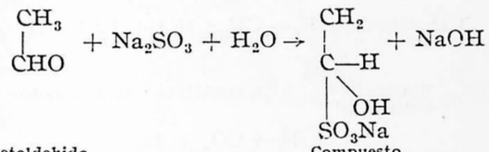


Semialdehido succínico — Ácido succínico

El ácido succínico se obtiene del ácido glutámico del medio o de las proteínas de células de levadura muertas y autolisadas. Como en el caso del aceite de fusel, no se forma ácido succínico en ausencia de un carbohidrato fermentable.

Glicerina. La glicerina se prepara en la industria principalmente por saponificación de grasas y aceites en la fabricación de jabones. Se produce también en pequeñas cantidades durante la fermentación alcohólica de carbohidratos por medio de levaduras. El rendimiento rara vez pasa de un 3,8 % del azúcar fermentado. Neuberg y Reinfurth (1918) fueron probablemente quienes primero señalaron que la producción de glicerina podía aumentarse mucho agregando un álcali apropiado o sulfito sódico a la mezcla en fermentación.

Como ya se ha indicado, el alcohol procede de una reducción del producto intermedio acetaldehido por medio del hidrógeno de la cocimasa reducida. Si se impide que este hidrógeno reduzca el acetaldehido, es mayor el rendimiento en glicerina; esto se consigue añadiendo sulfito sódico a la mezcla que fermenta: el sulfito reacciona con el acetaldehido para formar un producto de adición, e impide que admita hidrógeno de la coenzima I reducida:



Acetaldehido — Compuesto aldehido-bisulfito

Una segunda molécula en el medio de fermentación, una triosa obtenida de la hexosa, sirve de receptor de hidrógeno, y se reduce a glicerina.

El carbonato sódico reacciona con el acetaldehido de manera análoga, e impide su reducción a alcohol. El rendimiento en glicerina es variable, y depende de la cantidad de sulfito o de carbonato agregada; en el procedimiento del sulfito, la producción de glicerina puede llegar a 37 % del azúcar fermentado.

Véase más información en Lipmann (1942), Meyerhof (1945, 1952), Ochoa (1942), Prescott y Dunn (1944), Skinner, Emmons y Tsuchiya (1947), Stephenson (1949), Sumner y Somers (1953), Underkofler, Fulmer, Hickey y Lees (1951), Underkofler, Fulmer, Lees y Figard (1951),

La fermentación de carbohidratos mediante levaduras, con producción de alcohol y dióxido de carbono, sobre todo, se ha desarrollado

bastante bien; sin embargo, todavía no se conoce con precisión cómo se descomponen los carbohidratos en algunas formas especiales de fermentaciones bacterianas. Meyerhof creía que todas ellas pasan por las mismas fases intermedias, desde hexosa a ácido pirúvico, y sólo se ramifican después. A continuación se exponen las fermentaciones bacterianas más importantes.

FERMENTACIÓN BUTÍRICA

En este tipo de fermentación interviene el bacilo *Clostridium butyricum*, anaerobio y esporíparo; es el mismo germen relacionado con el enriamiento de lino y cáñamo.

Los bacilos son rectos o ligeramente curvos, con los extremos redondeados; se encuentran sueltos, en parejas, en cadenas cortas y a veces en filamentos largos. Las células son móviles, y las esporas ovales, excéntricas a subterminales, y dan a los bacilos hinchados aspecto de clostridios; es grampositivo, y se hace gramnegativo.

El esquema de la reacción, según Kluyver y su escuela (1931), es como sigue:

$$\underset{\text{Hexosa}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow 2\ C_3H_6O_3$$

$$\underset{\text{Hidrato de metilglioxal}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}C(H)(OH){-}OH} \rightarrow \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + \underset{\text{Ácido fórmico}}{HCOOH}$$

$$\underset{\text{Ácido fórmico}}{HCOOH} \rightarrow CO_2 + H_2$$

$$2\ CH_3{\cdot}CHO + H_2O \rightleftharpoons \underset{\text{Hidrato de acetaldehido}}{CH_2{\cdot}C(H)(OH){-}OH} + \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + H_2$$

Acetaldehido

$$\underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} \rightarrow \underset{\text{Acetaldol}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHO}$$

$$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHO \rightleftharpoons \underset{\text{Acetaldol}}{CH_3{\cdot}CH = CH{\cdot}C(H)(OH){-}OH}$$

$$CH_3{\cdot}CH = CH{\cdot}C(H)(OH){-}OH \rightarrow \underset{\text{Ácido butírico}}{CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH}$$

Suponía Kluyver que el mecanismo interno de la conversión del azúcar en hidrato de metilglioxal corresponde al de la fermentación alcohólica.

Los productos importantes de este tipo de fermentación son ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Los valores teóricos deducidos del anterior esquema concuerdan notablemente con las cantidades de productos finales hallados en la práctica real.

FERMENTACIÓN BUTÍLICA Y ACETÓNICA

Este tipo de descomposición de carbohidratos se caracteriza por la producción de productos finales en número mayor que en la fermentación butírica. Los dos principales, aparte el dióxido de carbono, son alcohol butílico y acetona, con pequeñas porciones de hidrógeno, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, alcohol etílico y acetilmetilcarbinol.

El microorganismo empleado para este tipo de fermentación es el bacilo *Clostridium acetobutylicum*, anaerobio y productor de esporas.

Estos bacilos son rectos, con extremos redondeados, y se encuentran sueltos o en parejas, pero no en cadenas. Las células son móviles, y tienen flagelos peritriciales; las esporas son ovales, excéntricas a subterminales, y por hinchazón producen formas clostrídicas. Son grampositivos, y se vuelven gramnegativos.

El esquema de la reacción, según Kluyver (1931), es el siguiente:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_3H_6O_3$$

$$\underset{\text{Hidrato de metilglioxal}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}C(H)(OH){-}OH} \rightarrow \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + \underset{\text{Ácido fórmico}}{HCOOH}$$

Reacciones de deshidrogenación:

$$\underset{\text{Ácido fórmico}}{H{\cdot}COOH} \rightarrow CO_2 + 2\ H$$

$$CH_3{\cdot}CHO + H_2O \rightleftharpoons \underset{\text{Hidrato de acetaldehido}}{CH_3{\cdot}C(H)(OH){-}OH}$$

Acetaldehido

$$\underset{\text{Hidrato de acetaldehido}}{CH_2{\cdot}C(H)(OH){-}OH} \rightarrow \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3COOH} + 2\ H$$

Reacciones de condensación:

$$\underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} \rightarrow \underset{\text{Acetaldol}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHO}$$

$$CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHO \rightleftharpoons CH_2{\cdot}CH = CH{\cdot}C(H)(OH){-}OH$$

Acetaldol

$$CH_2{\cdot}CH = CH{\cdot}C(H)(OH){-}OH \rightarrow \underset{\text{Ácido butírico}}{CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH}$$

$$\underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} \rightarrow CH_3{\cdot}C(OH)_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$$

$$CH_3{\cdot}C(OH)_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH \rightleftharpoons \underset{\text{Ácido acetilacético}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + H_2O$$

$$\underset{\text{Ácido acetilacético}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} \rightarrow \underset{\text{Acetona}}{CH_2{\cdot}CO{\cdot}CH_2} + CO_2$$

Reacciones de hidrogenación:

$$2\,H \rightarrow H_2$$

$$\underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + 2\,H \rightarrow \underset{\text{Alcohol etílico}}{CH_3{\cdot}CH_2OH}$$

$$\underset{\text{Ácido butírico}}{CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + 4\,H \rightarrow \underset{\text{Alcohol butílico}}{CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2OH} + H_2O$$

$$\underset{\text{Acetona}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3} + 2\,H \rightarrow \underset{\text{Alcohol isopropílico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_3}$$

En opinión de Kluyver, el mecanismo interno de la conversión de azúcar en hidrato de metilglioxal corresponde igualmente al de la fermentación alcohólica.

Las cantidades de productos finales que se separan de una mezcla de fermentación concuerdan muy de cerca con los cálculos teóricos deducidos del esquema precedente.

Wood, Brown, Werkman y Stuckwisch (1944) emplearon compuestos de carbono pesado (C^{13}) como trazadores con el fin de determinar el mecanismo de la fermentación butílica. Añadiendo ácido acético $CH_3C^{13}OOH$ a mosto de maíz fermentado con bacterias butílicas, se obtuvo alcohol butílico con carbono pesado. Se aisló ácido butírico, $CH_3{\cdot}C^{13}H_2{\cdot}CH_2{\cdot}C^{13}OOH$, con carbono pesado en las posiciones carboxilo y β. A base de la distribución del C^{13} en la molécula, dedujeron que el alcohol butílico se forma por condensación de ácido acético o de su derivado.

FERMENTACIÓN ACETÓNICA Y ETÍLICA

En este tipo de fermentación, los productos principales son acetona, alcohol etílico y dióxido de carbono, con porciones menores de ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico e hidrógeno.

El microorganismo que interviene aquí es el *Bacillus maçerans*, bastoncillo esporíparo aerobio.

Los bacilos se encuentran sueltos o en parejas; las células son móviles, variables frente al gram; las esporas, elipsoidales, terminales o subterminales, de paredes gruesas y teñibles. Los esporangios están hinchados por el extremo, a modo de mazas. El germen produce unas 2 partes de alcohol etílico por 1 parte de acetona. La temperatura óptima de crecimiento es de unos 37° C, pero la vegetación es buena a 42-45° C, y a veces a más.

Según Speakman (1925), el esquema de la fermentación de carbohidratos para obtener acetona y alcohol etílico puede expresarse así:

Primera parte:

$$\underset{\text{Hexosa}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow 2\,\underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH} + 2\,H_2$$

$$\underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH} + H_2 \rightarrow \underset{\text{Ácido láctico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}COOH_2}$$

$$\underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH} \rightarrow \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + CO_2$$

$$\underset{\text{Ácido pirúvico}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + \underset{\text{Ácido fórmico}}{H{\cdot}COOH}$$

$$\underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + H_2 \rightarrow \underset{\text{Alcohol etílico}}{CH_3{\cdot}CH_2OH}$$

Segunda parte:

$$\underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} \rightarrow \underset{\text{Acetaldol}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHO}$$

$$\left\{\begin{array}{l}\underset{\text{Acetaldol}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHO} \\ \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO}\end{array}\right. + H_2O \xrightarrow[\text{reducción}]{\text{oxidación}} \begin{array}{l}\underset{\text{Ácido β-hidroxibutírico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} \\ \underset{\text{Alcohol etílico}}{CH_3{\cdot}CH_2OH}\end{array}$$

$$\left\{\begin{array}{l}\underset{\text{Ácido β-hidroxibutírico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} \\ \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO}\end{array}\right. + H_2O \xrightarrow[\text{reducción}]{\text{oxidación}} \begin{array}{l}\underset{\text{Ácido acetilacético}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + H_2O \\ \underset{\text{Alcohol etílico}}{CH_3{\cdot}CH_2OH}\end{array}$$

$$\underset{\text{Ácido acetilacético}}{CH_2{\cdot}CO{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} \rightarrow \underset{\text{Acetona}}{CH_3{\cdot}CO{\cdot}CH_3} + CO_2$$

FERMENTACIÓN PROPIÓNICA

La fermentación de ciertos carbohidratos, polialcoholes y ácido láctico, con formación de ácido propiónico, ácido acético y dióxido de carbono, es resultado de la acción de varias especies de microorganismos clasificados dentro del género *Propionibacterium*.

Propionibacterium. Los miembros de este género se identifican como gérmenes fijos inmóviles, no esporíparos, grampositivos, que se desarrollan en condiciones anaeróbicas en medios neutros como bastoncitos cortos difteroides, semejantes en ocasiones a estreptococos, y en condiciones aeróbicas como células largas, irregulares, mazudas y ramificadas. Fermentan un número considerable de carbohidratos, polialcoholes y ácido láctico, y dan los productos ya indicados. Se desarrollan muy lentamente, y las colonias no se hacen perceptibles antes de cinco a siete días. Las células crecen mejor en medios de extracto de levadura que contengan carbohidratos sencillos, y la temperatura más propicia es de unos 30° C. Todas las especies se han aislado de productos lácteos, y son causa del aspecto y el sabor característicos del queso suizo de Gruyère.

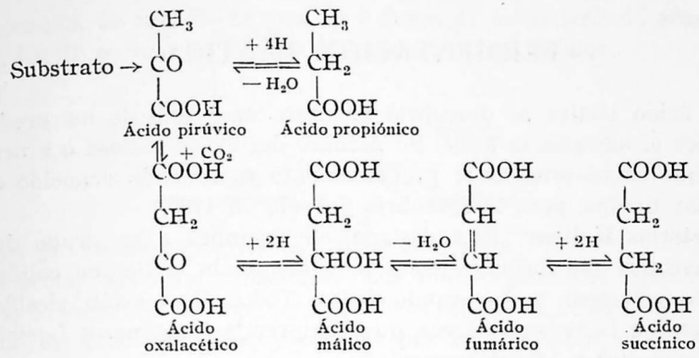
En una serie de investigaciones, Wood y Werkman (1936, 1938, 1940 *a, b*); Wood, Stone y Werkman (1937), y Phelps, Johnson y Peterson (1939), han demostrado que las bacterias propiónicas utilizaban dióxido de carbono durante la fermentación de glicerina. En ausencia de dióxido de carbono, el proceso puede representarse por la ecuación

$$\underset{\text{Glicerina}}{CH_2OH{\cdot}CHOH{\cdot}CH_2OH} \rightarrow \underset{\text{Ácido propiónico}}{CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}COOH} + H_2O$$

Si hay dióxido de carbono, la formación de ácido propiónico va acompañada de la aparición de ácido succínico. De ser esto cierto, el dióxido de carbono se habría convertido en ácido succínico por combinación un compuesto de tres carbonos.

Ruben, Hassid y Kamen (1939); Carson y Ruben (1940); Carson, Foster, Ruben y Kamen (1940); Carson, Foster, Ruben y Barker (1941), y Wood, Werkman, Hemingway y Nier (1940), emplearon dióxido de carbono radiactivo como trazador de su aprovechamiento por las bacterias propiónicas. A base de los resultados de sus ensayos, llegan a la conclusión de que los ácidos propiónico y succínico sólo contenían carbono radiactivo en los grupos carboxilo.

Carson, Foster, Ruben y Barker sugieren el siguiente esquema de producción de ácidos propiónico y succínico en presencia de C^*O_2 (el símbolo C* expresa carbono radiactivo):



Por los resultados obtenidos, deducen:

1. Que los ácidos propiónico y succínico formados en presencia de C^*O_2 son radiactivos.
2. Que estos ácidos contienen el carbono señalado únicamente en los grupos carboxilo.
3. Que el ácido pirúvico es un compuesto intermedio en la fermentación propiónica.
4. Que durante la fermentación de ácido pirúvico en presencia de C* se forma además un cetoácido α-radiactivo, que contiene la mayoría de los C*, si no todos, en grupos carboxilo.
5. Que la serie de reacciones reversibles del ácido oxalacético al succínico se ha observado en las bacterias propiónicas.

Delwiche (1948) ha logrado comprobar que el *P. pentosaceum* posee un sistema de descarboxilasa succínica capaz de producir ácido propiónico a partir del succínico.

Puede afirmarse que la formación de propionato a expensas de piruvato comprende las siguientes reacciones principales:

1) $2\ CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH + 2\ H_2O \rightarrow 2\ CH_3{\cdot}COOH + 2\ CO_2 + 4\ H$
2) $CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH + CO_2 \rightarrow COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH$
3) $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CO{\cdot}COOH + 2\ H \rightarrow COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHOH{\cdot}COOH$
4) $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CHOH{\cdot}COOH \rightarrow COOH{\cdot}CH = CH{\cdot}COOH + H_2O$
5) $COOH{\cdot}CH = CH{\cdot}COOH + 2\ H \rightarrow COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$
6) $COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2{\cdot}COOH \rightarrow CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}COOH + CO_2$

La reacción de conjunto resulta ser:

7) $3\ CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH + H_2O \rightarrow 2\ CH_3{\cdot}COOH + CH_3{\cdot}CH_2{\cdot}COOH + 2\ CO_2$

Véase más información en Barker y Lipman (1949).

FERMENTACIÓN LÁCTICA

El ácido láctico se descubrió primero como uno de los productos formados al agriarse la leche. Su nombre deriva de lactosa o azúcar de leche, que es su precursor; probablemente es el ácido conocido desde hace más tiempo, pues lo descubrió Scheele en 1780.

Bacterias lácticas. Esta designación se aplica a un grupo de microorganismos que forman lactosa para dar ácido láctico en calidad de producto principal, y a menudo único. Todos ellos están clasificados en la familia *Lactobacteriáceas*, que comprende los géneros *Lactobacillus, Leuconostoc y Streptococcus.*

Lactobacillus. Se presentan como bastoncitos grandes a menudo largos y delgados, capaces de producir ácido láctico a partir de carbohidratos y compuestos análogos. Algunas especies producen gases, y otras no; ninguna da catalasa. En caso de formarse gases, son en su totalidad dióxido de carbono. Hay especies microaerófilas, y unas pocas termófilas. Se encuentran en productos lácteos y vegetales en curso de fermentación.

Más información se encontrará en McDonald y Frazier (1951).

Leuconostoc. Las células son normalmente esféricas. En ciertas condiciones, por ejemplo, en frutas ácidas y vegetales, se alargan y se hacen puntiagudas u oblongas, a modo de bacilo; crecen en medios nutritivos ordinarios, pero mejor cuando se añade extracto de levadura, de tomate o de otros vegetales. Por lo general, se obtienen ácidos láctico y acético en corta cantidad; también se forma alcohol, y aproximadamente un 25 % de la glucosa fermentada se convierte en dióxido de carbono. Siempre se produce ácido *l*-láctico, y a veces también ácido *d*-láctico; no coagulan la leche casi nunca. Se encuentra en productos lácteos y zumos de plantas.

Streptococcus. Las características del *S. lactis*, el productor más importante de ácido láctico dentro del género, se exponen en la pág. 584.

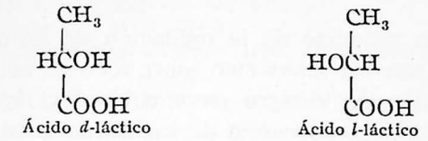
Por su acción sobre la glucosa, los gérmenes lácticos se dividen en dos grandes grupos: bacterias homofermentativas y heterofermentativas.

Especies homofermentativas. Las bacterias homofermentativas convierten un 95 % de glucosa y otras hexosas fermentables en ácido láctico según la ecuación

$$\underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{\text{Ácido láctico}}{CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}COOH}$$

A la vez se producen cantidades pequeñas de dióxido de carbono y ácidos volátiles. Los disacáridos se hacen fermentar de manera análoga;

por ejemplo, un mol de lactosa da 4 moles de ácido láctico; éste puede ser *d, l* o *dl,* mezcla de los dos primeros a partes iguales:



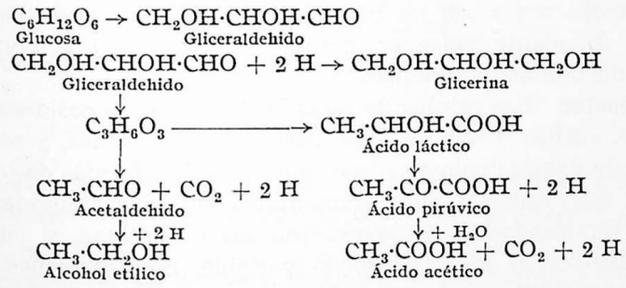
El tipo producido es característico de la especie.

Especies heterofermentativas. Los microorganismos heterofermentativos difieren de los homofermentativos en que el ácido láctico es sólo uno de los productos principales que por su mediación se obtienen de azúcar; los otros son alcohol etílico, ácido acético, glicerina, dióxido de carbono, etc.

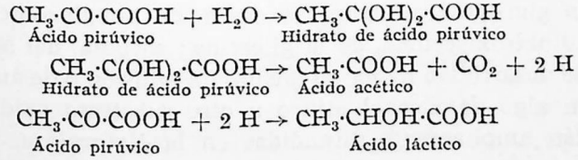
Véase más información en Snell (1948).

Para producir ácido láctico se emplean numerosos carbohidratos, generalmente glucosa, sacarosa y lactosa. Es posible hidrolizar primero almidones de varias clases, reduciéndolos así a azúcares por medio de ácidos o enzimas, y obtener luego ácido láctico por fermentación. Las melazas y el suero lácteo son materiales baratos y excelentes reservas de carbohidratos para la producción de ácido láctico.

Esquema de la producción de ácido láctico. Según Nelson y Werkman (1935), la fermentación de glucosa a ácido láctico se ajusta al siguiente esquema:



El acetaldehido y el ácido pirúvico son cuerpos intermedios de importancia. La adición de ácido pirúvico a un medio de fermentación se traduce en la formación de cantidades equimoleculares de ácido acético, ácido láctico y dióxido de carbono:



FERMENTACIÓN ACÉTICA O DEL VINAGRE

El vinagre es un producto de la oxidación de líquidos alcohólicos por ciertas bacterias que los convierten sobre todo en ácido acético.

Para la fabricación de vinagre sirve cualquier líquido alcohólico. La fermentación alcohólica del zumo de manzanas mediante levaduras proporciona sidra, que, fermentada a su vez por bacterias específicas, se reduce a ácido acético y da un producto conocido por vinagre de sidra. La oxidación de los vinos produce vinagre de vino. La fermentación alcohólica de una infusión de malta de cebada, seguida de fermentación acética, da vinagre de malta. El vinagre de azúcar es el resultado de la fermentación alcohólica de azúcar seguida de oxidación del líquido alcohólico, que se transforma en ácido acético. Vemos, pues, que el producto final se designa de acuerdo con la materia prima empleada para su obtención. Todos los vinagres se diluyen, si hace falta, de modo que contengan un 4 % de ácido acético.

Cuando se expone al aire libre un líquido alcohólico, no tarda en aparecer una película en su superficie; al mismo tiempo, se vuelve agrio, por oxidarse el alcohol a ácido acético. La película se compone de una substancia gelatinosa o zooglea, en la que están incluídas numerosas bacterias; generalmente se conoce por «madre del vinagre», pues una pequeña porción de ella sirve para iniciar el mismo proceso si se añade a más líquido alcohólico.

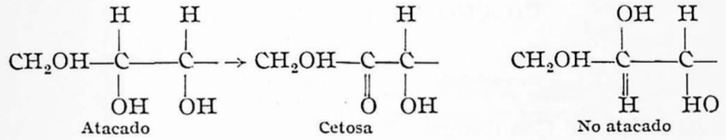
Las bacterias específicas contenidas en la zooglea pertenecen al género *Acetobacter*, y son las bacterias acéticas, que necesitan para su desarrollo abundante oxígeno; por eso se limita su actividad a la superficie de líquidos alcohólicos.

Acetobacter. Las células de estas bacterias son elipsoideas o largas y bacilares, sueltas o reunidas por parejas o en cadenas, y se mueven con ayuda de flagelos polares, o son inmóviles. Las formas de involución pueden ser esféricas, alargadas, filamentosas, mazudas, abultadas, curvas, o incluso ramificadas. Las jóvenes son gramnegativas, y las adultos suelen responder al gram de modo variable. Son gérmenes aerobios estrictos; generalmente dan reacción muy fuerte de catalasa, a veces sólo débil. Muchas especies, después de haber convertido el alcohol en ácido acético, son capaces de atacar este último y desdoblarlo en dióxido de carbono y agua, completando así el ciclo del carbono. Los productos corrientes de oxidación comprenden ácido acético a partir de alcohol etílico; ácido glucónico, y algunas veces ácido cetoglucónico, a partir de glucosa; dihidroxiacetona, de la glicerina; sorbosa, del sorbitol, etc. En general, se desarrollan mejor en medios de infusión o de autolisado de levadura, con algo de alcohol etílico u otro substrato oxidable. Estas bacterias están ampliamente difundidas en la Naturaleza, y abundan

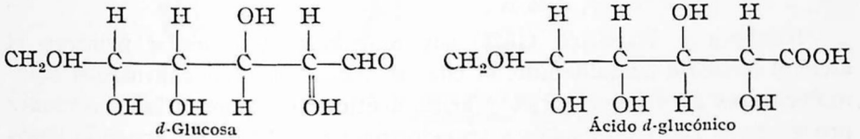
particularmente en materias vegetales sometidas a fermentación alcohólica; tienen importancia para el hombre por su intervención en el ciclo del carbono y en la producción de vinagre.

Véase más información en Frateur (1950) y Shimwell (1948).

Las bacterias acéticas pueden oxidar otros alcoholes primarios y aldehidos, y convertirlos en ácidos carboxílicos, así como alcoholes secundarios en cetonas. Bertrand (1904) descubrió que el *Acetobacter xylinum* (bacilo de la sorbosa) era capaz de oxidar un grupo alcohólico secundario de sorbita y formar la correspondiente cetosa o sorbosa, y observó que el germen oxidaba unos alcoholes y no atacaba otros. Estudiando cuidadosamente estos resultados, dedujo que sólo ataca grupos alcohólicos secundarios; que el grupo oxidado ha de hallarse en el segundo átomo de carbono, y que los grupos (OH) de los átomos de C segundo y tercero han de estar adyacentes entre sí para que se produzca la oxidación:



Hermann y Neuschul (1931) observaron una excepción a la regla anterior: el grupo aldehídico de la *d*-glucosa se convierte por oxidación en carboxílico para dar ácido *d*-glucónico, aun no estando contiguos entre sí los grupos OH de los átomos de carbono segundo y tercero:

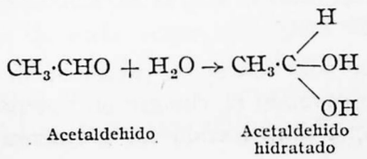


Oxidación aeróbica de alcohol. La oxidación aeróbica de alcohol, que lo convierte en ácido acético, se desarrolla, al parecer, según este esquema:

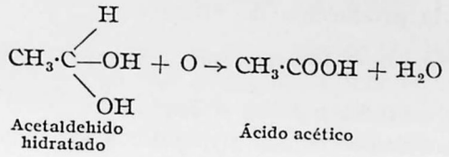
1. El oxígeno actúa como receptor de hidrógeno, y convierte el alcohol en acetaldehido:

$$\underset{\text{Alcohol}}{CH_3{\cdot}CH_2OH} + O \rightarrow \underset{\text{Acetaldehido}}{CH_3{\cdot}CHO} + H_2O$$

2. El acetaldehido se hidrata:

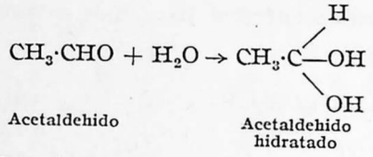


3. El oxígeno fija dos átomos de hidrógeno del hidrato de aldehido, para dar ácido acético:

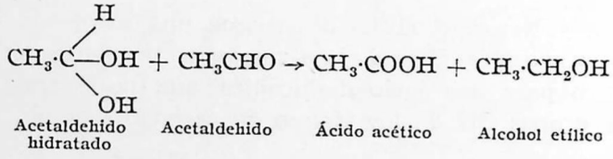


Oxidación anaeróbica de alcohol. En ausencia de oxígeno, una molécula de acetaldehido puede actuar como receptor de hidrógeno frente a una segunda molécula hidratada de acetaldehido. Así se forma una molécula de ácido acético y otra de alcohol etílico, a expensas de dos moléculas de acetaldehido.

1. Hidratación del acetaldehido:



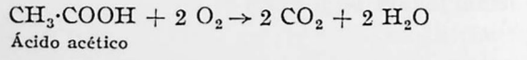
2. Reacción de Cannizzaro:



Neuberg y Windisch (1925) suponían que se oxidaba primero el alcohol etílico a acetaldehido, el cual se transforma en cantidades equimoleculares de alcohol etílico y ácido acético, conforme a las reacciones precedentes. Las oxidaciones y transformaciones siguen alternando hasta que todo el alcohol etílico se convierte en ácido acético.

En la solución final, el ácido acético se diluye al 4 % para obtener vinagre comercial. Además del ácido acético, indicios de ésteres producidos asimismo en la fermentación originan principalmente el olor y el sabor característicos del vinagre.

El vinagre puede perder fuerza con el tiempo; esto se debe a que el ácido acético, por oxidación, se desdobla en dióxido de carbono y agua por la actividad de algunas especies de *Aerobacter:*



Esta reacción, que sólo ocurre en presencia de abundante oxígeno, se puede impedir conservando el vinagre en botellas bien llenas y herméticamente tapadas, o destruyendo los gérmenes por pasteurización.

Métodos de fabricación. Para fabricar vinagre se emplean dos métodos generales: el de Orleáns y el rápido:

Método de Orleáns. Es el más antiguo de los conocidos. Se perforan barriles o tinas cerca de su tapa, para que pueda penetrar libremente aire, y se llenan hasta 2/3 aproximadamente con una mezcla de 2 partes de vinagre y 3 partes de vino; éste puede ser natural o pasteurizado,

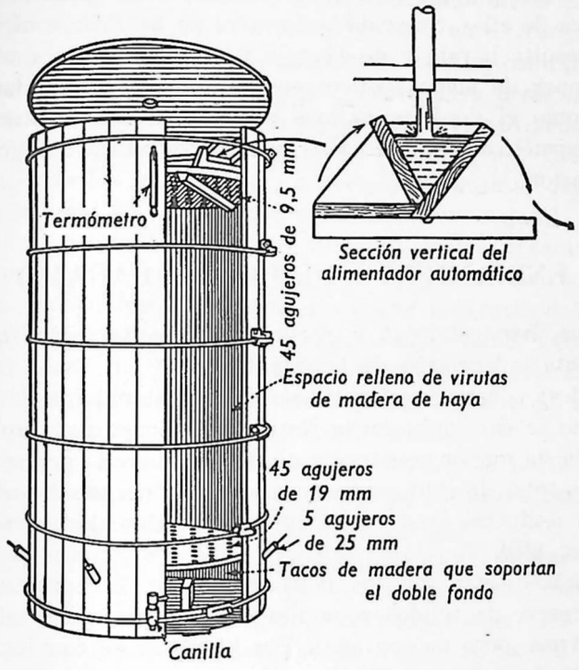


Fig. 154. — Generador utilizado en el método rápido de fabricación de vinagre. (De Prescott y Dunn, «Industrial Microbiology».)

y se prefiere lo último porque así se reduce mucho la proporción de fermentaciones anormales. Las bacterias acéticas medran mejor en un medio fuertemente ácido; por eso se añade vinagre al vino para acelerar la reacción, y al mismo tiempo para impedir el desarrollo de gérmenes nocivos. A intervalos determinados se va sacando el vinagre, que se reemplaza con vino nuevo; así resulta continuo el proceso.

Método rápido. Este método se basa en el empleo de grandes depósitos o generadores de madera con fondo perforado, por donde penetra aire (fig. 154). Los depósitos se llenan de virutas de madera de haya, carbón vegetal, tusas de maíz, coque, etc., para aumentar la superficie y airear mejor el líquido alcohólico. El relleno se empapa primero con un cultivo de bacterias acéticas, y el líquido alcohólico (que contiene 10 a 13 % de alcohol) se rocía por arriba y se deja escurrir sobre la

superficie del material. Mientras el líquido llega al fondo del depósito, el alcohol se convierte por oxidación en ácido acético, por obra de los microorganismos presentes en el relleno; la temperatura se mantiene a 35-38° C. Terminado el proceso, el vinagre se extrae por el fondo del depósito. Un generador de 3 m de diámetro por 6 de altura puede producir 300 a 400 litros diarios de vinagre.

Para fabricar vinagre se utilizan muchas modificaciones del aparato descrito. Una de ellas, conocida por generador de Frings, ofrece muchas ventajas: resulta barato y de sencillo manejo, y produce vinagres con concentraciones de ácido acético mayores que las obtenidas por otros métodos. Como el depósito es más pequeño, ocupa menos espacio, y, por estar herméticamente cerrado, evita pérdidas de vinagre o alcohol por evaporación.

ENRIAMIENTO DE LINO Y CÁÑAMO

Celulosas, hemicelulosas y pectinas son polisacáridos que forman conjuntamente la armazón de las plantas.

La celulosa constituye el polisacárido más abundante de las paredes celulares que se encuentra en la Naturaleza. Constituye probablemente la substancia de mayor resistencia química elaborada por células vivas. La hidrólisis total de celulosa pura con ácidos inorgánicos concentrados proporciona *d*-glucosa casi en su integridad, como único azúcar componente (pág. 660).

Las hemicelulosas son los polisacáridos de la pared celular que pueden extraerse de tejidos vegetales, tratándolos con álcalis diluídos, calientes o fríos, pero no con agua. Por hidrólisis se convierten en azúcar y ácidos de azúcares (*d*-xilosa, *d*-galactosa, *l*-arabinosa, *d*-glucosa y ácidos urónicos), mediante ebullición con ácidos minerales diluídos.

Las pectinas o substancias pécticas comprenden los derivados coloidales complejos de carbohidratos contenidos en las plantas o preparados de ellas, y contienen una gran proporción de unidades de ácido anhidrogalacturónico, que se suponen existentes en una combinación a modo de cadena. Los grupos carboxílicos de ácidos poligalacturónicos pueden esterificarse en parte mediante grupos metilo, y neutralizarse parcial o totalmente con ayuda de una o más bases. Representan siempre mezclas de ácidos poligalacturónicos con un número variable de unidades asociadas. Con excepción del ácido péptico, pueden contener también proporciones distintas de grupos metiléster en los diversos ácidos poligalacturónicos, irregularmente distribuído en ellos. Las sales ácidas, por su parte, contienen a veces polímeros con diferentes proporciones de iones metálicos.

Las substancias pécticas son compuestos de consistencia gelatinosa

que forman la lámina intermedia de las células vegetales, y sirven de cemento para unir las células entre sí. Su hidrólisis bacteriana es de gran importancia para enriar o macerar lino y cáñamo, lo cual puede hacerse por métodos anaeróbicos y aeróbicos.

Enriamiento anaeróbico. Para enriar se sumergen en agua los tallos de lino o cáñamo, sujetándolos con pesas. Los tejidos absorben agua, se hinchan y de este modo se extraen substancias hidrosolubles, que constituyen un 12 % de su peso y consisten en azúcares, glucósidos, taninos, compuestos nitrogenados solubles y materia colorante. El agua, fuertemente colorada, es un excelente medio para desarrollar muchas clases de microorganismos, de los cuales los aerobios reducen la concentración del oxígeno disuelto y crean un ambiente compatible con la vegetación de los anaerobios. La pectina sufre una lenta fermentación por parte de los anaerobios, y se disuelve, dejando intactas las fibras, a la vez que se producen diversos ácidos orgánicos y gases, principalmente ácidos acético y butírico, dióxido de carbono e hidrógeno. Se necesitan unos diez días para que la reacción se complete. Entonces debe sacarse del agua el lino o el cáñamo, para que no se macere demasiado. La hilaza se lava bien, para quitarle ácidos, olores y otras substancias indeseables, y se extiende al sol o al aire para secarla; una vez seco, el material se puede agramar.

El microorganismo que hidroliza y fermenta la pectina es el *Clostridium butyricum*, cepa de la misma especie empleada para la fermentación butírica (pág. 428).

Mejoras recientes del procedimiento prescriben el uso del microorganismo anaerobio *C. felsineum*, bacilo grande, móvil, esporíparo, que se encuentra suelto, en parejas y en cadenas cortas; las esporas son ovales, subterminales, y producen abultamiento de los bacilos. Las células son grampositivas, y se vuelven gramnegativas.

Al agua de la tina de enriar se agrega un cultivo del germen a razón de 1.000 ml por 10.000 g de tejidos secos; la tina se mantiene a una temperatura de 37 a 38° C durante 50 a 75 horas. El procedimiento requiere una vigilancia más estrecha que el método anterior.

Enriamiento aeróbico. También se emplea un método aeróbico que se conoce por enriamiento al rocío o pastoral. En otoño se esparcen sobre el terreno los tallos, y se dejan allí durante los meses invernales. El inconveniente principal del método está en su lentitud, pues dura meses en lugar de días. Las transformaciones son principalmente obra del moho *Mucor stolonifer*, si bien es indudable que también participan otros mohos y bacterias en la reacción.

Para más información véanse Joslyn y Phaff (1947), Phaff y Joslyn (1947), Pigman y Goepp (1948), Prescott y Dunn (1949).

FERMENTACIÓN DE ENSILAJES

El ensilaje proporciona un método bastante sencillo de conservar piensos o forraje con destino al ganado. Cualquier cosecha forrajera se presta al ensilaje, siempre que contenga azúcar suficiente para proporcionar la cantidad de ácido que requiere su conservación.

Las plantas se cortan en trocitos y se almacenan en silos; la hierba cortada debe contener suficiente humedad, y en otro caso, se añadirá agua. Como los vegetales contienen ya los gérmenes necesarios, no hace falta sembrar éstos; por recuentos efectuados se sabe que normalmente existen 10.000 a 400 millones de bacterias por gramo de tejidos vegetales.

Por haber carbohidratos en la savia de las plantas, los cambios que se operan son más bien fermentativos que putrefactivos. En pocas horas, los microorganismos aerobios consumen el oxígeno libre del silo, y en las transformaciones que siguen predomina el carácter anaeróbico. Al cabo de unas 48 a 72 horas, un 70 a 80 % del gas encerrado en el silo es dióxido de carbono. Durante la fermentación se desarrolla un calor considerable. Cuando la fermentación es activa, cada gramo de producto ensilado puede contener hasta 2.000 millones de gérmenes, y por cada mililitro de zumo se cuentan a veces hasta 4.000 millones de bacterias. La fermentación dura aproximadamente un mes, y en ella intervienen ciertos estreptococos y bacilos lácticos. Los microbios producen principalmente ácido láctico, ácido butírico, ácido propiónico y pequeñas porciones de alcohol. Las cantidades y proporciones respectivas varían según las clases de plantas ensiladas.

La savia de las plantas debe contener suficientes carbohidratos fermentables para dar un pH final de 5,3 ó menos, a fin de evitar que se descomponga el material ensilado. Los animales pueden consumir entonces el forraje ácido durante los meses de invierno. Si la proporción de carbohidratos de la savia no basta para hacer bajar el pH final a 5,3 por lo menos, las transformaciones pueden ser putrefactivas y no fermentativas; los ensilajes preparados en tales condiciones no sirven para alimentar al ganado, y si los consumen las vacas, pueden comunicar a la leche olor y sabor desagradables.

Véase más información en Orla-Jensen, Orla-Jensen y Snog-Kjaer (1948), Salsbury, Mather y Bender (1949), y Thomas (1950).

FERMENTACIÓN DEL TABACO

El tabaco se cura y fermenta a fin de mejorar su color, textura y aroma. Este tratamiento reduce considerablemente la proporción de nicotina.

Curación. Las hojas de tabaco se recolectan, se atan en manojos y se sujetan a varas. Según Evers (1947), se emplean cuatro métodos para curarlas: al sol, al aire, al fuego y mediante tubos de humos.

Para curarlas al sol, las hojas se desecan durante unos días, y luego se exponen a la luz solar hasta que pierden toda su humedad. Esto requiere aproximadamente un mes, y se aplica sobre todo a tabacos turcos.

El tabaco se cura al aire colgándolo en graneros, donde se somete a una curación natural en condiciones atmosféricas, por espacio de unos dos meses; se emplea este método con tabacos finos y claros, y con los destinados a elaborar cigarros puros.

Cuando se emplea el fuego, el tabaco se cuelga en graneros, y se encienden hogueras que se alimentan a intervalos durante unas tres semanas. El humo y el calor comunican al tabaco un aroma peculiar, que se advierte en muchas calidades negras para pipa.

Con los tubos de humos se utilizan graneros especiales, y el ritmo de curación se regula mediante fuego artificial producido en hornillos construídos en una pared exterior del recinto. El calor se distribuye mediante tubos que atraviesan el piso del granero, para que el humo no contamine al tabaco. La curación tarda pocos días, y comprende tres fases: amarilleo de la hoja, entre 25 y 45° C; fijación del color, entre 45 y 50° C; desecación del tallo, entre 50 y 75° C. Generalmente se cura así el tabaco para cigarrillos. La temperatura debe elevarse poco a poco, y la humedad relativa ha de disminuir lentamente, hasta alcanzar la fase de desecación.

Mecanismo de la curación. Las hojas de tabaco no se curan normalmente si antes se han sometido a desecación rápida. Las células de las hojas verdes permanecen vivas durante la fase de amarilleo, y los procesos de respiración y transferencia continúan a medida que la hoja se agota lentamente; entre tanto, el alimento de reserva del vegetal, principalmente carbohidratos insolubles y las proteínas, se consume poco a poco, mientras que la clorofila se altera al volverse amarilla la hoja. Los carbohidratos insolubles y las proteínas se convierten por hidrólisis en azúcares reductores y aminoácidos, respectivamente. Al proseguir la acción, los azúcares reductores pueden desaparecer al final, y los aminoácidos se desaminan, con desprendimiento de amoníaco. Estos cambios hidrolíticos y oxidativos se suceden rápidamente en la fase de amarilleo, y van desapareciendo por grados al morir las células.

En opinión de Evers, en tales transformaciones desempeñan un papel importante ciertas enzimas; se cree que las oxidantes son causa de los cambios de color que experimenta la hoja mientras se cura. Cuando la curación transcurre normalmente, las bacterias y otros microorganismos apenas participan en el proceso; en otro caso, es posible el desarrollo de bacterias y mohos.

Fermentación. Después de curado, el tabaco se somete a varios grados de fermentación, según la clase de hojas.

Las hojas curadas se humedecen con agua, se alojan en recipientes, a presión, se almacenan en locales calentados a unos 45° C y 60 % poco más o menos de humedad relativa, y se dejan fermentar o «sudar». Generalmente se conviene en que el proceso es de oxidación y se caracteriza sobre todo por la producción de calor (hasta 60° C) y el desprendimiento de dióxido de carbono, amoníaco y otras substancias volátiles. El almacenamiento de tabaco en los locales calentados se interrumpe periódicamente, ahuecando y aireando las hojas cuando el aumento espontáneo de temperatura, por efecto de la fermentación, alcanza su máximo. Un tabaco de fácil fermentación necesita sólo una o dos pausas; otros más refractarios o crudos requieren diez a doce aireaciones.

Al final de la fermentación, las hojas han perdido su fuerte olor primitivo, para adquirir otro aromático, en parte amoniacal, y el color ha tomado un matiz algo más obscuro. Las superficies no presentan ya el aspecto lustroso primitivo, ni siguen siendo pegajosas y la textura aparece mucho más delicada y quebradiza. También puede disminuir bastante la proporción de nicotina (6 a 94 %). Al encenderlas, las hojas bien fermentadas despiden un olor aromático, no picante como el del humo de hojas de tabaco sin fermentar.

Intervención de los microbios en la preparación del tabaco. Investigaciones más recientes apoyan la posibilidad de que en la curación y fermentación del tabaco desempeñen algunos microorganismos un papel subsidiario, si no esencial.

Reid, McKinstry y Haley (1938 *a*, *b*) creían que los cambios principales provenían de la actividad de ciertas bacterias que suelen desarrollarse en crecido número durante el proceso de fermentación, y que el papel de las enzimas de las hojas era sólo subordinado. Las formas que predominan en las hojas curadas parecen ser bacterias del grupo del *Bacillus megatherium* y mohos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Una fermentación satisfactoria acarrea un rápido aumento del número de gérmenes de los tipos *Micrococcus candidans* y *Bacillus subtilis*; pero los tipos predominantes referidos apenas intervienen en tal fermentación. Durante las primeras fases de la fermentación desaparecen hongos viables, y las bacterias del grupo del *B. megatherium* no muestran un gran aumento en número en el curso de tal proceso. En ocasiones se han visto en el tabaco fermentado algunas especies de *Clostridium* que hidrolizan celulosa, y que suelen ocasionar la putrefacción que se presenta a veces durante la fermentación.

Se encuentran otros datos de interés en Frankenburg (1947, 1948), Frankenburg y Gottscho (1952), Jensen (1948), Vickery y Meiss (1953).

FERMENTACIONES POR BACTERIAS COLIFORMES

Miembros del grupo *coli* y otras especies afines fermentan glucosa y otros carbohidratos, y producen principalmente ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, ácido láctico, alcohol etílico, acetilmetilcarbinol (acetoína), 2,3-butilenglicol (2,3-butandiol), dióxido de carbono e hidrógeno. Estos microorganismos ocasionan probablemente los tipos más comunes de fermentaciones bacterianas.

Los productos resultantes de la fermentación de glucosa por *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes* se resumen en la tabla 27.

TABLA 27. — FERMENTACIÓN DE GLUCOSA POR *Escheriquia coli* Y *Aerobacter aerogenes* Y COMPUESTOS RESULTANTES

E. coli	A. aerogenes
Ácido fórmico	Ácido fórmico
Ácido acético	Ácido acético
Ácido láctico	Ácido láctico
Ácido succínico	Ácido succínico
Alcohol etílico	Alcohol etílico.
Dióxido de carbono	Dióxido de carbono
Hidrógeno	Acetilmetilcarbinol (acetoína).
	2,3-butilenglicol (2,3-butandiol)

En el caso de la *E. coli*, los compuestos contienen un 99 % del carbono de la glucosa fermentada. Un análisis similar del mismo medio fermentado por el *A. aerogenes* no arroja una proporción tan alta; la discrepancia proviene de que este germen produce acetoína y 2,3-butandiol, y no lo hace la *E. coli*.

La producción de acetoína y 2,3-butandiol no es característica del *A. aerogenes* solamente; también los pueden producir algunas otras bacterias y levaduras (pág. 608). Como el 2,3-butandiol contiene dos átomos de carbono asimétricos, existe en tres formas isoméricas: *d*-2,3- *l*-2,3- y meso-2,3-butandiol.

El mecanismo de la formación de acetoína y 2,3-butandiol no se comprende bien. Ambos compuestos suelen acompañarse en cultivos de fermentación. Hay quien supone que primero se forma acetoína, y que una parte de ella se reduce luego a 2,3-butandiol; otros opinan que se produce éste antes, y una porción se convierte, por oxidación, en acetoína. Stanhly y Werkman (1942), en sus estudios acerca de la

fermentación de glucosa por *Aerobacillus polymyxa,* sugieren que la acetoína y el 2,3-butandiol constituyen un sistema reversible de oxidación-reducción (redox). Un potencial bajo de oxidación-reducción parece favorecer la acumulación del segundo, y un potencial elevado, la de acetoína. Freeman (1947) llega a conclusiones similares: ha comprobado que, en condiciones anaeróbicas, el *A. aerogenes* no produce acetoína en un medio de sacarosa, mientras que en condiciones aeróbicas (por aireación del medio), los microorganismos la producen en cantidades considerables.

Importancia del 2,3-butandiol. La producción de 2,3-butandiol por bacterias fué observada primero por Harden y Walpole (1906). Sin embargo, este cuerpo no despertó gran atención hasta la segunda guerra mundial, cuando se demostró que el producto podía emplearse como precursor del butadieno, punto de partida de la síntesis del caucho. Desde entonces son numerosos los trabajos publicados acerca de la síntesis del 2,3-butandiol por microorganismos.

Los microbios utilizados con este objeto comprenden el *Aerobacillus polymyxa,* bastoncillo grande, móvil, esporíparo, que se encuentra suelto o en cadenas cortas, y es variable frente al gram; algunas especies de *Serratia,* bacilos móviles pequeños, aerobios, que se licuan fácilmente, reducen nitratos, son negativos al gram y producen pigmentos rojos característicos; y el *Aerobacter aerogenes,* bacilos pequeños sueltos, a menudo encapsulados, generalmente inmóviles y gram-negativos.

Véase más información en Adams y Stanier (1945), Blackwood y otros (1949), Fulmer, Underkofler y Bantz (1943), Katznelson (1947), Moat y Lichstein (1953), Neish y otros (1947, 1948), Stanier y Fratkin (1944), Stokes (1949), Underkofler y Fulmer (1948), Underkofler, Fulmer, Bantz y Kooi (1944), Wheat y otros (1948).

FERMENTACIONES GENERALES DE CARBOHIDRATOS

Es corriente añadir a medios de cultivo carbohidratos y compuestos de naturaleza análoga, con dos fines importantes: servir de fuentes de energía directamente disponibles, y ayudar en la identificación y clasificación de bacterias.

Los carbohidratos se pueden aprovechar más fácilmente que las proteínas como fuentes de energía. Esto significa que el ritmo de multiplicación de un microorganismo suele aumentar en presencia de un carbohidrato fermentable.

Es muy variable la capacidad de los microbios para fermentar diversos carbohidratos. Algunas bacterias pueden atacar uno o más carbohidratos y producir ácido y gases; otros sirven para originar ácido, pero no gases, y hay algunos que no fermentan ningún carbohidrato

(figura 155). Tales hechos son de considerable utilidad para identificar microorganismos.

No se comprende bien por qué un microorganismo fermenta una aldosa y no otra de igual fórmula empírica. Los azúcares difieren sólo por la disposición de los átomos de H y los grupos OH en torno a átomos de carbono. No existe método alguno para determinar de antemano si un germen particular es capaz de fermentar un carbohidrato dado; para ello es indispensable efectuar la prueba.

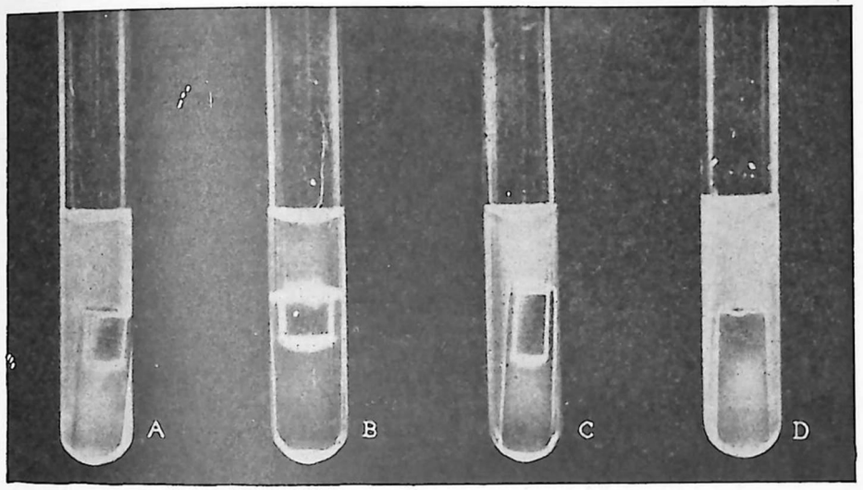


Fig. 155. — Fermentación de carbohidratos. *A*, glucosa; *B*, lactosa; *C*, sacarosa, todas inoculadas con *Escherichia communior*: se producen ácido y gases. *D*, sacarosa inoculada con *E. coli*: no hay producción de ácido ni de gases.

Sternfeld y Saunders (1937) dedujeron de sus estudios que cualquier modificación de estructura de las aldosas se traducía en una frecuencia menor de fermentación de sus derivados. Robbins y Lewis (1940), en sus estudios sobre reacciones de fermentación de un crecido número de gérmenes, formulan las mismas conclusiones generales. Descubrieron que los ácidos *d*-glucónico, *d*-manónico y *d*-galactónico, así como la *d*-sorbita, la *d*- manita y la dulcita, son fermentadas por menos microorganismos que las aldosas correspondientes. De manera análoga, los ácidos dicarboxílicos múcico y *d*-sacárido eran atacados con menos frecuencia que los monocarboxílicos *d*-galactónico y *d*-glucónico. Similares resultados obtuvieron Georgi y Ettinger (1941) en sus estudios sobre varias especies de *Rhizobium.*

En general, la fermentación se hace menos frecuente al aumentar la complejidad de la molécula. Esto significa que los disacáridos se fermentan menos a menudo que los monosacáridos; los trisacáridos

menos todavía, y con mínima frecuencia los polisacáridos. Cuando haya que realizar ensayos sobre la disponibilidad de carbohidratos para microorganismos, hay que comenzar siempre por los monosacáridos, especialmente por la glucosa. Por regla general, si un germen fermenta algún carbohidrato, lo más probable es que sea la glucosa. Si ésta es atacada, deberán probarse otros monosacáridos antes de pasar a carbohidratos más complejos.

Fermentación directa de disacáridos. La fermentación bacteriana de un disacárido (maltosa, lactosa, sacarosa, celobiosa, etc.), sin la de sus componentes monosacáridos, ha sido objeto de comunicaciones por parte de varios investigadores. Snell, Kitay y Hoff-Jorgensen (1948) han informado acerca de una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* que utilizaba lactosa, pero no glucosa ni galactosa. Pelczar y Doetsch (1949) han aislado varias cepas de Neisseria que fermentaban maltosa, con producción de ácidos, y no atacaban la glucosa. Tales observaciones no están de acuerdo con la tesis generalmente aceptada de fermentación indirecta, que presupone una hidrólisis del disacárido a los monosacáridos que lo constituyen, antes de poderlo utilizar.

Véase más información en Hestrin (1948, 1949).

ALGUNAS REACCIONES CORRIENTES DE FERMENTACIÓN PARA IDENTIFICAR BACTERIAS

La capacidad de un microorganismo para fermentar un determinado carbohidrato se puede determinar incorporando la substancia con un indicador adecuado a un medio líquido o sólido. Se reconoce la producción de gas colocando una ampolleta invertida en el medio para recoger el que se desprenda.

Importancia de componentes nutritivos exentos de carbohidratos. Vera (1950) ha señalado la diversidad de composición de las peptonas, el extracto de carne de vaca y el extracto de levadura.

Al seleccionar peptonas y otros ingredientes de medios de cultivo para estudios sobre fermentación, debe tenerse en cuenta si hay o no en ellos materia fermentable. Existe ésta en la mayoría de las peptonas bacteriológicas, incluyendo autolisados de levadura, y en extracto de carne, en cantidad suficiente para dar ocasión a resultados positivos falsos y contribuir en gran medida a inexactitudes. Las pruebas corrientes de fermentación para identificar microorganismos se efectuarán con precisión empleando como substratos básicos materiales en que se haya comprobado la ausencia de componentes fermentables.

Medios carbohidratados con tornasol. El tornasol es un colorante débil y se emplea sólo como indicador. Como no sirve para descubrir cambios mínimos de acidez o alcalinidad, desde hace tiempo se sustituye por los indicadores de sulfonftaleína, más sensibles y brillantes.

El tornasol tiene sobre los indicadores modernos la ventaja de ser sensible a la decoloración por gérmenes. Funciona como un sistema de oxidación-reducción; admite hidrógeno, y se reduce a la forma incolora. La decoloración del indicador se advierte primero en el fondo del tubo o cerca del fondo, donde se ha agotado ya el oxígeno disuelto. En la capa superficial de medios expuestos al aire, el tornasol no se decolora casi nunca por completo, porque el hidrógeno se traslada al oxígeno y no al indicador.

Si un tubo de agar carbohidratado se inocula por picadura profunda, la fermentación separa el agar mediante el gas desprendido; a veces, el agar se divide en discos separados por capas gaseosas intermedias (fig. 156). En ciertas condiciones, la presión del gas puede bastar para expulsar del tubo algunos de los discos de agar con el obturador de algodón.

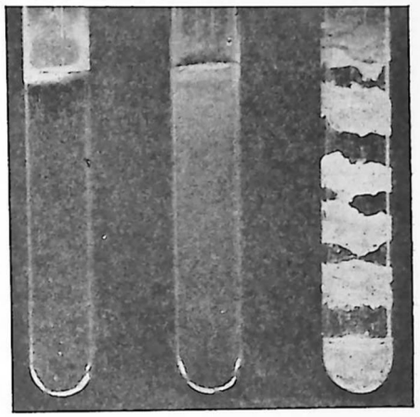


Fig. 156. — Acción microbiana sobre agar-lactosa con tornasol. Izquierda, *Bacillus subtilis*; centro, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*; derecha, *Escherichia coli*. Ninguno de los dos primeros produce ácido ni gases; el *E. coli* los produce, y el agar se separa en anillos, al mismo tiempo que se decolora el tornasol.

Medios carbohidratados con púrpura de bromocresol. El poder fermentativo de un microbio puede determinarse muy fácilmente sembrando en estrías un asa del cultivo sobre la superficie de un medio de agar nutritivo que contenga carbohidrato y un indicador. Al fermentar el carbohidrato, aumenta la concentración de hidrogeniones del agar, lo cual se manifiesta por un cambio de color del indicador (fig. 157).

Si en la placa aparecen sólo unas pocas colonias bien aisladas, la producción de ácido permanece limitada a la inmediata proximidad de cada

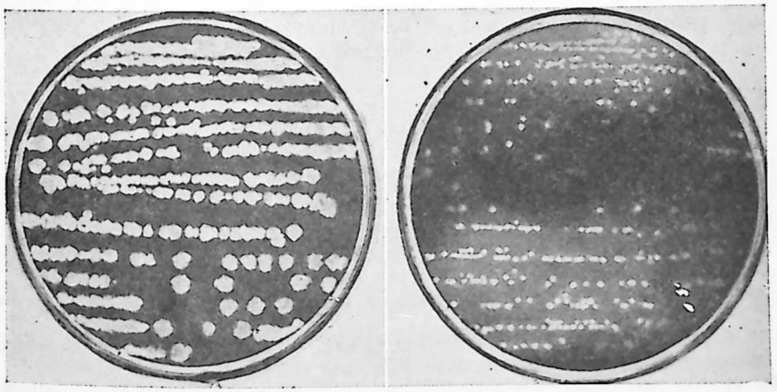


Fig. 157. — Agar-lactosa con púrpura de bromocresol. Izquierda, placa inoculada en estría con un cultivo de *Bacillus subtilis*, que no ha producido cambio visible de color del agar en 24 horas. Derecha, placas con estrías de un cultivo de *Escherichia coli*, que ha producido abundante ácido en 24 horas, y cambiado así el color del agar de púrpura a amarillo.

colonia, sin afectar al agar exento de colonias. El contraste de colores de las zonas ácidas y las alcalinas o neutras se hace muy notable.

En presencia de un cultivo mixto, compuesto de dos microorganismos, uno solo de los cuales puede fermentar el carbohidrato, es posible aislar colonias de dos clases, siempre que se diluya bien el cultivo antes de sembrar las estrías del cultivo, y a condición de que el número de bacterias de cada especie o raza sea aproximadamente igual.

En medios carbohidratados se usa con frecuencia como indicador púrpura de bromocresol, especialmente valioso para trabajos bacteriológicos por sus colores brillantes a distintas concentraciones de iones hidrógeno y su resistencia a la decoloración por bacterias. Este indicador es sensible a un pH comprendido entre 5, 2 y 6, 8, con color amarillo en el límite inferior y púrpura en el superior. El valor pK, o sea el punto en que el colorante se disocia en 50 %, corresponde a un pH de 6,3. Su escala de pH lo hace apropiado para descubrir fermentaciones bacterianas en medios carbohidratados sólidos.

Inversión de la reacción. A veces la reacción ácida en medios carbohidratados se vuelve alcalina, respecto al indicador empleado, si las placas o los tubos se guardan durante varios días. Esto puede explicarse por falta de suficiente carbohidrato, o por convertirse en carbonatos los ácidos orgánicos en virtud de oxidación.

Si un medio contiene carbohidrato en cantidad insuficiente, un microorganismo no podrá alcanzar su concentración límite de hidrogeniones. En tales circunstancias continuará reproduciéndose a expensas de los componentes nitrogenados, tanto en el aspecto estructural como en el energético. Esto se traduce en la producción de substancias alcalinas, con la consiguiente inversión de la reacción del medio.

Se invierte a veces la reacción de un medio aun en presencia de carbohidrato en cantidad suficiente para que un microorganismo llegue a su concentración límite de hidrogeniones. Ayers y Rupp (1918) informaron que en estas condiciones se desarrollan simultáneamente reacciones ácidas y alcalinas. Los carbohidratos se convierten primero por fermentación en ácidos orgánicos, y luego, por oxidación, en carbonatos; los carbonatos alcalinos son la causa de que se invierta la reacción del medio. Los cambios alcalinos cesan una vez que todo el carbohidrato se ha convertido en ácido, pero persisten mientras se esté produciendo éste.

REFERENCIAS

Adams, G. A. y R. Stanier: Production and properties of 2,3-butanediol, *Can. J. Research, Sec. B*, 23: 1, 1945.

Ayers, S. H. y P. Rupp: Simultaneous acid and alkaline bacterial fermentations from dextrose and the salts of organic acids, respectively, *J. Infectious Diseases*, 23: 188, 1918.

Barker, H. A.: *Streptococcus allantoicus* and the fermentation of allantoin, *J. Bact.*, 46: 251, 1943.

— y F. Lipmann: The role of phosphate in the metabolism of *Propionibacterium pentosaceum*, *J. Biol. Chem.*, 179: 247, 1949.

—, B. E. Volcani y B. P. Cardon: Tracer experiments on the mechanism of glycine fermentation by *Diplococcus glycinophilus*, *ibid.*, 173: 803, 1948.

— y T. Wiken: The origin of butyric acid in the fermentation of threonine by *Clostridium propionicum*, *Arch. Biochem.*, 17: 149, 1948.

Bertrand, G.: Étude biochimique de la bactérie de sorbose, *Ann. chim. phys.*, 8: 181, 1904.

Blackwood, A. C., J. A. Wheat, J. D. Leslie, G. A. Ledingham y F. J. Simpson: Production and properties of 2,3-butanediol. XXXI. Pilot plant studies on the fermentation of wheat by *Aerobacillus polymyxa*, *Can. J. Research, F*, 27: 199, 1949.

Breed, R. S., E. G. D. Murray y A. P. Hitchens: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1948.

Cardon, B. P.: Amino acid fermentations by anaerobic bacteria, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 267, 1942.

— y H. A. Barker: Two new amino-acid-fermenting bacteria, *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glycinophilus*, *J. Bact.*, 52: 629, 1946.

— y —: Amino acid fermentations by *Clostridium propionicum and Diplococcus glycinophilus*, *Arch. Biochem.*, 12: 165, 1947.

Carson, S. F., J. W. Foster, S. Ruben y H. A. Barker: Radioactive carbon as an indicator of carbon dioxide utilization. V. Studies on the propionic acid bacteria, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 27: 229, 1941.

—, —, — y M. D. Kamen: Radioactive carbon as a tracer in the synthesis of propionic acid from carbon dioxide by the propionic acid bacteria, *Science*, 92: 433, 1940.

— y S. Ruben: CO_2 assimilation by propionic acid bacteria studied by the use of radioactive carbon, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 26: 422, 1940.

Clifton, C. S.: The utilization of amino acids and related compounds by *Clostridium tetani*, *J. Bact.*, 44: 179, 1942.

Delwiche, E. A.: Mechanism of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum*, *J. Bact.*, 56: 811, 1948.

Evers, H. H.: Curing and fermentation of tobacco, *Chemistry & Industry*, 66: 423, 1947.

Frankenburg, W. G.: Studies on the fermentation of cigar leaf tobacco. I. Nature of the fermentation; losses of solids; increase of insoluble solids, *Arch. Biochem.*, 14: 157, 1947.

—: Transformation products of nicotine in fermented tobacco, *Science*, 107: 427, 1948.

— y A. M. Gottscho: Nitrogen compounds in fermented cigar leaves, *Ind. Eng. Chem.*, 44: 301, 1952.

Frateur, J.: Essai sur la systématique des acetobacters, *La Cellule*, 53: 287, 1950.

Freeman, G. G.: The fermentation of sucrose by *Aerobacter aerogenes*, *Biochem. J.*, 41: 389, 1947.

Fulmer, E. I., L. A. Underkofler y A. C. Bantz: The production of acetylmethylcarbinol by the action of *Acetobacter suboxydans* upon 2,3-butylene glycol, *J. Am. Chem. Soc.*, 65: 1425, 1943.

Georgi, C. E. y J. M. Ettinger: Utilization of carbohydrates and sugar acids by the rhizobia, *J. Bact.*, 41: 323, 1941.

Grey, E. C.: The enzymes concerned in the decomposition of glucose and mannitol by *Bacillus coli communis*. Part II. Experiments of short duration with an emulsion of the organism, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Series B, 90: 75, 1919.

Harden, A. y G. S. Walpole: Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* (Escherich) on glucose and mannitol: production of 2,3-butylene glycol and acetylmethylcarbinol, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Series B, 77: 399, 1906.

Hermann, S. y P. Neuschul: Zur Biochemie der Essigbakterien, zugleich ein Vorschlag für eine neue Systematik, *Biochem. Z.*, 233: 119, 1931.

Hestrin, S.: Fermentation of disaccharides. I. Reducing disaccharides and trehalose, *Wallerstein Lab. Commun.*, 11: 193, 1948; II. Sucrose, *ibid.*, 12: 45, 1949.

Istin, M.: L'oxygène et la fermentation alcoolique. Contribution à l'étude de l'aérobiose et de l'anaérobiose, *Rev. can biol.*, 6: 496, 1947.

Jensen, H.: Thermal death points for spores and mycelia of moulds on fermented tobacco, *Physiol. Plantarum*, 1: 255, 1948.

Joslyn, M. A. y H. J. Phaff: Recent advances in the chemistry of pectic substances, *Wallerstein Lab. Commun.*, 10: 39, 1947.

Katznelson, H.: Studies with *Bacillus polymyxa*. V. Potassium as a factor in the production of 2,3-butanediol from starch, *Can. J. Research, C.* 25: 129, 1947.

Kluyver, A. J.: «The Chemical Activities of Microorganisms», Kent, Bickley, England, University of London Press, Ltd., 1931.
Lipmann, F.: Pasteur effect. De «A Symposium on Respiratory Enzymes», Madison, University of Wisconsin Press, 1942.
McDonald, I. J. y W. C. Frazier: Variation in morphology of colonies of lactobacilli, *J. Bact.*, **61**: 627, 1951.
Meyerhof, O.: The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation, *J. Biol. Chem.*, **157**: 105, 1945.
—: Glycolysis of animal tissue extracts compared with the cell-free fermentation of yeast, *Wallerstein Lab. Commun.*, **12**: 255, 1949.
—: Recent advances in the study of metabolic reactions of yeast preparations, *Am. Scientist*, **40**: 482, 1952.
Moat, A. G. y H. C. Lichstein: Factors affecting the formation of acetylmethylcarbinol by *Lactobacillus arabinosus*, *J. Bact.*, **66**: 324, 1953.
Neish, A. C., A. C. Blackwood, F. M. Robertson y G. A. Ledingham: Production and properties of 2,3-butanediol. XVIII. Dissimilation of glucose by *Serratia marcescens*, *Can. J. Research*, B, **25**: 65, 1947; XXV. Dissimilation of glucose by bacteria of the genus *Serratia*, *ibid.*, B, **26**: 335, 1948.
Nelson, M. E. y C. H. Werkman: Dissimilation of glucose by heterofermentative lactic acid bacteria, *J. Bact.*, **30**: 547, 1935.
Neuberg, C. y E. Reinfurth: Natürliche und erzwungene Glycerinbildung bei der alkoholischen Gärung, *Biochem. Z.*, **92**: 234, 1918.
— y F. Windisch: Über die Essiggärung und die chemischen Leistungen der Essigbakterien, *ibid.*, **166**: 454, 1925.
Ochoa, S.: Cocarboxylase. De «The Biological Action of the Vitamins», Chicago, University of Chicago Press, 1942.
Orla-Jensen, S., A. D. Orla-Jensen y A. Snog-Kjaer: Biological researches on the silage process, *Biologiske Skrifter*, **6**: 1, 1948.
Pelczar, M. J. y R. N. Doetsch: On the direct fermentation of maltose, Science, **110**: 256, 1949.
Phaff, H. J. y M. A. Joslyn: The newer knowledge of pectic enzymes, *Wallerstein Lab. Commun.*, **10**: 133, 1947.
Phelps, A. S., M. J. Johnson y W. H. Peterson: CO_2 utilization during the dissimilation of glycerol by the propionic bacteria, *Biochem. J.*, **33**: 726, 1939.
Pickett, M. J.: Studies on the metabolism of *Clostridium tetani*, *J. Biol. Chem.*, **151**: 203, 1943.
Pigman, W. W. y R. M. Goepp, Jr: «Chemistry of the Carbohydrates», Nueva York, Academic Press, Inc., 1948.
Prescott, S. C. y C. G. Dunn: «Industrial Microbiology», Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1949.
Reid, J. J., D. W. McKinstry y D. E. Haley: Studies on the fermentation of tobacco. I. The microflora of cured and fermenting cigar-leaf tobacco, *Penn. Agr. Exp. Sta. Bull.* 356, 1938*a*; II. Microorganisms isolated from cigar-leaf tobacco, *ibid.*, 363, 1938*b*.
Robbins, G. B. y K. H. Lewis: Fermentation of sugar acids by bacteria, *J. Bact.*, **39**: 399, 1940.
Ruben, S., W. Z. Hassid y M. D. Kamen: Radioactive carbon in the study of photosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**: 661, 1939.
Salsbury, R. L., R. E. Mather y C. B. Bender: Various carbohydrates as energy sources for some mixed cultures of silage organisms, *J. Dairy Sc.*, **32**: 901, 1949.
Shimwell, J. L.: Brewing bacteriology. IV. The acetic acid bacteria, Wallerstein *Lab. Comm.*, **11**: 27, 1948.
Skinner, C. E., C. W. Emmo ons y H. M. Tsuchiya: «Molds, Yeasts, and Actinomycetes», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1947.
Snell, E. E.: Nutritional requirements of the lactic acid bacteria, *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**: 81, 1948.
—, E. Kitay y E. Hoff-Jorgensen: Carbohydrate utilization by a strain of *Lactobacillus bulgaricus*, *Arch. Biochem.*, **18**: 495, 1948.

Speakman, H. B.: The biochemistry of acetone formation from sugars by *Bacillus acetoethylicum*, *J. Biol. Chem.*, **64**: 41, 1925.
Stahly, G. L. y C. H. Werkman: Origin and relationship of acetylmethylcarbinol to 2:3-butylene glycol in bacterial fermentations, *Biochem. J.*, **36**: 575, 1942.
Stainer, R. Y. y S. B. Fratkin: Studies on the bacterial oxidation of 2,3-butanediol and related compounds, *Can. J. Research, B.* **22**: 140, 1944.
Stephenson, M.: «Bacterial Metabolism», Nueva York, Longmans, Green & Co., Inc., 1949.
Sternfeld, L. y F. Saunders: The utilization of various sugars and their derivatives by bacteria, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**: 2653, 1937.
Stokes, J. L.: Fermentation of glucose by suspensions of *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **57**: 147, 1949.
Sumner, J. B. y G. F. Somers: «Chemistry and Methods of Enzymes», Nueva York, Academic Press, Inc., 1953.
Thomas, R. C.: Microbiology of silage with special reference to grass-legume mixtures, *Ohio Agr. Exp. Sta., Research Circ.* 2, May, 1950.
Underkofler, L. A. y E. I. Fulmer: The production of 2,3-butylene glycol by fermentation, *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**: 41, 1948.
—, —, A. C. Bantz y E. R. Kooi: The fermentability of the stereoisomeric 2,3-butanediols by *Acetobacter suboxydans*, *Iowa State Coll. J. Sci.*, **18**: 377, 1944.
—, —, R. J. Hickey y T. M. Lees: Production of glycerol by fermentation. I. Fermentation of dextrose, *ibid.*, **26**: 111, 1951.
—, —, T. M. Lees y P. H. Figard: Production of glycerol by fermentation. II. Fermentation of disacharides and starch, *ibid.*, **26**: 135, 1951.
Vera, H. D.: Relation of peptones and other culture media ingredients to the accuracy of fermentation tests, *Am. J. Pub. Health*, **40**: 1267, 1950.
Vickery, H. B. y A. N. Meiss: Chemical investigations of the tobacco plant, *Conn. Agr. Exp. Sta. Bull.* 569, Nueva Haven, 1953.
Wheat, J. A., J. D. Leslie, R. V. Tomkins, H. E. Mitton, D. S. Scott y G. A. Ledingham: Production and properties of 2,3-butanediol. XXVIII. Pilot plant recovery of *l*-2-,3-butanediol from whole wheat mashes fermented by *Aerobacillus polymyxa*, *Can. J. Research, F*, **26**: 469, 1948.
Whiteley, H. R. y H. C. Douglas: The fermentation of purines by *Micrococcus lactilyticus*, *J. Bact.*, **61**: 605, 1951.
Wood, H. G., R. W. Brown, C. H. Werkman y C. G. Stuckwisch: The degradation of heavy-carbon butyric acid from the butyl alcohol fermentation, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**: 1812, 1944.
— y C. H. Werkman: The utilization of CO_2 in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria, *Biochem. J.*, **30**: 48, 1936.
— y —: The utilization of CO_2 by the propionic acid bacteria, *ibid.*, **32**: 1262, 1938.
— y —: The fixation of carbon dioxide by cell suspensions of *Propionibacterium pentosaceum*, *ibid.*, **34**: 7, 1940*a*.
— y —: The relationship of bacterial utilization of CO_2 to succinic acid formation, *ibid.*, **34**: 129, 1940b.
—, R. W. Stone y C. H. Werkman: The intermediate metabolism of the propionic acid bacteria, *ibid.*, **31**: 349, 1937.
—, C. H. Werkman, A. Hemingway y A. O. Nier: Heavy carbon as a tracer in bacterial fixation of carbon dioxide, *J. Biol. Chem.*, **135**: 789, 1940.

CAPÍTULO XVI

DIFERENCIACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS

Para referirse a un microorganismo, es necesario darle nombre, y conviene mucho que el nombre aplicado a cualquiera de ellos por una persona sea comprendido por las demás interesadas.

Se emplean dos clases de nombres: comunes o vulgares, y científicos o internacionales. Los primeros difieren para un mismo organismo en los distintos idiomas, y por ello ocasionan muchas confusiones en Bacteriología; en cambio, los científicos tienen un significado más o menos universal, y por eso es mejor darles la preferencia.

Principios generales de nomenclatura. El método que se sigue para denominar plantas y animales fué introducido por el botánico sueco Carlos de Linneo, y se conoce por sistema binario de nomenclatura. Este se aplica también a las bacterias.

Cada clase distinta de organismos constituye la especie, y a cada especie se asigna un nombre compuesto de dos palabras, la primera para indicar el género, y la segunda para precisar la especie. El nombre del género (escrito siempre con mayúscula) se toma del latín o del griego, o se compone a base de raíces griegas, latinas o excepcionalmente de otras lenguas; puede ser masculino *(Bacillus, Micrococcus, Streptococus)*; femenino *(Eberthella, Sarcina, Pasteurella)*, o neutro *(Bacterium, Clostridium, Corynebacterium)*.

El nombre de especie puede ser: 1.° Un adjetivo, y entonces debe concordar con el nombre del género; por ejemplo: *Sarcina lutea, Bacillus subtilis, Propionibacterium arabinosum.* 2.° Un participio de presente, como en *Pseudomonas fluorescens, Bacillus coagulans, Clostridium perfringens.* 3.° Un nombre en genitivo, que modifica el del género: *Clostridium pruchii, Pseudomonas lindner, Streptococcus lactis, Brucella abortus.* 4.° Un término explicativo, que no necesita concordar con el nombre del género, como *Bacillus lacticola, Pseudomonas salinaria, Bacillus radicicola.*

A veces, una especie se subdivide en variedades, asimismo designadas en latín. Ejemplos de variedades son: *Mycobacterium tuberculosis* var. *Homninis* (bacilo de la tuberculosis humana) y *M. tuberculosis* var. *bovis* (bacilo de la tuberculosis bovina); *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (del pus dorado) y *M. pyogenes var. albus* (del pus blanco).

Principios generales de taxonomía. Puede definirse la palabra taxonomía como clasificación de plantas y animales de acuerdo con sus relaciones y afinidades naturales; se compone de dos raíces griegas: τάξις (disposición, orden) y νομος (ley).

El progreso adecuado de la taxonomía depende de una acertada nomenclatura. Prescindiendo de que los bacteriólogos lleguen o no a ponerse de acuerdo algún día sobre la clasificación exacta aplicable, deben convenir en algunas de las características fundamentales necesarias para el desarrollo de una clasificación bacteriológica satisfactoria.

Especie. Cada clase de plantas o animales se considera como una especie. Este término se define de diversos modos, pero en Bacteriología se toma generalmente como miembro más inferior de un sistema de clasificación; la especie bacteriana ocupa en éste el lugar entre el género y la variedad, pero como las diferencias entre variedades suelen ser difíciles de reconocer, el observador poco experimentado suele concebir las especies como expresión de los grupos más sencillos diferenciables en los reinos vegetal o animal.

El primer ejemplar descrito de una especie constituye el tipo de la misma, y representa en este concepto a todas las especies que se consideran suficientemente análogas para incluirlas en el mismo grupo o género.

El término «cepa» no debe emplearse nunca para significar un carácter biológico, sino más bien como referencia al origen. Un microorganismo normalmente flagelado (móvil) puede aislarse de otro que carezca de flagelos (inmóviles); en este caso, la segunda forma se considerará como una raza o cepa no móvil del primer organismo, pero no como una especie diferente.

Género. Un grupo de especies estrechamente relacionadas constituye el género, situado entre la familia y la especie.

No existen normas fijas respecto a las especies que han de incluirse en un género determinado, y probablemente no existirán jamás; a esto puede atribuirse en gran parte la confusión reinante en cuanto a clasificación de bacterias. Sin embargo, a medida que vayan conociéndose mejor los microorganismos, irá disminuyendo tal confusión y se encontrará un sistema taxonómico más ordenado.

Familia. Los géneros afines o parecidos se agrupan en familias, y éstas se designan por el nombre de uno de ellos seguido del sufijo *-áceas*. Por ejemplo, la palabra *Micrococáceas* resulta de combinar la raíz del género *Micrococcus* con el citado sufijo.

Orden. Varias familias de caracteres análogos componen un orden, el cual se designa substituyendo la desinencia *-áceas* de una de las familias por la terminación *-ales*. Por ejemplo, el nombre del orden *Actino-*

micetales se obtiene combinando la raíz de *Actinomicetáceas* con el sufijo mencionado.

Clase. La agrupación de órdenes similares forma la clase. Hay cinco órdenes de bacterias, todos ellos incluídos en la clase *Esquizomicetos*, u hongos fisíparos.

Diferenciación de bacterias. Se han estudiado y clasificado más de 1.600 especies de bacterias, que probablemente representan sólo una pequeña proporción de las que existen en realidad. Como las bacterias son tan pequeñas y tan poco diferenciadas, es sumamente difícil identificarlas y clasificarlas.

Durante los primeros años de la Bacteriología, los microbios se clasificaban enteramente a base de su morfología; sólo se habían identificado algunas especies, y su clasificación era hasta cierto punto sencilla. Los caracteres morfológicos considerados son: tamaño y forma del microorganismo; disposición de las células; presencia o ausencia de cápsulas bien definidas; presencia o ausencia de esporas; tamaño y forma de éstas y su posición en la célula; presencia, número y disposicion de los flagelos; formas irregulares; presencia o ausencia de corpúsculos metacromáticos característicos; resistencia a los ácidos; reacción de Gram y otros métodos diferenciales de coloración; características de cultivos y colonias, etc. A medida que se han ido conociendo más especies, los problemas de clasificación se han hecho más difíciles cada vez; y hoy sería vano tratar de identificar y clasificar bacterias por simples atributos morfológicos, demasiado escasos para servir de fundamento a una clasificación.

Las plantas superiores se distinguen casi exclusivamente por su morfología. Un árbol puede diferenciarse de otro fácilmente por diferencias de tamaño, forma y color del árbol mismo o de sus hojas, semillas, etc.; pero en las bacterias, los problemas de clasificación son más difíciles, por tratarse de esferas, bastoncillos y espirales relativamente sencillos y pequeñísimos.

Pronto se advirtió que una clasificación basada exclusivamente en la morfología era inadecuada, y que se imponía tomar en consideración otras características. En las modernas clasificaciones se introdujeron, en consecuencia, reacciones fisiológicas; relaciones de temperatura; cromogénesis o producción de pigmento; efecto de un cambio de reacción del ambiente sobre el desarrollo; producción de indol; producción de sulfuro de hidrógeno; relación con el oxígeno; reducción de nitratos a nitritos, e incluso a amoníaco y a nitrógeno finalmente; fermentación de carbohidratos, etc. En la actualidad, las reacciones fisiológicas son probablemente más esenciales que las diferencias morfológicas para clasificar bacterias.

En ocasiones se hace necesario recurrir a la inoculación a animales y a reacciones serológicas para diferenciar microorganismos de aspecto y

reacciones semejantes. Los métodos serológicos se estudian en el capítulo XXV, Infección e inmunidad.

Las bacterias se incluyen en la clase *Esquizomicetos* (hongos fisíparos), que consta de cinco órdenes; las bacterias genuinas pertenecen al orden *Eubacteriales*, y los microorganismos comprendidos en los cuatro órdenes restantes presentan caracteres intermedios entre los de auténticas bacterias y los de plantas o animales superiores.

Finalidad de una clasificación. Una clasificación se propone contribuir a la identificación de un organismo desconocido comparando sus características con las de otro ya descrito. Por desgracia, esto no es posible siempre, pues el germen recién aislado puede no haberse estudiado antes; en tal caso, hay que describir sus particularidades y darle nombre, y publicar los resultados para que lleguen a conocimiento de otros investigadores. Es muy probable que las bacterias estudiadas y descritas hasta ahora constituyan sólo un pequeño número del total de especies existentes.

La clasificación abreviada siguiente ha sido preparada por un Comité nombrado por la Sociedad de Bacteriólogos Americanos. Ese Comité, conocido hoy por «Board of Editor-Trustees», ha contado con la cooperación de unos 65 bacteriólogos interesados en el desarrollo de relaciones sistemáticas entre los diversos grupos de bacterias. La labor del Comité se ha publicado con el título de «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», en honor del Dr. D. H. Bergey, encargado de dar cima a la 1.ª edición del Manual.

Componen el «Boad of Editor-Trustees» de la 6.ª edición del Manual E. G. D. Murray, A. P. Hitchens y R. S. Breed, a quienes el autor está muy reconocido por el permiso de reproducir la clasificación que figura en la misma.

Clase: *Esquizomicetos.* Plantas típicamente unicelulares. Células generalmente pequeñas, a veces ultramicroscópicas, móviles con frecuencia, sin el núcleo definitivamente organizado que se encuentra en las de plantas y animales superiores, aunque en algunos casos se encuentran cuerpos con cromatina que tal vez representen núcleos sencillos. Las distintas células pueden ser esféricas, o bien alargadas en forma de bastoncillos rectos, curvos o espirales, y a veces se reúnen en masas regulares o irregulares, o incluso en quistes. Cuando permanecen unidas entre sí después de la división celular, pueden formar cadenas o verdaderos filamentos, y en este caso se observa, aunque no siempre, cierta diferenciación en células de sostén y en células reproductoras, móviles o no (conidios). Algunas se desarrollan en forma de filamentos micélicos ramificados de diámetro no mayor que el de una célula bacteriana corriente, o sea de 1 micra, poco más o menos. Algunas especies producen pigmentos; las bacterias sulfurosas purpúreas y verdes poseen pigmentos muy similares o afines a las clorofilas verdaderas de plantas superiores, y dotados de propiedades fotosintéticas. En los *Esquizomicetos* no se encuentra la ficocianina que contienen las algas verdeazuladas. La multiplicación es típicamente por división celular; algunas especies de *Eubacteriales* forman endosporas, y hay esporocistos en otras de

las *Mixbacteriales*. En las *Borrelomicetáceas* se han visto cuerpos reproductores ultramicroscópicos. Las bacterias viven libres, o son saprófitas, parásitas o incluso patógenas; estas últimas causan enfermedades en plantas y animales. Se reconocen cinco órdenes.

Clasificación abreviada de bacterias en órdenes, subórdenes, familias, tribus y géneros.

Orden I. *Eubacteriales*. Células rígidas e indiferenciadas, esféricas o bacilares. Los bacilos pueden ser cortos o largos, rectos, curvos o espirales; unos son inmóviles y otros se mueven por medio de flagelos. Las células alargadas se dividen por escisión transversal y pueden permanecer unidas entre sí formando cadenas; las esféricas se dividen por escisión paralela en cadenas, o por escisión alternada, en dos o tres planos, lo que origina tétradas o cubos de 8 y múltiplos de 8. Muchas células esféricas forman masas irregulares, en las que no se distingue el plano de división. En algunas especies hay endosporas; se conocen también especies cromógenas, pero sólo en unas pocas es fotosintético el pigmento (bacterioclorofila u otros semejantes a la clorofila).

Un grupo de bacterias sulfurosas bastante grandes, de forma esférica a bacilar corta, incoloras, que algunos quisieran incluir en el orden *Eubacteriales*, se ha agregado como apéndice al orden *Clamidobacteriales*, en atención a la semejanza fisiológica entre aquéllas y las *Beggiatoáceas*. Se incluyen en la familia *Acromatiáceas*, página 481.

Suborden I. *Eubacterineas*. Son las bacterias auténticas en sentido estricto. Células rígidas y libres; ramificación sólo en condiciones anormales de vida. No están sujetas por órganos de sostén ni tallos, ni forman vainas. Una tercera parte de las especies forman pigmentos no fotosintéticos. Hay endosporas en la familia *Baciláceas*, rara vez en otras.

Familia 1.ª *Nitrobacteriáceas*. Células sin endosporas, bacilares o elipsoideas, salvo una especie esférica (*Nitrosococcus nitrosus*); bastoncitos espirales en el género *Nitrosospira* y en una especie de *Thiobacillus*. Flagelos polares, o ninguno; reacción al gram incierta, pero se presume negativa para todas las de flagelos polares, salvo para *Nitrosomonas monocella*, del que se dice que es grampositivo. Pueden vivir sin compuestos orgánicos, empleando dióxido de carbono como fuente de este elemento, y obtener su energía de la oxidación de amoníaco, nitrito, hidrógeno, azufre o tiosulfato; algunas especies consumen también substancias orgánicas. No parásitos; generalmente son formas terrestres o acuáticas.

Tribu 1.ª *Nitrobacterias*. Microorganismos que derivan energía de la oxidación de amoníaco a nitrito, o de nitrito a nitrato, y dependen de esta oxidación para desarrollarse. No crecen en medios que contengan substancia orgánica en ausencia de materia inorgánica específica utilizada como fuente de energía. Muchos compuestos orgánicos comúnmente usados en medios de cultivo corrientes son tóxicos para este grupo.

Género 1.º *Nitrosomonas*. Células elipsoidales, no móviles, o con un solo flagelo polar; sueltas, en parejas, cadenas cortas o masas irregulares, no encerradas en una membrana común. Oxidan amoníaco a nitrito más aprisa que los demás géneros de esta tribu.

Género 2.º *Nitrosococcus*. Células esféricas grandes, no móviles; no producen zooglea, y forman nitritos por oxidación de amoníaco.

Género 3.º *Nitrosospira*. Células espirales; producen nitritos muy lentamente, por oxidación de amoníaco.

Género 4.º *Nitrosocystis*. Células elipsoidales u oblongas, que forman agregados redondeados compactos envueltos en una membrana común para producir quistes; éstos se disgregan y dejan libres las células, sobre todo cuando se trasladan a medios nuevos. Dentro del quiste, las células se hallan incrustadas en mucosidad. Oxidan amoníaco a nitrito con rapidez intermedia entre las de *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*.

Género 5.º *Nitrosoglea*. Células elipsoidales o bacilares, incrustadas en mucosidad para formar zooglea. Los agregados celulares no están envueltos por una membrana común. Forman nitrito por oxidación de amoníaco.

Género 6.º *Nitrobacter*. Células bacilares, que oxidan nitritos a nitratos.

Género 7.º *Nitrocystis*. Células elipsoidales o bacilares, incrustadas en mucosidad y unidas en agregados compactos de zooglea. Convierten nitritos en nitratos por oxidación.

Tribu 2.ª *Hidrogenomonadeas*. Bacilos cortos, no móviles o con flagelos lofotricales. Son capaces de absorber energía de la oxidación de hidrógeno. Probablemente crecen bien en medios orgánicos sin hidrógeno, aunque no se ha demostrado que esto sea cierto en todas las especies.

Género 1.º *Hydrogenomonas*. Igual descripción que para la tribu.

Tribu 3.ª *Tiobacileas*. Microorganismos capaces de conseguir energía de la oxidación de azufre o compuestos sulfurados. La mayoría de las especies no crecen en medios orgánicos.

Género 1.º *Thiobacillus*. Células bacilares pequeñas, gramnegativas, no móviles, o con un solo flagelo polar. Se proporcionan energía de la oxidación de compuestos de azufre incompletamente oxidados, principalmente de azufre elemental y tiosulfatos, pero en algunos casos también de sulfuros, sulfitos y politionatos. El producto principal de oxidación es sulfato, pero a veces se forma azufre. Se desarrollan en medio ácido o alcalino, y toman carbono del dióxido o de bicarbonatos disueltos. Unas son autotróficas estrictas, y otras facultativas; hay una especie anaerobia facultativa.

Familia 2.ª *Seudomonadáceas*. Células sin endosporas, bastoncillos oblongos, rectos o curvos más o menos espirales. Un género (*Mycoplana*) las tiene ramificadas. Generalmente se mueven con ayuda de flagelos polares, únicos o en penachos pequeños o grandes; hay pocas especies no móviles. Son gramnegativas (en el género *Pseudomonas* se han registrado algunos ensayos grampositivos dudosos). Crecen bien en la superficie de medios de cultivo corrientes, excepto el *Methanomonas* y algunos vibriones que atacan la celulosa. Son con preferencia aerobias, menos ciertos vibrios, entre ellos los *Desulfovibrio*, anaerobios. Formas acuáticas o terrestres, o patógenas de animales o plantas.

Tribu 1.ª *Seudomonadeas*. Esta tribu comprende todos los bacilos rectos y ramificados de la familia.

Género 1.º *Pseudomonas*. Células monótricas, lofótricas o no móviles.

De producir pigmentos, éstos son de matiz verdoso, fluorescente e hidrosolubles. Gramnegativos, con pocas excepciones. Con frecuencia fermentan glucosa y reducen nitratos a nitrito o amoníaco, y aun a nitrógeno libre. Algunas especies hidrolizan la grasa y atacan hidrocarburos. Terrestres, acuáticas y patógenas de vegetales, pocas veces de animales.

Género 2.º *Xanthomonas*. Células generalmente monótricas, con pigmento amarillo insoluble en agua. Suelen digerir bien proteínas y alcalinizar la leche; producen sulfuro de hidrógeno. La asparagina no les basta como única provisión de carbono y nitrógeno. Forman ácido de monosacáridos y disacáridos. La mayoría son patógenos de plantas, y originan necrosis.

Género 3.º *Methanomonas*. Células monótricas, capaces de obtener energía de la oxidación de metano a dióxido de carbono y agua.

Género 4.º *Acetobacter*. Células elipsoidales a largas y bacilares, sueltas, en parejas o en cadenas cortas y largas; móviles, con flagelos polares, o no móviles. Las formas de involución pueden ser esféricas, oblongas, filamentosas, mazudas, abultadas, curvas, o incluso ramificadas. Las células jóvenes no toman el gram, y las viejas suelen dar reacción variable. Aerobias estrictas; por regla general, muy positivas a la catalasa. Oxidan diversos compuestos orgánicos para dar ácidos orgánicos y otros productos de oxidación que pueden oxidarse más. Los productos de oxidación corrientes comprenden ácido acético, de alcohol etílico; ácido glucónico, y a veces cetoglucónico, de glucosa; dihidroxiacetona, de glicerina; sorbosa, de sorbita, etc. Las necesidades nutritivas varían entre simples y complejas. Suelen desarrollarse muy bien en infusión o autolisado de levadura, con adición de alcohol etílico u otro substrato oxidable. La temperatura óptima varía según las especies. Muy difundidas en la Naturaleza, abundantes sobre todo en materiales de plantas sometidos a fermentación alcohólica; tienen importancia en la producción de vinagre.

Género 5.º *Protaminobacter*. Células móviles o inmóviles, capaces de desdoblar alquilaminas. Con frecuencia dan pigmento. Formas terrestres o acuáticas.

Género 6.º *Mycoplana*. Células ramificadas, especialmente en cultivos jóvenes; con frecuencia presentan bandas al teñirlas. Pueden oxidar fenol y compuestos aromáticos similares como única fuente de energía. Se desarrollan bien en medios corrientes de cultivo.

Tribu 2.ª *Espirileas*. Células curvas, más o menos espirales.

Género 1.º *Vibrio*. Células cortas, curvas, sueltas o reunidas en espirales. Se mueven por medio de un solo flagelo polar, de ordinario relativamente corto, rara vez mediante dos o tres flagelos reunidos en un copete. Crecen bien y rápidamente en la superficie de medios normales de cultivo. Especies aerobias y anaerobias; en su mayoría, formas acuáticas, pocas parásitas.

Género 2.º *Desulfovibrio*. Bacilos ligeramente curvos, de longitud variable, comúnmente sueltos, pero a veces unidos en cadenas cortas con aspecto de espirilos. A menudo, formas abultadas pleomórficas. Se mueven activamente por medio de un solo flagelo polar. Anaerobios estrictos, que reducen sulfatos a sulfuro de hidrógeno; se encuentran en agua de mar, fango marino, agua dulce y en el suelo.

Género 3.º *Cellvibrio*. Bacilos largos y delgados, monótricos, ligeramente curvos, con extremos redondeados; muestran gránulos que se tiñen con intensidad y parecen estar relacionados con la reproducción. La mayoría de las especies producen un pigmento amarillo o pardo con celulosa. Por oxidación convierten esta substancia en oxicelulosa. El desarrollo es débil en medios ordinarios de cultivo. Se encuentran en el suelo.

Género 4.º *Cellfalcicula*. Bacilos o husos cortos, no mayores de 2 μ de longitud, con extremos puntiagudos; contienen corpúsculos metacromáticos. Los cultivos viejos muestran formas cocoides. Son monótricos, y oxidan la celulosa a oxicelulosa. El desarrollo es débil en medios ordinarios de cultivo. Bacterias terrestres.

Género 5.º *Thiospira*. Bacilos incoloros, móviles, ligeramente arqueados, algo puntiagudos, con gránulos de azufre en las células y un pequeño número de flagelos en los extremos.

Género 6.º *Spirillum*. Las células forman hélices largas o fracciones de una espira; suelen contener gránulos de volutina. Comúnmente móviles por medio de un penacho de flagelos polares en uno o en ambos extremos. Aerobios, se desarrollan bien en medios ordinarios de cultivo, salvo una especie saprófita y las patógenas; éstas no se han cultivado todavía. Suelen encontrarse en agua dulce y de mar que contenga substancia orgánica.

Familia 3.ª *Azotobacteriáceas*. Células sin endosporas. Bacilos y aun cocos relativamente grandes, a veces parecidos a levaduras; móviles por medio de flagelos peritricales. Gramnegativas, aerobias estrictas, que suelen crecer en película sobre la superficie del medio de cultivo. Pueden fijar nitrógeno atmosférico si disponen de carbohidrato u otra fuente de energía. Crecen muy bien en medios escasos en nitrógeno. Bacterias terrestres y acuáticas.

Género 1.º *Azotobacter*. Caracteres idénticos a los de la familia.

Familia 4.ª *Rizobiáceas*. Células sin endosporas, bacilares, con un flagelo polar o lateral, o dos a cuatro peritricales; algunas especies no son móviles. Generalmente gramnegativas. El género *Chromobacterium* produce un pigmento violado. Desarrollo aeróbico en medios ordinarios de cultivo que contengan glucosa; se utilizan carbohidratos sin formación apreciable de ácido. Saprófitas, simbióticas y patógenas; estas últimas lo suelen ser de plantas, y forman vegetaciones anormales en raíces y tallos.

Género 1.º *Rhizobium*. Bacilos de 0,5 a 0,9 por 1,2 a 3 μ. Móviles cuando jóvenes, suelen adoptar formas bacteroides en medios artificiales de cultivo que contengan alcaloides o glucósidos, o en los que se haya aumentado la acidez, y también durante la simbiosis en el interior del nódulo. Son gramnegativos; aerobios, heterotróficos, crecen muy bien con extractos de levadura, malta u otras substancias vegetales. Pueden reducir nitratos a nitritos, que no utilizan; no licuan la gelatina, o muy poco, tras prolongada incubación; temperatura óptima, 25° C. El grupo es capaz de producir nódulos en raíces de leguminosas, y de fijar nitrógeno libre durante esta simbiosis.

Género 2.º *Agrobacterium*. Bacilos pequeños, cortos, típicamente móviles, con uno o cuatro flagelos peritricales, en el primer caso,

lateral con más frecuencia que polar; de ordinario son gramnegativos. En medios corrientes no producen gases visibles ni ácido suficiente para descubrirlo mediante tornasol; en medios sintéticos pueden producir dióxido de carbono suficiente para reconocer ácido con azul de bromotimol, o a veces con púrpura de bromocresol. Licuan gelatina muy despacio, o nada en absoluto; no pueden fijar nitrógeno libre. Temperatura óptima, 25 a 30° C. Se encuentran en el suelo, en raíces de plantas, o en los tallos, donde producen hipertrofia.

Género 3.º *Chromobacterium*. Bastoncitos de 0,4 a 0,8 por 1 a 5 μ, móviles, con uno a cuatro o más flagelos; gramnegativos. Se forma un pigmento violeta, soluble en alcohol, pero no en agua ni en cloroformo. Crecen en medios corrientes de cultivo, y usualmente producen ácido a expensas de glucosa, a veces de maltosa, pero no de lactosa. Licuan gelatina, y no producen indol; generalmente reducen nitratos a nitritos. Temperatura óptima, 20 a 25° C; algunos se desarrollan bien a 37° C. Suelen ser bacterias saprófitas terrestres y acuáticas.

Familia 5.ª *Micrococáceas*. Células sin endosporas, excepto en el género *Sporosarcina*. En estado libre son esféricas, y algo elípticas durante la división, que se efectúa en dos o tres planos. Si permanecen en contacto después de escindirse, aparecen aplanadas con frecuencia en el plano de la última división. Se encuentran sueltas, en parejas, tétradas, paquetes o masas irregulares; rara vez son móviles, y generalmente toman el gram. Muchas especies forman pigmento amarillo, anaranjado, rosado o rojo; la mayoría son preferentemente aerobias, y desarrollan abundante vegetación en medios corrientes de cultivo, pero son capaces de un débil crecimiento anaeróbico; algunas especies son anaerobias estrictas. Metabolismo heterotrófico; suelen transformar carbohidratos en ácidos por fermentación, y a menudo licuan la gelatina. Parásitos facultativos y saprófitos. Con frecuencia viven en la piel.

Género 1.º *Micrococcus*. Células en placas o en masas irregulares, nunca en cadenas largas ni en paquetes; grampositivas o gramnegativas. Generalmente se desarrollan con abundancia en agar; algunas especies no dan pigmentos; otras, lo producen amarillo, y menos veces, anaranjado o rojo. El caldo glucosado es algo ácido, el lactosado suele ser neutro; con frecuencia licuan la gelatina, pero no con rapidez. Parásitos facultativos y saprófitos.

Género 2.º *Gaffkya*. Se presentan en tétradas en el cuerpo de animales y en medios especiales; en los corrientes, aparecen por parejas o en masas irregulares. Anaerobios a aerobios, grampositivos, parásitos.

Género 3.º *Sarcina*. En condiciones favorables, se dividen por tres planos, y producen paquetes regulares. Suelen ser grampositivos. Desarrollo abundante en agar, comúnmente con formación de pigmento amarillo o anaranjado. El caldo glucosado es algo ácido, y el lactosado, generalmente neutro. Pueden reducir o no nitratos a nitritos. Saprófitos y parásitos facultativos.

Familia 6.ª *Neiseriáceas*. Células esféricas, en parejas o en masas, inmóviles, gramnegativas; rara vez forman pigmento. La familia comprende especies aerobias y anaerobias. Algunas vegetan débilmente o no lo hacen en ausencia de humores orgánicos de mamíferos. Temperatura óptima, 37° C. Todas las especies conocidas son parásitas.

Género 1.º *Neisseria*. Cocos apareados gramnegativos, con lados contiguos aplanados. Cuatro de las once especies producen pigmento amarillo, y las hay aerobias y anaerobias. El desarrollo puede ser débil en medios corrientes. Sus actividades bioquímicas son limitadas; utilizan pocos carbohidratos, y no producen indol ni reducen nitratos, pero dan catalasa en abundancia. Parásitos de mamíferos, por lo que hoy se sabe.

Género 2.º *Veillonella*. Cocos pequeños, gramnegativos, de 0,3 μ en promedio; se presentan en masas, raras veces en pares o en cadenas cortas. Células no diferenciadas, unidas por una substancia intersticial de naturaleza ectoplasmática. Las especies conocidas son anaerobias; crecen bien en medios nutritivos corrientes, y su actividad bioquímica es pronunciada. Parásitos inofensivos en la boca y el intestino del hombre y los animales.

Familia 7.ª *Lactobacteriáceas*. Bastoncillos largos o cortos, o bien cocos que se dividen, como los bacilos, por un solo plano, y dan cadenas, pero nunca tétradas ni paquetes. Inmóviles, salvo en ciertos cultivos de estreptococos; grampositivos, rara vez producen pigmento. La vegetación superficial es escasa o nula en todos los medios. Algunas especies son anaerobias estrictas. Los carbohidratos son necesarios para un buen desarrollo, y fermentan para dar ácido láctico, a veces con ácidos volátiles, alcohol y dióxido de carbono como subproductos, salvo el *Diplococcus magnus*, que no fermenta. Sólo por excepción licuan la gelatina; no reducen nitratos a nitritos. Se encuentran regularmente en la boca y en el conducto intestinal de hombres y animales, en productos lácteos y en zumos vegetales fermentables. Algunas especies son muy patógenas.

Tribu 1.ª *Estreptocóceas*. Células esféricas u oblongas, que se dividen por un solo plano y se presentan en parejas o en cadenas. Unas pocas especies son anaerobias estrictas, y ninguna se desarrolla con abundancia en medios sólidos. Carbohidratos y polialcoholes se convierten por homofermentación en ácido láctico, y por heterofermentación, en ácidos láctico y acético, alcohol y dióxido de carbono. Algunas especies patógenas se desarrollan mal sin suero sanguíneo u otros líquidos fertilizantes. Reacción de catalasa negativa.

Género 1.º *Diplococcus*. Células comúnmente en parejas, a veces en cadenas, o excepcionalmente en tétradas o en pequeños agregados. Las células jóvenes son grampostivas. Parásitos en ocasiones; se desarrollan mal o nada en medios artificiales. Suelen poseer una gran capacidad de fermentación; la mayoría de las razas forman ácido de glucosa, lactosa, sacarosa e inulina. Las especies aerobias se disuelven en la bilis, no así las anaerobias.

Género 2.º *Streptococcus*. Células esféricas u ovoides, rara vez alargadas en bastoncillos; se presentan apareadas o en cadenas cortas o largas, nunca en paquetes ni en masas zoogleicas. Regularmente no forman cápsulas, pero éstas se hacen perceptibles en algunas especies, si las condiciones son propicias; grampositivas; algunas especies se decoloran fácilmente. A veces los cultivos producen una coloración rojiza de herrumbre por picadura en agar, o un pigmento amarillo o anaranjado en

caldo de almidón; se desarrollan poco en medios artificiales; las colonias en agar son pequeñas, y translúcidas las superficiales; pueden ser veladas, convexas o mucoides. En su mayoría son anaerobios facultativos, con escasa vegetación superficial en cultivos por picadura; unos pocos son anaerobios estrictos, y algunos de ellos atacan las proteínas, para producir gases y malos olores. Los demás producen fermentación homogénea de carbohidratos, con ácido dextroláctico como producto dominante; ácidos y otros productos volátiles faltan o se originan en muy escasa cantidad, lo mismo que el dióxido de carbono. Rara vez atacan la inulina, y no reducen nitratos a nitritos. Son insolubles en la bilis. Se encuentran regularmente en la boca y el intestino de hombres y animales, en productos lácteos y en zumos vegetales que fermentan; algunas especies son muy patógenas.

Género 3.º *Leuconostoc.* Células normalmente esféricas; en ciertas condiciones, como en frutas ácidas y vegetales, pueden alargarse y hacerse puntiagudas, o convertirse en bacilos. Ciertos tipos vegetan con formación característica de mucosidad en medios sacarosados; el crecimiento en medios corrientes de cultivo se intensifica agregando extractos de levadura, tomate y otros de vegetales. Generalmente producen una cantidad limitada de ácidos láctico y acético, así como alcohol, y alrededor de una cuarta parte de la glucosa fermentada se convierte en dióxido de carbono. Originan siempre ácido levoláctico, y a veces también dextroláctico. Rara vez coagulan la leche; reducen la fructosa a manita. Se encuentran en la leche y en zumos de plantas.

Tribu 2.ª *Lactobacileas.* Bastoncitos largos y delgados a menudo, grampositivos, inmóviles. Rara vez forman pigmento amarillo o anaranjado a herrumbroso o de color de ladrillo. Desarrollo superficial escaso, salvo en el género *Microbacterium,* porque estos gérmenes suelen ser microaerófilos o anaerobios. Carbohidratos y polialcoholes se transforman por heterofermentación en ácidos láctico, acético, propiónico o butírico, alcohol y dióxido de carbono. En patata, el desarrollo es débil o nulo. No licuan la gelatina, ni reducen nitratos a nitritos, salvo el género *Microbacterium.* Algunas especies medran a temperaturas relativamente elevadas. Pueden producir o no catalasa.

Género 1.º *Lactobacillus.* Bastoncitos, generalmente largos y finos, microaerófilos. Por homofermentación transforman carbohidratos y polialcoholes en ácido láctico, y por heterofermentación, en ácidos láctico y acético, alcoholes y dióxido de carbono. No producen catalasa. Se encuentran en productos lácteos y vegetales en fermentación.

Género 2.º *Microbacterium.* Bacilos pequeños, inmóviles, grampositivos; producen ácido láctico a expensas de carbohidratos, pero no gases, y también catalasa. Suelen ser termorresistentes. Se encuentran en productos lácteos y utensilios, en materias fecales y en el suelo.

Género 3.º *Propionibacterium.* Células inmóviles, que no producen esporas. Bacterias grampositivas que crecen en condiciones anaeróbicas en medios neutros, y bacilos difteroides cortos, a

veces parecidos a estreptococos; en condiciones aeróbicas, con siembras grandes, se convierten en células largas, irregulares, claviformes y ramificadas. Corpúsculos metacromáticos demostrables con la coloración de Albert. Fermentan ácido láctico, carbohidratos y polialcoholes, para formar ácidos propiónico y acético y dióxido de carbono. Por lo regular, la reacción de catalasa es muy positiva. Gran tendencia a la anaerobiosis; desarrollo muy lento; las colonias son visibles a simple vista, pero no suelen discernirse en menos de cinco a siete días. Las necesidades nutritivas son complejas. Se desenvuelven muy bien en medios de extracto de levadura, con adición de lactatos o de carbohidratos simples. Temperatura óptima, 30° C. Se encuentran en productos lácteos, especialmente en quesos duros.

Género 4.º *Butyribacterium.* Células bacilares inmóviles, anaerobias a microaerófilas, rectas o ligeramente curvas, grampositivas. Fermentan carbohidratos y ácido láctico, para formar ácidos acético y butírico y dióxido de carbono. No suelen producir catalasa, salvo por excepción y en pequeña cantidad. Parásitos intestinales.

Familia 8.ª *Corinebacteriáceas.* Bacilos inmóviles, excepto en el género *Listeria,* a menudo con bandas o salpicados de corpúsculos metacromáticos; su forma puede ser muy variada. Se han observado células ramificadas en algunas especies, pero no es lo corriente. Suelen ser grampositivos, pero esta reacción varía según la naturaleza de las células. Cuando forman pigmento, es de color amarillo grisáceo o anaranjado o rosado. Aerobios a microaerófilos; se han señalado especies anaerobias. A veces licuan la gelatina y reducen nitratos a nitritos. Parásitos y patógenos de animales y plantas; se encuentran asimismo en productos lácteos, en el suelo y en el agua.

Género 1.º *Corynebacterium.* Bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos, con segmentos o gránulos irregularmente teñidos; con frecuencia presentan abultamientos puntiagudos o claviformes en los extremos. La división por dehiscencia produce una disposición angular o en empalizada. Son inmóviles, con pocas excepciones grampositivas a variables; las células jóvenes, y a veces las viejas, se hacen gramnegativas, pero los gránulos son siempre grampositivos. Por lo general, son aerobias absolutas, pero hay especies microaerófilas, e incluso anaerobias; producen catalasa; pueden licuar o no la gelatina, y reducir nitratos a nitritos, o no reducirlos; fermentan o no azúcares, pero rara vez producen intensa acidez. Muchas especies oxidan glucosa por completo a dióxido de carbono y agua, sin originar gases visibles. Algunas especies patógenas dan una poderosa exotoxina. Este grupo se halla muy difundido en la Naturaleza. Las especies mejor conocidas son parásitas y patógenas para el hombre y los animales domésticos; otras se han encontrado en aves e insectos, y probablemente las hay en otros animales; varias son patógenas bien notorias de vegetales, y otras se hallan en productos lácteos, en el agua y en el suelo.

Género 2.º *Listeria.* Bacilos pequeños, grampositivos, perítricos, aerobios, productores de catalasa. Vegetan libremente en medios ordinarios. Desarrollan gases de glucosa y algunos otros carbo-

hidratos. Parásitos patógenos; la infección se caracteriza por monocitosis. Son parásitos de animales homotermos.

Género 3.º *Erysipelothrix*. Microorganismos bacilares, con tendencia a formar filamentos largos, que pueden hacerse gruesos y mostrar gránulos característicos; inmóviles, grampositivos, microaerófilos. No producen catalasa, y crecen libremente en medios ordinarios. Desprenden gases de glucosa y algunos otros carbohidratos. Parásitos en mamíferos.

Familia 9.ª *Acromobacteriáceas*. Bacilos pequeños a medianos, generalmente uniformes; no se ramifican en medios corrientes; gramnegativos, rara vez variables frente a esta coloración. Son perítricos o inmóviles. Desarrollo en agar inclinado, sin pigmento, o lo dan amarillo grisáceo, amarillo pardusco o amarillo a anaranjado, que no se difunde en el agar. No atacan carbohidratos, o lo hacen débilmente; pueden formar ácido, pero no gases, y reducir o no los nitratos; unos licuan la gelatina y otros no. Tampoco licuan el agar ni atacan la celulosa, y no son fosforescentes. La leche tornasolada puede volverse algo ácida, pero no lo suficiente para coagularse. Por lo regular, la reacción no cambia, o se vuelve alcalina. Suelen encontrarse en agua salada o dulce, o en el suelo, y con menos frecuencia son parásitos. Algunos gérmenes patógenos de plantas pueden pertenecer al grupo.

Género 1.º *Alcaligenes*. Bacilos perítricos o monótricos, o inmóviles, gramnegativos o grampositivos. No desprenden ácido ni gases de carbohidratos; pueden licuar o no la gelatina y el suero sanguíneo solidificado. La leche da reacción alcalina, con peptonización o sin ella. No producen acetilmetilcarbinol, y dan o no pigmento amarillo grisáceo, amarillo pardusco o amarillo. Generalmente se encuentran en el conducto intestinal de vertebrados o en productos lácteos.

Género 2.º *Achromobacter*. Bacilos no cromógenos, móviles, con flagelos peritricales, o inmóviles, gramnegativos o variables. Hacen la leche tornasolada ligeramente ácida, no la alteran o la vuelven alcalina. Se encuentran en agua salada o dulce, o en el suelo.

Género 3.º *Flavobacterium*. Bacilos de tamaño mediano, que forman en medios de cultivo un pigmento amarillo o anaranjado; móviles, con flagelos peritricales, o inmóviles. Son generalmente gramnegativos. Atacan débilmente los carbohidratos, y a veces dan ácido de hexosas, pero no gases. Se encuentran en el agua o en el suelo.

Familia 10.ª *Enterobacteriáceas*. Bacilos rectos, gramnegativos; móviles, con bacilos peritricales, o inmóviles. Se desarrollan bien en medios artificiales, y atacan la glucosa, con formación de ácido, o de ácido y gases visibles. Con excepción del género *Erwinia*, reducen los nitratos a nitritos. La composición antigénica se describe muy bien como un mosaico traducido en correlaciones serológicas entre los diversos géneros, y aun se extiende a otras familias. Muchos son parásitos de animales, y otros, de plantas, entre las que originan tizones y podredumbres ligeras. Con frecuencia son saprófitos, y descomponen substancias vegetales que contienen carbohidratos.

Tribu 1.ª *Esqueriqueas*. Fermentan glucosa y lactosa, con formación de ácidos y gases visibles, en 24 horas, a 37° C, o en 48 horas, a 25-30° C. Algunas formas producen ácido y gases lentamente a

expensas de lactosa. No licuan la gelatina, excepto la especie *Aerobacter cloacae*, que lo hace poco a poco.

Género 1.º *Escherichia*. Bacilos cortos, que fermentan glucosa y lactosa, con formación de ácido y gases, pero no acetilmetilcarbinol. La reacción con rojo de metilo es positiva. Producen dióxido de carbono e hidróxido a expensas de glucosa, aproximadamente a volúmenes iguales. Por lo general, no pueden utilizar ácido úrico como única fuente de nitrógeno. Se encuentran en las heces, y en ocasiones son patógenas para el hombre (colitis, cistitis). Muy difundidos en la Naturaleza.

Género 2.º *Aerobacter*. Bacilos cortos, que fermentan glucosa y lactosa, con formación de ácido y gases. Reacción negativa con rojo de metilo, y positiva con el reactivo de Voges-Proskauer. Atacan la glucosa y producen dos veces más dióxido de carbono que hidrógeno; no separan trimetilenglicol de la glicerina por fermentación anaeróbica. Utilizan citratos como única fuente de carbono. Anaerobios facultativos, muy difundidos en la Naturaleza.

Género 3.º *Klebsiella*. Bacilos cortos, algo abultados, con extremos redondeados; suelen presentarse sueltos, y se encapsulan en la fase mucoide. Son inmóviles, gramnegativos y dan reacciones de fermentación muy variables, pero suelen atacar diversos carbohidratos; aerobios, con buen desarrollo en medios corrientes de cultivo. Se encuentran a menudo en las vías respiratorias y génitourinarias, y en el conducto intestinal del hombre, pero pueden aislarse de diferentes animales y substancias.

Tribu 2.ª *Ervineas*. Bacilos móviles, que generalmente necesitan para desarrollarse compuestos orgánicos nitrogenados. Producen ácido de distintos azúcares, y pueden desprender o no gases de los mismos. En algunas especies, el número de carbohidratos atacados no es grande, y a veces no fermentan lactosa; pueden o no licuar la gelatina y reducir o no los nitratos. Invaden los tejidos de plantas vivas, en las que producen necrosis seca, agallas, agostamientos y podredumbres; en este último caso, una protopectinasa destruye la substancia laminar intermedia.

Género 1.º *Erwinia*. La misma descripción de la tribu.

Tribu 3.ª *Serracteas*. Bacilos aerobios pequeños, que habitualmente producen un pigmento rojo o rosado brillante en agar y en gelatina.

Género 1.º *Serratia*. Bacilos perítricos pequeños, aerobios, gramnegativos, que licuan con rapidez, reducen los nitratos y dan pigmentos rojos característicos. Son comunes las razas blancas a rojorrosadas, sin colores brillantes. Coagulan y peptinizan la leche, y licuan el suero sanguíneo. Las especies típicas desprenden dióxido de carbono, y a menudo hidrógeno, de glucosa y otros azúcares, y forman también ácidos acético, fórmico, succínico y láctico, acetilmetilcarbinol y 2:3-butilenglicol. Saprófitos en substancias vegetales o incluso animales en descomposición.

Tribu 4.ª *Proteas*. Fermenta glucosa, pero no lactosa, con formación de ácido, y generalmente gases visibles.

Género 1.º *Proteus*. Bacilos rectos, gramnegativos, por lo general activamente móviles a 25° C; la movilidad puede ser débil o

nula a 37° C. Son perítricos, a veces con gran número de flagelos. Suelen originar colonias ameboides y pululación en medio húmedo. Pleomorfismo señalado, característico sólo de cultivos muy jóvenes y pululantes. Fermentan glucosa, y habitualmente sacarosa, pero no lactosa. Todas las especies descomponen la urea y reducen el óxido de trimetilamina.

Tribu 5.ª *Salmoneleas*. Bacilos móviles, con flagelos peritricales, o inmóviles. Atacan numerosos carbohidratos, con formación de ácido, o de ácido y gases; no suelen atacar lactosa, sacarosa ni salicina, ni producen acetilmetilcarbinol. Tampoco licuan la gelatina, ni hidrolizan la urea, ni peptonizan la leche. La vegetación no se extiende en agar ordinario al 2-3 %. Viven en el cuerpo de animales homotermos, en algunos reptiles, y con frecuencia en los alimentos ingeridos por estos animales.

Género 1.º *Salmonella*. Por lo común son móviles, aunque no todas las formas. Producen ácido y gases a expensas de glucosa, maltosa, manita y sorbita; las especies *S. typhosa* y *S. gallinarum* no desprenden gases de estos azúcares. No atacan la lactosa, la sacarosa ni la salicina; tampoco coagulan la leche, ni forman indol, ni licuan la gelatina. Reducen el óxido de trimetilamina a trimetilamina. Todas las especies son patógenas para animales de sangre caliente, incluído el hombre, y ocasionan infecciones y fiebres entéricas. Algunos se encuentran en reptiles, y todos o algunos pueden vivir también en alimentos en descomposición.

Género 2.º *Shigella*. Bacilos inmóviles, aunque se dice que son móviles algunos cultivos de ciertas especies poco conocidas. Producen ácido, pero no gases, a expensas de carbohidratos, salvo algunos tipos de *S. paradysenteriae*. No licuan la gelatina; unas especies reducen el óxido de trimetilamina, y otras no. Hay especies que medran a 45,5° (prueba de Eijkman).

Familia 11.ª *Parvobacteriáceas*. Bacilos pequeños, móviles o inmóviles. Algunos se desarrollan en medios corrientes, pero la mayoría lo hacen mejor o solamente en los que contienen humores orgánicos o substancias auxéticas; otros invaden tejidos vivos. Son gramnegativos; no suelen licuar la gelatina ni forman gas por fermentación de carbohidratos. La infección puede originarse a veces por penetrar los microorganismos a través de membranas mucosas o de la piel. Parásitos o patógenos de animales homotermos, incluído el hombre.

Tribu 1.ª *Pasteureleas*. Bacilos pequeños, elipsoidales a oblongos, móviles o inmóviles, con coloración bipolar.

Género 1.º *Pasteurella*. Bacilos pequeños, elipsoidales a oblongos, con coloración bipolar por métodos especiales. Aerobios facultativos; requieren un reducido potencial de oxidación-reducción al aislarlos por vez primera. La mayoría fermentan carbohidratos, pero no lactosa, al menos sensiblemente. No producen gases, ni licuan la gelatina, ni coagulan la leche. Parásitos del hombre y de otros mamíferos y aves.

Género 2.º *Malleomyces*. Bacilos cortos, con los extremos redondeados; a veces forman filamentos, y tienden a ramificarse. Son móviles o inmóviles, gramnegativos, y muestran propensión a teñirse por ambos polos. Coagulan lentamente la leche, y

pueden licuar la gelatina. Especializados para la vida parásita; crecen bien en suero sanguíneo y en otros humores orgánicos.

Género 3.º *Actinobacillus*. Bacilos de mediano tamaño, aerobios, gramnegativos, que a menudo muestran un gran pleomorfismo. Son frecuentes las formas cocoides. Tendencia a coloración bipolar. Forman ácido, pero no gases, por fermentación de carbohidratos. Se desarrollan muy bien, sobre todo recién aislados, con tensión acentuada de dióxido de carbono. Son patógenos para animales, y algunas especies atacan al hombre. La característica principal del grupo es la propensión a formar agregados en tejidos o en cultivos, a modo de los gránulos de azufre de la actinomicosis.

Tribu 2.ª *Bruceleas*. Bacilos diminutos, móviles o inmóviles, o formas cocoides, que viven en medios especiales.

Género 1.º *Brucella*. Bacilos cortos, con muchas células cocoides, de 0,5 por 0,5 a 2 μ, inmóviles, encapsulados, gramnegativos. No licuan la gelatina, ni forman ácido ni gases de carbohidratos; utilizan la urea. Parásitos, invaden todos los tejidos animales, e infectan los órganos genitales, las glándulas mamarias y los conductos respiratorios e intestinal. Son patógenos para diversas especies de animales domésticos y para el hombre.

Tribu 3.ª *Bacteroideas*. Bacilos móviles o inmóviles, sin endosporas. Pueden requerir o no medios de cultivo enriquecidos. Anaerobios obligados, gramnegativos.

Género 1.º *Bacteroides*. La misma descripción que para la tribu.

Género 2.º *Fusobacterium*. Bacilos anaerobios gramnegativos, generalmente con los extremos ahusados; suelen ser inmóviles. Al teñirlos, presentan gránulos más o menos patentes.

Tribu 4.ª *Hemofelias*. Formas parásitas diminutas, que al aislarlas por primera vez se desarrollan sólo en presencia de hemoglobina, líquido ascítico u otros humores orgánicos, o en la de ciertas substancias auxéticas contenidas en tejidos vegetales estériles, no calentados (patata). Pueden ser móviles o inmóviles, y se encuentran comúnmente en la mucosa de las vías respiratorias o en la conjuntiva.

Género 1.º *Hemophilus*. Células bacilares muy pequeñas, a veces filamentosas y pleomórficas; inmóviles, gramnegativas. Parásitos estrictos, que medran muy bien o exclusivamente en presencia de hemoglobina, y, en general, necesitan suero sanguíneo, líquido ascítico o ciertas substancias coadyuvantes al crecimiento.

Género 2.º *Moraxella*. Células bacilares pequeñas, cortas, generalmente sueltas o en parejas; inmóviles, parásitas, aerobias, gramnegativas.

Género 3.º *Noguchia*. Bacilos pequeños y delgados, gramnegativos, presentes en la conjuntiva del ojo en el hombre y los animales aquejados de una afección de tipo folicular. Desarrollo mucoide, que tras el primer aislamiento encuentra alguna dificultad en medios corrientes. Son móviles, flagelados y encapsulados; aerobios o anaerobios facultativos. Temperatura óptima de desarrollo, 28 a 30° C.

Género 4.° *Dialister*. Células bacilares minúsculas, sueltas, apareadas o en cadenas cortas; inmóviles, parásitas estrictas. Se desarro-

llan sólo en condiciones anaeróbicas, en medios que contengan tejido estéril fresco o líquido ascítico.

Familia 12.ª *Bacteriáceas*. Células bacilares, que no producen endosporas; móviles e inmóviles, grampositivas o gramnegativas. Metabolismo complejo; utilizan aminoácidos, y generalmente carbohidratos.

Género 1.º *Bacterium*. Células bacilares no esporíparas, gramnegativas o grampositivas.

Familia 13.ª *Baciláceas*. Células bacilares, capaces de producir esporas, con flagelos peritricales o inmóviles. Las endosporas son cilíndricas, elipsoidales o esféricas, y su situación es central, subterminal o terminal. Los esporangios no difieren de las células vegetativas, salvo cuando las hinchan esporas que rebasan su diámetro; tales esporangios son fusiformes cuando las esporas están en el centro; cónicas o mazudas, si están en los extremos. Generalmente son grampositivas, y no suelen formar pigmentos; aerobias, microaerófilas o anaerobias. Con frecuencia reducen la gelatina, y generalmente fermentan azúcares, a veces con desprendimiento de gases visibles. Algunas especies son termófilas, es decir, medran fácilmente a 55° C. La mayoría son saprófitas, y se encuentran de ordinario en el suelo. Unas pocas son parásitas o patógenas de animales, especialmente de insectos.

Género 1.º *Bacillus*. Bacterias bacilares, a veces en cadenas. Los esporangios no suelen diferir de las células vegetativas. Producen catalasa. Son aerobias, y en ocasiones muestran colonias toscas y forman una película sobre caldo. Suelen oxidar carbohidratos o proteínas más o menos por completo, y a menudo producen ligera acidez, sin acumulación señalada de productos característicos. La mayoría son terrestres.

Género 2.º *Clostridium*. Bacilos frecuentemente agrandados al esporular, por lo que dan formas clostrídeas o plectrídeas. No producen catalasa. Anaerobios o microaerófilos; muchas especies fermentan carbohidratos, y dan origen a varios ácidos (con frecuencia también butírico) y gases (dióxido de carbono, hidrógeno, y a veces metano). Otros ocasionan una putrefacción rápida de proteínas, con olores molestos. Se encuentran con frecuencia en el suelo y en heces humanas o animales. Algunas especies, cuando viven saprófitas en substancia vegetal corrompida o en tejidos muertos dentro de un huésped animal, producen diversos cuerpos tóxicos y líticos, y por ello son patógenas.

Suborden II. *Caulobacterineas*. Bacterias no filamentosas, que crecen característicamente sobre pedúnculos, o a veces son sésiles. Las células pedunculadas son asimétricas porque la célula segrega, por un lado o un extremo, goma, hidróxido férrico y otras substancias, para formar el soporte. Se multiplican por escisión transversal. En algunas especies, los pedúnculos son muy cortos o faltan en absoluto; en este último caso, las células se unen directamente al substrato en una masa zoogleica. Se encuentran células sueltas, apareadas o en cadenas cortas, nunca en filamentos; carecen de vaina, y no son esporíparas. Típicamente acuáticas.

Familia 1.ª *Nevskiáceas*. Bacterias pedunculadas, con el eje largo de las células bacilares perpendicular al del pedúnculo; éste es lobulado, con ramificación dicotómica, y se compone de goma. Las células se reproducen por escisión transversal binaria. Se desarrollan en agua o en jugos azucarados formando masas zoogleicas.

Género 1.º *Nevskia*. La misma descripción que para la familia.

Familia 2.ª *Galioneláceas*. Bacterias pedunculadas, con el eje de las células bacilares perpendicular al eje del pedúnculo; éste es fino, retorcido, con ramificación dicotómica, y se compone de hidróxido férrico, que se disuelve por completo en ácido clorhídrico diluído. Las células se multiplican por escisión transversal binaria. Se desarrollan en aguas ferruginosas.

Género 1.º *Gallionella*. La misma descripción que para la familia.

Familia 3.ª *Caulobacteriáceas*. Bacterias pedunculadas, con el eje de las células oblongas en coincidencia con el eje largo de los pedúnculos; éstos son delgados, como flagelos, y a menudo se hallan fijados al substrato mediante una especie de botón, y carecen de ramificaciones. Las células se reproducen por escisión transversal binaria; la más externa de una pareja puede formar un pedúnculo antes de terminar la división. Son perífitas, y se desarrollan en superficies sumergidas.

Género 1.º *Caulobacter*. La misma descripción que para la familia.

Familia 4.ª *Siderocapsáceas*. Células esféricas u ovoides. No se conocen fases móviles, si es que existen. Todavía no se han cultivado en medios artificiales. Las gruesas cápsulas que envuelven las células se incrustan de hidróxido férrico. Se fijan a la superficie de las hojas y de otras partes de plantas acuáticas.

Género 1.º *Siderocapsa*. De una a muchas células pequeñas, esféricas a ovoides, empotradas en una masa de material capsular rodeada de hidróxido férrico. Se reconocen mejor tiñendo con reactivo de Schiff. No se ha apreciado movilidad. Se desarrollan sujetas a la superficie de plantas acuáticas.

Suborden III. *Rodobacterineas*. Células esféricas o en forma de bastoncillos, vibriones o espirales, de menos de 1 a 20 μ. Cuando son móviles presentan flagelos polares. Gramnegativos, por lo que se sabe; no forman endosporas. Bacterias rojas, purpúreas, pardas o verdes, que contienen bacterioclorofila u otros pigmentos verdes análogos, y usualmente poseen uno o más pigmentos carotenoides; son capaces de desarrollar un metabolismo sintético que difiere del de las plantas verdes en que no produce desprendimiento de oxígeno, y depende de cuerpos oxidables extraños, que se deshidrogenan con reducción simultánea de dióxido de carbono. Como substratos oxidables se pueden emplear diversas substancias simples: sulfuros u otros cuerpos sulfurados, hidrógeno molecular, alcoholes, ácidos grasos, hidroxiácidos y cetoácidos, etc. Todas pueden medrar en cultivos estrictamente anaeróbicos expuestos a la luz; los que crecen en presencia de aire se pueden cultivar también a cubierto de la luz en condiciones anaeróbicas. El color depende señaladamente del medio; las pequeñas aparecen incoloras si no se observan en masas. Pueden contener corpúsculos de azufre. Las especies descritas se han encontrado más bien en aguas dulces y algunas en ambiente marino.

Familia 1.ª *Tiorrodáceas*. Microorganismos unicelulares, que se desarrollan a menudo como agregados de células o familias de tamaño y forma variables. Algunas células sueltas presentan aspecto de esferas, ovoides, bastoncillos cortos, vibriones, espirales, bacilos largos, o cadenas. Se encuentran naturalmente en medios que con-

tienen sulfuros y requieren luz para desarrollarse; la irradiación infrarroja de longitud de onda aproximada de 900 mμ es eficaz. Producen un sistema de pigmentos compuesto de bacterioclorofila verde y carotenoides amarillos y rojos; por eso parecen masas celulares de color púrpura pálido, pardusco a rojo intenso; las células sueltas, si no son muy grandes, dan la impresión de no estar pigmentadas. Éstas son gérmenes anaerobios o microaerófilos, con un metabolismo fotosintético en el que se reduce dióxido de carbono con ayuda de donadores especiales de hidrógeno, sin desprender oxígeno molecular. Cuando se encuentran en la Naturaleza estos microorganismos el sulfuro de hidrógeno actúa como donador de este elemento, y el azufre, primer producto intermedio de oxidación, se acumula en gotas dentro de las células. Probablemente todos los miembros del grupo pueden utilizar varias substancias orgánicas distintas de sulfuro de hidrógeno como donadores de hidrógeno para la fotosíntesis; así son potencialmente mixotrópicos.

Género 1.º *Thiosarcina*. Células individuales esféricas, anaerobias, que forman paquetes cúbicos regulares carcinoides, resultantes de la división consecutiva por tres planos perpendiculares. Los paquetes contienen generalmente 8 a 64 células. No suelen ser móviles ni esporíparos; contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, a lo que deben su pigmentación purpurina a roja. Son capaces de desarrollar un metabolismo fotosintético en presencia de sulfuro de hidrógeno, y entonces las células almacenan gránulos de azufre.

Género 2.º *Thiopedia*. Células individuales esféricas a bacilares cortas, esto último poco antes de la división; anaerobias. Se disponen en capas aplanadas con tétradas típicas como unidades de estructura, derivadas de divisiones celulares en dos direcciones perpendiculares. Agregados de células de diversos tamaños, desde simples tétradas a láminas grandes compuestas de millares de gérmenes; no suelen ser móviles, ni forman esporas. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides; capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y entonces almacenan glóbulos de azufre.

Género 3.º *Thiocapsa*. Células esféricas, que se presentan en familias de individuos dispuestos irregularmente y reunidos en una cápsula mucosa común; los agregados se extienden laminarmente sobre el substrato. No se ha observado movilidad. Cuando crece la colonia, revienta la cápsula y se dispersan las células; la morfología general y el desarrollo parecen por eso similares a los del género *Aphanocapsa* entre las algas verdeazuladas. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides y son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno; en tales condiciones las células almacenan en su interior gránulos de azufre.

Género 4.º *Thiodyctyon*. Células bacilares, a menudo con extremos puntiagudos, algo parecidas a husos. Forman agregados en los que las células se disponen punta con punta, a modo de red, que recuerda la forma del alga verde *Hydrodictyon*; la configuración no es constante y las células pueden componer también masas más compactas. A veces, grupos de células se separan del agregado principal mediante movimientos activos.

No se ha observado cápsula gelatinosa común, y las células presentan casi siempre colores débiles. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, con almacenamiento de pequeños glóbulos de azufre en las células.

Género 5.º *Thiothece*. Bacterias sulfurosas purpúreas, parecidas al alga verde *Aphanothece* por las características de su desarrollo. Esféricas a cilindroelipsoidales, relativamente largas, incrustadas en una cápsula gelatinosa de considerables dimensiones. Al dividirse, las células hijas siguen segregando mucosidad, por lo que las distintas bacterias se separan unas de otras a distancia apreciable, y la cápsula común aparece así parcialmente llena solamente. Las células pueden volverse activamente móviles y separarse de la colonia; entonces se asemejan mucho a las de ciertas especies de *Chromatium*. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y producen en el curso de la oxidación azufre elemental, que las células almacenan en forma de glóbulos.

Género 6.º *Thiocystis*. Bacterias sulfurosas purpúreas, que forman colonias compactas, muchas de ellas incrustadas débilmente en una cápsula gelatinosa común. Las células individuales son esféricas a ovoides, a menudo con aspecto de diplococos. Las colonias pueden resaltar de la cápsula común como unidades más o menos grandes y salirse luego, a veces desbandadas, o bien se dividen los agregados dentro de la cápsula primitiva, y desprenden pequeñas unidades móviles o bacterias sueltas. En cultivos puros, con frecuencia se desarrollan como células sueltas y diplococos. Producen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, que tiñen las masas celulares de color purpurino a rojo. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y entonces se forma azufre elemental como producto intermedio de oxidación, que se deposita en gotas dentro de las células.

Género 7.º *Lamprocystis*. Bacterias sulfurosas purpúreas que forman agregados más o menos grandes de células encerradas en una cápsula gelatinosa común. Las células simples son esféricas a ovoides. Los agregados pequeños se parecen mucho a los de *Thiocystis*, hasta en la disposición en tétradas de las células en las colonias pequeñas. Los agregados grandes parecen comportarse de distinto modo durante el desarrollo: los pequeños grupos celulares sueltos o colonias no emergen de la cápsula gelatinosa hasta que la masa celular, relativamente compacta al principio, se rompe en grupos más diminutos, que forman una estructura más o menos reticular. Esto se ha atribuído a un cambio en el modo de división celular, que primero parece producirse en tres planos perpendiculares, y luego pasa a efectuarse en dos direcciones solamente. Cuando las células están libres, se mueven por medio de flagelos polares. En cultivo puro, este tipo tampoco suele formar agregados grandes con el desarrollo mencionado aquí como característico del género. Producen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, que dan a las masas celulares coloración rosadopurpurina a roja. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno,

y almacenan entonces azufre elemental en su interior, a modo de gránulos.

Género 8.º *Amoebobacter*. Bacterias sulfurosas purpúreas, generalmente en agregados compuestos de muchas células, sin cápsula común característica; sin embargo, puede observarse la formación de mucosidad en colonias muy pequeñas. Al crecer las células individuales, la cápsula revienta y la masa celular sale despacio, mientras que las bacterias permanecen unidas. Las colonias cambian de forma durante el desarrollo y en respuesta a influencias de ambiente; las células parecen ser móviles, y hacen moverse a toda la colonia. Producen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y entonces almacenan gránulos de azufre en su interior.

Género 9.º *Thiopolycoccus*. Bacterias sulfurosas purpúreas que forman agregados densos de estructura bastante sólida y aspecto irregular. En contraste con el género *Amoebobacter*, las colonias no parecen móviles ni tienden a formar agregados zoogleicos huecos, en lo que se diferencian del género *Lamprocystis*. Masas celulares unidas por mucosidad, que, sin embargo, no tiene forma de cápsula regular. Grumos grandes pueden agrietarse y presentar jirones y lóbulos irregulares, que siguen fragmentándose en grupos más pequeños de células. Las bacterias individuales son esféricas y no se ha observado movilidad. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, de modo que los agregados, de acuerdo con su empaquetamiento denso de células simples, aparecen francamente rojos. Son capaces de fotosíntesis cuando están en presencia de sulfuro de hidrógeno, y en tal caso, las células almacenan en su interior gotitas de azufre elemental.

Género 10.º *Thiospirillum*. Bacterias sulfurosas purpúreas, sueltas, de forma espiral, que se mueven por medio de flagelos polares. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, que dan a las células coloración rojopardusca a rojopurpurina. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno; durante ella producen y almacenan, como producto intermedio de oxidación, azufre elemental que se almacena en gotitas dentro de las células.

Género 11.º *Rhabdomonas*. Bacterias sulfurosas purpúreas, generalmente sueltas, en forma de bacilos largos a filamentos bastante irregulares, con abultamientos más o menos pronunciados, o formas mazudas y fusiformes. Los filamentos presentan a veces constricciones que les dan aspecto de sartas de cuentas; algunos están rodeados de una cápsula gelatinosa poco apreciable, que puede hacerse visible con tinta china. Los tipos de células menos deformados suelen ser móviles, con flagelos polares. Producen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, que tiñen las células de rojo rosado a rojo pupurino. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y entonces almacenan en su interior glóbulos de azufre como producto intermedio de oxidación.

Género 12.º *Rhodothece*. Bacterias sulfurosas purpúreas, sueltas, no agregadas en familias. Células esféricas, rodeadas de sendas

cápsulas amplias, raramente visibles sin coloración especial. No se ha observado movilidad. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, que tiñen las células de un color rojizo. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y almacenan entonces glóbulos de azufre, producto intermedio de oxidación de sulfuro.

Género 13.º *Chromatium*. Células sueltas, más o menos ovoides, arriñonadas o en forma de vibriones o de bastoncillos cortos; éstos últimos suelen ser gruesos y cilíndricos, con los extremos redondeados. Móviles por medio de flagelos polares. Contienen bacterioclorofila y pigmentos carotenoides, que dan a las células diversas tonalidades rojas. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y almacenan en este caso azufre elemental como producto de oxidación incompleta, en forma de glóbulos intracelulares.

Familia 2.ª *Atiorrodáceas*. Bacterias unicelulares de tamaño relativamente pequeño, en forma de esferas, bacilos cortos, vibriones, bacilos largos y espirales. Deben su movilidad a la presencia de flagelos polares; gramnegativos. Producen un sistema pigmentario compuesto de bacterioclorofila y uno o más carotenoides, que tiñen las células de color pardoamarillento, pardooliváceo, pardo oscuro o diversos matices de rojo. El color no suele observarse en células sueltas, sino sólo en masas celulares. Generalmente son microaerófilas, aunque muchos representantes pueden medrar con plena tensión de oxígeno atmosférico. Son capaces de desarrollarse en condiciones estrictamente anaeróbicas, pero sólo en cultivos iluminados, por efecto de un metabolismo fotosintético; éste depende de la presencia de donadores extraños de hidrógeno, tales como alcoholes, ácidos grasos, hidroxiácidos y cetoácidos, sin desprendimiento de oxígeno molecular. Los miembros capaces de medrar en presencia de aire pueden cultivarse también en la oscuridad, pero únicamente en condiciones aeróbicas.

Género 1.º *Rhodopseudomonas*. Bacterias esféricas y bacilares, móviles por medio de flagelos polares, gramnegativas. Contienen bacterioclorofila, que les permite desarrollar un metabolismo fotosintético, el cual depende de la presencia de substancias oxidables extrañas, y no provoca desprendimiento de oxígeno molecular. Aunque algunos miembros del género pueden oxidar substratos inorgánicos, ninguno parece ser estrictamente autotrófico, por la necesidad de factores orgánicos especiales de crecimiento. Producen pigmentos accesorios, que dan varias tonalidades a los cultivos, de amarillo pardusco a rojo intenso, especialmente al exponerlos a la luz.

Género 2.º *Rhodospirillum*. Bacterias espirales, que se mueven mediante flagelos polares; gramnegativas. Contienen bacterioclorofila y son en potencia fotosintéticas con el concurso de substancias oxidables extrañas; no producen oxígeno molecular. Son incapaces de medrar en medios estrictamente inorgánicos, aunque pueden utilizar hidrógeno como substrato oxidable, por la necesidad de nutrilitos orgánicos. Forman pigmentos accesorios, que comunican a los cultivos diversos matices, de rojo a pardo, especialmente si se desarrollan a la luz.

Familia 3.ª *Clorobacteriáceas*. Bacterias verdes, generalmente de pe-

queñas dimensiones, sueltas o en masas celulares de diversos tamaños y formas, que se desarrollan en medios abundantes en sulfuro de hidrógeno y expuestos a la luz. Por lo regular no contienen glóbulos de azufre, pero con frecuencia depositan azufre elemental fuera de las células. Contienen pigmentos verdes de naturaleza clorofílica, aunque no idénticos a las clorofilas comunes de las plantas verdes, ni a la bacterioclorofila. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno; no desprenden oxígeno.

Género 1.º *Chlorobium.* Bacterias sulfurosas verdes, sueltas o en cadenas; las primeras, de diferentes tamaños y formas, desde esféricas hasta bacilares relativamente largas, y las segundas, a veces arrolladas en espirales apretadas; a menudo unidas en cadena y generalmente incrustadas en una cápsula gelatinosa. Contienen un pigmento clorofílico distinto de las clorofilas comunes de plantas verdes y de la bacterioclorofila. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, con producción de azufre elemental, que expulsan al exterior. No forman esporas.

Género 2.º *Pelodicthyon.* Bacterias sulfurosas verdes; células sueltas ovoides a francamente bacilares, que producen cápsulas mucoides bastante amplias, y generalmente se unen en grandes colonias de formas características. Son inmóviles, y contienen pigmentos clorofílicos distintos de las clorofilas comunes de las plantas verdes y de la bacterioclorofila. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, pero no almacenan glóbulos de azufre en el interior de las células.

Género 3.º *Clathrochloris.* Bacterias sulfurosas verdes diminutas, generalmente esféricas y dispuestas en cadenas que se unen en agregados a modo de celosía, algo parecidos a los de *Pelodictyon clathratiforme* y *P. aggregatum.* Las células suelen contener glóbulos de azufre. Coloración verdeamarillenta; inmóviles.

Género 4.º *Chlorobacterium.* Bacterias sulfurosas verdes (?), que vegetan simbióticamente a modo de envoltura externa sobre células de protozoos, tales como amebas y flagelados. Células bacilares, a veces ligeramente curvas; verdosas, inmóviles.

Género 5.º *Chlorochromaticum.* Bacterias sulfurosas verdes, ovoides a bacilares, con extremos redondeados; se presentan en agregados con aspecto de toneles y compuestos por una bacteria incolora bastante grande, con un flagelo polar, rodeada de las bacterias verdes, dispuestas en cuatro a seis filas, y en capas de dos a cuatro células. Todo el conglomerado funciona como unidad, es móvil, y se reproduce por escisión más o menos simultánea de sus componentes. Los elementos verdes contienen un pigmento clorofílico distinto de las clorofilas comunes de plantas verdes y de la bacterioclorofila. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno; pero no almacenan glóbulos de azufre dentro de las células.

Género 6.º *Cylindrogloea.* Bacterias sulfurosas verdes, consistentes en pequeñas células ovoides a bacilares, que crecen asociadas a una bacteria filamentosa incolora central, formando así colonias de forma cilíndrica; son inmóviles. El componente verde contiene un pigmento clorofílico diferente de las clorofilas comunes de plantas verdes y de la bacterioclorofila. Capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, sin depositar glóbulos de azufre en el interior de las células.

Orden II. *Actinomicetales.* Estos microorganismos forman células oblongas con manifiesta tendencia a ramificarse. Sus hifas no rebasan 1,5μ, y generalmente su diámetro es de 1μ o algo menos. En las *Microbacteriáceas* el micelio falta, o es rudimentario; no se producen esporas y las células son acidorresistentes. Las *Actinomicetáceas* y *Estreptomicetáceas* suelen producir un micelio ramificado característico y se multiplican mediante esporas especiales, oidiosporas o conidios. Se forman esporas especiales por fragmentación del plasma en hifas esporíferas rectas o espirales; las oidiosporas resultan de la segmentación o de la división transversal de hifas, a semejanza de la formación de oidios entre los hongos auténticos; los conidios se producen sueltos, al extremo de conidióforos simples o ramificados. Crecen fácilmente en medios artificiales y forman colonias bien desarrolladas, cuya superficie, especialmente en las dos familias mencionadas, puede cubrirse de un micelio aéreo. Algunas componen colonias incoloras o blancas y otras dan origen a diversos pigmentos; hay especies acidorresistentes en parte. En cuanto a temperatura, la mayoría son mesófilas, pero otras son termófilas. Ciertas formas pueden medrar con tensión baja de oxígeno. El orden, en conjunto, se compone de especies saprófitas, pero también incluye algunas parásitas y a veces patógenas para animales y plantas.

Familia 1.ª *Microbacteriáceas.* Filamentos delgados, bacilos rectos o ligeramente curvos, a menudo de forma irregular, y ligeramente ramificados a veces. Con frecuencia se tiñen de modo desigual, es decir, muestran diferencias de reacción a los colorantes dentro de la célula (burbujas). Inmóviles, sin conidios, aerobios, grampositivos, acidorresistentes. La especies patógenas tardan en desarrollarse (varias semanas); las del suelo, el agua y la vegetación crecen con más rapidez (en varios días).

Género 1.º *Mycobacterium.* La misma descripción que para la familia.

Familia 2.ª *Actinomicetáceas.* Micelio no tabicado durante las primeras fases del desarrollo; luego puede tabicarse y dividirse en segmentos cortos, bacilares o esféricos, o bien permanecer sin tabiques y producir esporas sobre hifas aéreas. Los gérmenes, en medios de cultivo, son incoloros o producen diversos pigmentos; algunas especies resisten a los ácidos. La familia se distingue de la precedente por la formación de un micelio verdadero.

Género 1.º *Nocardia.* Filamentos o bacilos finos, con frecuencia inchados, y a veces ramificados; el micelio, después de alcanzar cierto tamaño, toma el aspecto de vegetaciones bacterianas. En cultivos viejos se encuentran bacilos más cortos y formas cocoides. No dan conidios; se tiñen fácilmente, y a veces muestran ligera resistencia a los ácidos. Inmóviles, sin endosporas, aerobios, grampositivos. Las colonias se parecen a primera vista a las del género *Mycobacterium.* Como fuente de energía utilizan a menudo parafina, fenol y *m*-cresol.

En sus primeras fases de desarrollo en medios de cultivo, la estructura de *Nocardia* es similar a la de *Actinomyces,* porque ambos producen micelio. Las hifas forman numerosas

ramificaciones genuinas; los diámetros de las hifas varían entre 0,5 y 1 μ, generalmente entre 0,7 y 0,8 μ, según las especies. El micelio no está tabicado. Sin embargo, el desarrollo ulterior de *Nocardia* difiere notablemente del de *Actinomyces*: los filamentos no tardan en constituir paredes transversales, y todo el micelio se fragmenta en células cortas, regularmente cilíndricas, y luego en células cocoides. En medios de cultivo recientes, las células cocoides originan micelios; el ciclo entero de desarrollo de *Nocardia* sigue por espacio de dos a siete días; lo más frecuente es que las células cocoides se formen entre los días 3.º y 5.º, pero en ciertas especies se encuentran ya en el segundo día.

En cultivos viejos de *Nocardia* se descubren a veces numerosas clamidosporas, que se forman del mismo modo que las de hongos verdaderos: el plasma interno de los filamentos del micelio se condensa en porciones alargadas. En estos cultivos viejos muchas células cocoides se hacen resistentes, mayores que las vegetativas, con plasma más espeso que el de éstas; en medios recientes, germinan como las esporas de *Actinomyces* y forman dos a tres tubos germinativos. Además de las referidas células, en cultivos viejos de *Nocardia* se encuentran a menudo numerosas formas de involución; las células son delgadas, regularmente cilíndricas o cocoides, y muchas veces se transforman en una serie de ampollas esféricas o elípticas, o se hacen claviformes.

Las bacterias del género *Nocardia* se reproducen por escisión y gemación; a veces forman esporas especiales; la emisión de yemas es frecuente, por la superficie lateral de las células; cuando han alcanzado cierto tamaño, se desprenden y dan origen a células bacilares o filamentosas. Las esporas se producen por fragmentarse el plasma celular en porciones, formando generalmente 3 a 5 esporas; cada una de las porciones se redondea, se cubre de una membrana y se transforma en espora; la membrana de la célula madre se disuelve y desaparece. Las esporas germinan del mismo modo que las de *Actinomyces*; forman tubos germinativos que se convierten en micelio.

Las colonias son de consistencia pastosa o harinosa y se cogen bien con un asa de alambre; se extienden sobre vidrio, y a veces enturbian el caldo. Las colonias superficiales son lisas, rugosas o con pliegues. Las bacterias típicas de *Nocardia* nunca dan micelio aéreo; pero hay cultivos cuyas colonias aparecen cubiertas de una delgada capa de hifas aéreas cortas, que se fragmentan en oidiosporas cilíndricas. Muchas especies forman pigmentos; sus colonias son de color azul, violado, rojo, amarillo o verde, pero son más frecuentes las incoloras.

Género 2.º *Actinomyces*. Producen micelio verdadero; el vegetativo se divide en elementos de tamaño irregular, a veces con ramificación angular. No dan conidios, ni son acidorresistentes; anaerobios a microaerófilos; patógenos para el hombre y los animales.

Familia 3.ª *Estreptomicetáceas*. El micelio vegetativo no se fragmenta en formas bacilares o cocoides. Conidios sobre esporóforos. En principio son formas del suelo; a veces termófilas en estiércol putrefacto. Algunas especies son parásitas.

Género 1.º *Streptomyces*. Desarrollo en forma de micelio muy ramificado, con micelio aéreo típico. Conidiosporas en cadenas. Aerobios; formas saprófitas terrestres, menos comúnmente parásitas en plantas o animales.

A base de la estructura de las hifas esporulantes, este género puede dividirse en cinco grupos:

1.º Hifas esporulantes rectas, ramificación monopódica, sin espirales regulares en ningún caso.
2.º Hifas esporíferas, dispuestas en grupos.
3.º Formación espiral en micelio aéreo, con espirales largas, abiertas.
4.º Formación espiral en micelio aéreo; espirales cortas, apretadas.
5.º Hifas esporíferas dispuestas sobre el micelio en verticilos o copetes.

Género 2.º *Micromonospora*. Micelio bien desarrollado, fino, sin tabiques, de 0,3 a 0,6 μ de diámetro. Se desarrollan bien en substrato, y nunca forman un verdadero micelio aéreo. Se multiplican por medio de conidios, producidos aisladamente en el extremo de conidióforos especiales, sobre la superficie del micelio del substrato. Conidióforos cortos y simples, ramificados o en pelotones. Fuertemente proteolíticos y diastáticos; muchos son termófilos, y pueden medrar a 65° C. Suelen ser saprófitos: generalmente se encuentran en abonos muy calientes, en el polvo, en el suelo y en el fondo de lagunas.

Orden III. *Clamidobacteriales*. Bacterias filamentosas, incoloras, semejantes a algas, con vaina o sin ella, ramificadas o con ramas falsas resultantes de una desviación lateral de las células del filamento dentro de la vaina; esto origina un nuevo filamento, y la vaina se ramifica, mientras que los filamentos están separados. La vaina puede componerse enteramente de hidróxido férrico, o de una matriz orgánica impregnada de hierro, o ser orgánica toda ella. Los filamentos muestran a veces movilidad por efecto de un deslizamiento como el de las algas verdeazuladas (*Oscilatoriáceas*). Pueden desarrollarse conidios y planetocitos flagelados, pero nunca endosporas. Formas de agua dulce y marinas.

Familia 1.ª *Clamidobacteriáceas*. Bacterias filamentosas, a menudo con ramas falsas. Las vainas pueden estar impregnadas o no de hidróxido férrico. Las células se dividen sólo transversalmente; las desprendidas (planetocitos), si se desarrollan, son generalmente móviles por medio de flagelos. Se encuentran habitualmente en agua dulce.

Género 1.º *Sphaerotilus*. Filamentos incoloros ligados, con ramas falsas, aunque esto puede ser excepcional en algunas especies. Los filamentos se componen de células bacilares o elipsoidales, rodeadas de una sólida vaina. Multiplicación por conidios inmóviles y también por planetocitos, estos últimos provistos de flagelos en penacho.

Género 2.º *Clonothrix*. Filamentos ligados, con ramas falsas, como los de *Sphaerotilus*. Vainas orgánicas, incrustadas de hierro o manganeso, ensanchadas por la base y aguzadas hacia la punta. Células incoloras, cilíndricas. Reproducción mediante conidios esféricos dispuestos en cadenas, por escisión transversal de las

células; la formación de conidios es acrópeta, y se limita a ramas cortas de la porción más joven de los filamentos.

Género 3.º *Leptothrix*. Filamentos de células cilíndricas incoloras, con una vaina, primero, delgada y sin color, y luego, más gruesa, amarilla o parda, incrustada de hidróxido férrico; el óxido se puede disolver por la acción de ácido diluído, y entonces se ven bien las células interiores. Se multiplican por división y separación de células, o mediante planetocitos cilíndricos. Puede producirse ramificación falsa.

Familia 2.ª *Crenotricáceas*. Filamentos no ramificados, unidos a un substrato firme, con extremos y bases diferenciados. Vainas bien visibles, delgadas e incoloras por la punta, gruesas e incrustadas de hierro por la base. Células cilíndricas a esféricas, que se dividen por tres planos para dar conidios esféricos inmóviles.

Género 1.º *Crenothrix*. La misma descripción que para la familia.

Familia 3.ª *Begiatoáceas*. Microorganismos filamentosos, compuestos de cadenas de células; éstas son generalmente invisibles sin teñir. Estructura muy similar a la de las *Oscilariáceas*, pero sin clorofila ni ficocianina. En presencia de sulfuro de hidrógeno, los filamentos contienen glóbulos de azufre. No se conocen elementos reproductivos especiales.

Género 1.º *Thiothrix*. Filamentos inmóviles, segmentados, con una delicada vaina, y diferenciados en base y ápice. La primera les permite fijarse a objetos sólidos mediante una patilla gelatinosa. Reproducción por escisión transversal de los segmentos, y por obra de conidios bacilares, probablemente segmentos apicales liberados. Durante algún tiempo, los conidios muestran movilidad reptante; luego se detienen sobre objetos sólidos, y se desarrollan en forma de nuevos filamentos.

Género 2.º *Beggiatoa*. Microorganismos filamentosos, móviles, segmentados, sueltos o en masas afieltradas cremosas, en donde cada filamento conserva su individualidad. No están fijos, ni se ha comprobado definitivamente que tengan vaina. Los movimientos de los hilos dependen de un substrato sólido, sobre el cual se deslizan lo mismo que las especies de *Oscillatoria*. Estos deslizamientos van acompañados a menudo de rotación sobre el eje longitudinal. Reproducción por escisión transversal de segmentos; los hilos pueden también fragmentarse en unidades menores, cada una de las cuales sigue viviendo por separado. Este último modo de reproducción corresponde al de *Thiothrix* mediante conidios o segmentos móviles.

Género 3.º *Thiospirillopsis*. Bacterias sulfurosas filamentosas incoloras, segmentadas y arrolladas en espiral. Movilidad reptante, combinada con rotación, de modo que los filamentos avanzan a modo de sacacorchos. Las puntas ejecutan movimientos de oscilación. Se parecen a las del género *Spirulina*, entre las *Oscilatoriáceas*.

Género 4.º *Thioploca*. Filamentos parecidos a los de *Beggiatoa*, pero en haces paralelos o trenzados, encerrados en una ancha vaina gelatinosa común, a menudo incrustada de detritos por fuera. Dentro de la vaina, cada uno de los filamentos se mueve como los de *Beggiatoa*. Los filamentos están divididos en segmentos, los terminales generalmente aguzados.

Familia 4.ª *Acromatiáceas*. Células grandes, esféricas a ovoides, a veces bacilares; pueden contener glóbulos de azufre, o cristales de carbonato cálcico, o ambas cosas. No poseen pigmentos fotosintéticos. Hay formas de agua dulce y marinas.

Género 1.º *Achromatium*. Microorganismos unicelulares; células grandes, cilíndricas cortas, con los extremos hemisféricos, o bien elipsoidales a esféricas. Las células se dividen por una construcción en el punto medio. Los movimientos, cuando existen, son lentos, a sacudidas giratorias, y dependen de la presencia de un substrato. No se conocen órganos especiales de locomoción. En su lugar de origen, las células contienen gotitas de azufre, y a veces otras inclusiones, tales como esférulas grandes de carbonato cálcico.

Género 2.º *Thiovulum*. Microorganismos unicelulares, redondos a ovoides. Citoplasma concentrado con frecuencia en un extremo de la célula, con el espacio remanente ocupado por una gran vacuola. Reproducción por constricción, que en las últimas fases se confunde con escisión. Movimientos activos, acompañados de rotación rápida. No se ha demostrado definitivamente la presencia de flagelos, pero el tipo de locomoción hace suponer que los haya polares. Normalmente contienen glóbulos de azufre en el citoplasma; por tanto, suelen estar también concentrados en un extremo de la célula.

Género 3.º *Macromonas*. Bacterias incoloras, cilíndricas a arriñonadas, activamente móviles por medio de un solo flagelo polar. Multiplicación por constricción. Se caracterizan sobre todo por contener inclusiones de carbonato cálcico en forma de esférulas grandes. En su asiento natural pueden alojar asimismo pequeños glóbulos de azufre.

Orden IV. *Mixobacteriales*. Las células vegetativas, relativamente largas, delgadas, flexibles, y sin flagelos, producen una colonia extensa de poco espesor (seudoplasmodio). Las células se disponen a menudo en grupos de dos o tres a una docena o más, con sus ejes longitudinales paralelos. El grupo se mueve como una unidad, reptando o serpeando, y se aparta del centro de la colonia. Las células móviles cubren el substrato de una tenue capa gelatinosa, sobre la cual descansan. Durante la esporulación (que ocurre en todas las formas, salvo en las del género *Cytophaga*), las células se acortan mucho, y en algunos casos se vuelven esféricas o cocoides, con paredes gruesas y muy refringentes. Forman cuerpos fructíferos todas las especies, salvo las *Citofagáceas* y las del género *Sporocytophaga*, de las *Mixococáceas*; tales cuerpos consisten a veces en grupos de quistes que encierran las esporas (células en reposo), o en masas de baba mucilaginosa que rodean numerosas esporas acortadas, bacilares o cocoides, y pueden ser sésiles o pedunculados. Regularmente presentan un color brillante anaranjado, amarillo, rojo o pardo, aunque también se han descrito cuerpos fructíferos incoloros y negros. Los miembros del género *Sporocytophaga* no se sabe que los tengan, pero si se han visto a menudo densas aglomeraciones de bacilos acortados o cocos, que pueden interpretarse como formas primitivas de cuerpos fructíferos.

Fisiológicamente, la mayoría de las especies se desarrollan con gran semejanza, y prefieren substratos abundantes en substancias celulósicas u otros carbohidratos complejos.

La mayoría de las especies conocidas son saprófitas o coprófilas, y pueden encontrarse en estiércol, en el suelo, en madera, paja, hojas podridas, etc. Con frecuencia parecen vivir en estrecha asociación con diversas bacterias genuinas, de las que son probablemente parásitas. Muchas se han cultivado en estiércol.

Familia 1.ª *Citofagáceas.* Bacilos flexibles, a veces puntiagudos, con movimiento de reptación; carecen de cuerpos fructíferos y de esporas (microcistos). Comprende un solo género.

Género 1.º *Cytophaga.* La misma descripción que para la familia.

Familia 2.º *Arcangiáceas.* En los microorganismos pertenecientes a esta familia, el enjambre (seudoplasmodio) produce cuerpos fructíferos irregularmente dilatados o retorcidos, o desarrollan vegetaciones en forma de columna o dedo, por lo común sin una membrana bien diferenciada.

Género 1.º *Archangium.* La masa de bacilos acortados envueltos en mucilago forma un cuerpo fructífero a modo de almohadilla o más redondeado, superficialmente hinchado o tuberoso, incluso con divisiones córneas, sin membrana. En su interior se puede ver una masa que se asemeja a intestinos arrollados, con las asas uniformes o irregularmente enlazadas, sueltas o adheridas entre sí; los extremos pueden ser ensanchados y callosos. En lugar de mebrana, a veces sólo hay una envoltura de mucilago suelto.

Género 2.º *Stelangium.* Los cuerpos fructíferos tienen forma de columna o dedo; a veces están bifurcados, sin pedúnculo definido, y se yerguen sobre el substrato.

Familia 3.ª *Sorangiáceas.* Los bastoncitos acortados de los cuerpos fructíferos se hallan en quistes angulares, por lo general relativamente pequeños, y de configuración resueltamente poligonal. A menudo, muchos de estos quistes están rodeados de una membrana común; el quiste primero se diferencia de los angulares o secundarios. No se conocen formas pedunculadas.

Género 1.º *Sorangium.* Quistes reunidos en cuerpos fructíferos redondos. Las demás características del género son las de la familia.

Familia 4.ª *Poliangiáceas.* En los cuerpos fructíferos, los bacilos más o menos acortados descansan en quistes redondeados de forma definida. La membrana, bien patente, se compone de babaza endurecida, y es amarilla, roja o pardusca. A veces, los quistes están unidos por una membrana mucilaginosa claramente perceptible, restos de mucosidad vegetativa, o fuertemente aglomerada por residuos apenas visibles de la misma, o también pueden desarrollarse individualmente o en grupos sobre un pedúnculo. En las formas de desarrollo superior, el pedúnculo se ramifica, y en los extremos de las ramas se hallan los quistes.

Género 1.º *Polyangium.* Quistes redondeados o arrollados, envueltos por una membrana bien desarrollada. Pueden estar libres o incrustados en una segunda capa de mucosidad.

Género 2.º *Synangium.* Los quistes, con punta en el ápice, se reúnen más o menos completamente para formar cuerpos fructíferos en forma de roseta, hemisféricos o esféricos.

Género 3.º *Melittangium.* Quistes de color rojoanaranjado pardusco, sobre un corto pedúnculo blanco, a modo de seta del género *Boletus.* Los bacilos del interior forman ángulo recto con la membrana; al germinar, ésta queda incolora y con aspecto de panal.

Género 4.º *Podangium.* Quistes de color castaño o pardo rojizo, dispuestos individualmente sobre un pedúnculo blanco, más o menos perfecto.

Género 5.º *Chondromyces.* Los quistes están apretados en el extremo de un pedículo colorado (cistóforo), que puede ser simple o ramificado.

Familia 5.ª *Mixococáceas.* Los bacilos se acortan al fructificar (formación de quistes), y se convierten en esporas o microcistos esféricos o elipsoidales. Después de la germinación, la célula vegetativa se desarrolla de la espora por un proceso análogo al de gemación, perforándola por el punto de emergencia y dejándola completamente vacía. En tres de los géneros se producen cuerpos fructíferos definidos. En *Sporocytophaga,* las esporas (microcistos) derivan de las células vegetativas sin que se formen cuerpos fructíferos.

Género 1.º *Myxococcus.* Esporas esféricas en cuerpos esporíferos cónicos, esféricos, o a veces ovoides, erguidos, que se mantienen asociados por una mucosidad móvil, más o menos flúida.

Género 2.º *Chondrococcus.* Esporas incrustadas en un mucilago viscoso, que se endurece. Cuerpos fructíferos divididos por articulaciones o constricciones; a menudo son ramificados, y suelen ser relativamente pequeños.

Género 3.º *Angiococcus.* El cuerpo fructífero consiste en numerosos quistes redondos (discoideos), de membrana fina, y con esporas en su interior.

Género 4.º *Sporocytophaga.* Microcistos esféricos o elipsoidales, dispuestos con holgura en masas de mucilago entre las células vegetativas; carecen de cuerpos fructíferos.

Orden V. *Espiroquetales.* Cuerpo celular delgado, flexuoso, en forma de espiral, con una espira completa, por lo menos, de 6 a 500 μ de longitud. Algunas formas presentan un filamento axial, una cresta o resalto lateral, o estriaciones transversales; el protoplasma no ofrece otras particularidades. Las formas pequeñas tienen a veces un índice de refringencia inferior al de las bacterias, por lo que los organismos vivos sólo pueden verse por iluminación sobre campo oscuro. Algunas formas toman con dificultad los colores de anilina; la coloración de Giemsa es uniformemente eficaz. Se multiplican por escisión transversal, y no se conoce ciclo sexual. Algunas especies dan gránulos en huéspedes vectores; todas son móviles, sin órganos de locomoción: movimiento sinuoso o por rotación sobre el eje longitudinal, sin polaridad. Viven libres, saprófitos y parásitos.

Familia 1.ª *Espiroquetáceas.* Microorganismos espirales grandes, de 30 a 500 μ de longitud, con estructura protoplasmática definida. Se encuentran en aguas mansas, dulces o saladas, y en el conducto intestinal de moluscos bivalvos (lamelibranquios).

Género 1.º *Spirochaeta.* No parásitos, con cuerpo flexible ondulante y extremos aguzados flageliformes, o sin ellos. Protoplasma arrollado en espiral en torno a un filamento axial bien definido, sin membrana patente ni estriaciones transversales. Movimiento reptante; espiral primaria permanente. Libres en el fango de

aguas dulces o saladas, especialmente en presencia de sulfuro de hidrógeno. Comunes en aguas residuales o corrientes.

Género 2.º *Saprospira*. Protoplasma espiral, sin filamento axial apreciable; espirales más bien tenues. Marcas o tabiques (?) transversales en ejemplares teñidos o sin teñir; membrana protoplasmática visible. Movimiento activo y giratorio. Viven libres en el fango marino.

Género 3.º *Cristispira*. Cuerpos celulares flexuosos, en espirales grandes, de 28 a 120 μ de longitud. Se caracterizan por una cresta o membrana delgada de relieve variable que cubre por un lado toda la longitud del cuerpo. Estriaciones transversales; movimiento activo. Se encuentran en el conducto intestinal de moluscos.

Familia 2.ª *Treponematáceas*. Espirales grandes o pequeñas, de 4 a 16 μ de longitud; formas más largas por división incompleta o diferida. El protoplasma no muestra caracteres manifiestos. Algunos presentan filamentos terminales. Espirales regulares o irregulares, flexibles o relativamente rígidos, en parte visibles sólo con iluminación sobre campo oscuro. Parásitos de vertebrados, con pocas excepciones. Los hay patógenos, y muchos de ellos pueden cultivarse.

Género 1.º *Borrelia*. Microorganismos de 8 a 16 μ de longitud, toscos, aplanados, irregulares, con unas pocas espirales obtusas; generalmente con terminales filamentosas finas. Se tiñen fácilmente con colorantes ordinarios de anilina. Su índice de refracción viene a ser el de las bacterias genuinas. Parásitos en muchas especies animales; algunos son patógenos para el hombre, y otros para mamíferos y aves; generalmente se encuentran hematófitos en las membranas mucosas. Se transmiten a veces por mordeduras de artrópodos.

Género 2.º *Treponema*. Microorganismos de 3 a 18 μ de longitud, y más largos por división incompleta. Protoplasma en espirales agudas, regulares o irregulares, a veces con filamento terminal. Ciertas especies toman sólo la coloración de Giemsa. Refringencia débil con iluminación sobre campo oscuro en preparaciones vivas. Se cultivan en condiciones estrictamente anaeróbicas. Patógenos y parásitos en el hombre y los animales. Generalmente producen lesiones locales en los tejidos.

Género 3.º *Leptospira*. Microorganismos finamente arrollados, de 6 a 20 μ de longitud. Espirales de 0,3 μ de profundidad y 0,4 a 0,5 μ de amplitud. En medios líquidos, uno de los extremos, o ambos, están curvados a modo de gancho semicircular, que mide 1/10 a 1/8 del germen entero. Movimientos giratorios en medio líquido, y vermiformes en agar semisólido, hacia delante o atrás. En preparaciones vivas se ven sólo sobre campo oscuro. Se tiñen con dificultad, excepto con Giemsa o impregnación argéntica. Necesitan oxígeno para desarrollarse.

Suplemento I.

Orden. *Rickettsiales*. Microorganismos pequeños, bacilares, cocoides o esféricos, irregulares, que se tiñen débilmente con colorantes de anilina. Gramnegativos, habitualmente no filtrables. Se cultivan fuera del cuerpo, a lo sumo, sólo en tejidos vivos, huevos empollados o raramente en medios que contengan humores orgánicos. Parásitos íntimamente asociados a células de los tejidos y eritrocitos, principalmente en vertebrados, y con frecuencia en artrópodos, que sirven de vectores. Pueden pertenecer a este grupo los parásitos intracelulares de protozoos. Capaces de provocar enfermedades en el hombre y los animales, o en uno y otros.

Familia 1.ª *Rickettsiáceas*. Microorganismos pequeños, a menudo pleomórficos, bacilares, ovoides, cocoides y cocos aparentes, parecidos a bacterias, íntimamente asociados a tejidos de artrópodos, en general intracelulares. Se tiñen débilmente con colores de anilina; gramnegativos. Hasta ahora no se han cultivado en medios sin células. Pueden ser parásitos del hombre y de animales, y provocan enfermedades (tifus abdominal y análogas) transmitidas por vectores artrópodos (piojos, pulgas, garrapatas, ácaros y probablemente otros ectoparásitos).

Familia 2.ª *Bartoneláceas*. Microorganismos pequeños, a menudo pleomórficos, bacilares, cocoides, anulares, filamentosos y perlados, que se tiñen débilmente con colores de anilina, pero toman bien el Giemsa; gramnegativos. Parásitos de los eritrocitos humanos y de otros vertebrados. Se sabe que los transmiten artrópodos en algunos casos. Gérmenes productores de bartoneliasis humana, hemobartoneliasis, grahameliasis y eperitrozoenosis en animales inferiores. Difieren de los protozoos, que también parasitizan eritrocitos, en que todo el germen se tiñe sin diferenciación en citoplasma y núcleo.

Familia 3.ª *Clamidozoáceas*. Microorganismos pequeños, a menudo cocoides, habitualmente con ciclo evolutivo característico. Se tiñen con colorantes de anilina; gramnegativos. Se conducen como parásitos intracitoplasmáticos obligados. No se han cultivado en medios exentos de células. No se conocen normas adecuadas de clasificación para los miembros aislados últimamente.

Suplemento II.

Orden. *Virales*. Agentes etiológicos de enfermedades, típicamente pequeños y capaces de atravesar filtros que retienen bacterias. Aumentan sólo en presencia de células vivas, y dan origen a nuevas cepas por mutación, sin surgir de nuevo. Son numerosos los virus que han demostrado no ser filtrables; sin embargo, es costumbre incluirlos con los conocidos como filtrables, por su analogía en cuanto a otros atributos y a las enfermedades que provocan. Algunos no conocidos como filtrables pueden inocularse sólo mediante técnicas especiales, por ejemplo, recurriendo a injertos o a insectos vectores, y no se han desarrollado métodos para comprobar su filtrabilidad; además, no es seguro que una norma tan sencilla como la del tamaño, en términos de filtrabilidad, resulte adecuada como indicador de los límites del grupo natural. Provocan enfermedades en bacterias, plantas y animales.

Suplemento III.

Familia. *Borrelomicetáceas*. Microorganismos de la pleuroneumonía y otros afines.

I. Grupo de la pleuroneumonía. Los microorganismos son delicados y frágiles. Sin especiales precauciones, se deforman a menudo o se destruyen totalmente en preparaciones microscópicas. Los cultivos contienen elementos pleomórficos: gránulos diminutos, bacilos, filamentos bacilares y formas redondas de tamaños variables, desde 1 a 10 μ y más. Formas redondas autolisadas pueden unirse en grandes burbujas vacías. Las formas redondas forman parte de un ciclo reproductivo; resultan de la tumefacción de las baci-

lares y los filamentos, y reproducen gránulos de estos últimos por segmentación interna y generación múltiple. En razas bovinas recién aisladas, los filamentos muestran ramificación aparente o genuina, y reproducen las formas pequeñas por segmentación. Las unidades evolutivas más pequeñas pueden no ser mayores de 0,15 a 0,18 μ, y atraviesan filtros que retienen bacterias. En agar se desarrollan numerosas colonias minúsculas (0,1 a 0,6 mm); las colonias invaden el agar y, al cabo de dos a cinco días de vegetación, presentan un centro opaco incrustado en el medio, con una delgada zona periférica. La superficie tiene un aspecto rugoso o granular, por el desarrollo y la autólisis de las formas mayores. Tras unos días de crecimiento, en los cultivos suele observarse una pronunciada autólisis. Las cepas parásitas requieren suero animal fresco para medrar.

II. Microorganismos de clasificación incierta. Similares al grupo de la pleuroneumonía.

III. Microorganismos semejantes a los de pleuroneumonía, aislados de cultivos bacterianos.

Puede apreciarse que la clasificación de las bacterias es tarea sumamente difícil, más aún a medida que van descubriéndose y estudiándose nuevas especies. Algunos microorganismos incluídos al principio en ciertos géneros, hoy figuran en otros o constituyen géneros nuevos; esto no es de extrañar, si se tienen en cuenta las dificultades que ofrece el estudio de seres tan diminutos. Es muy probable que nunca acepten los bacteriólogos una clasificación única íntegramente; pero la expuesta aquí es sin duda la mejor de las propuestas hasta ahora, y su uso es general en Norteamérica.

REFERENCIAS

Ainsworth, G. C.: The rules of nomenclature for microorganisms, *J. Gen. Microbiol.*, 2: 97, 1948.

Andrewes, C. H.: Viruses and Linnaeus, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 28: 211, 1951.

Bisset, K. A. y F. W. Moore: The relationship of certain branched bacterial genera, *J. Gen. Microbiol.*, 3: 387, 1949.

— y —, «Bacteria», Edinburgh, E. y S. Livingstone Ltd., 1952.

Breed, R. S., E. G. D. Murray y A. P. Hitchens: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1948.

Buchanan, R. E., R. St. John-Brooks y R. S. Breed: International Bacteriological Code of Nomenclature, *J. Bact.*, 55: 287, 1948.

Burkholder, W. H. y M. P. Starr: The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas and Xanthomonas*, *Phytopathology*, 38: 494, 1948.

Comité de Técnica Bacteriológica: «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Geneva, N. Y., Biotech Publications, 1948.

Connecticut State Department of Health: Nomenclature of pathogenic and parasitic organisms, Hartford, 1945.

Doetsch, R. N. y M. J. Pelczar, Jr.: The microbacteria. I. Morphological and physiological characteristics, *J. Bact.*, 56: 37, 1948.

Evans, A. C. y A. L. Chinn: The enterococci: with special reference to their association with human disease, *J. Bact.*, 54: 495, 1947.

Ewing, W. H.: *Shigella* nomenclature, *J. Bact.*, 56: 633, 1949.

Foubert, E. L., Jr. y H. C. Douglas: Studies on the anaerobic micrococci. I. Taxonomic considerations, *J. Bact.*, 56: 25, 1948.

Muñoz, J., M. Scherago y R. H. Weaver: A serological study of members of the *Pseudomonas* genus, *J. Bact.*, 57: 269, 1949.

Pederson, C. S.: The genus *Pediococcus*, *Bact. Rev.*, 13: 225, 1949.

Skerman, V. B. D.: A mechanical key for the generic identification of bacteria, *Bact. Rev.*, 13: 175, 1949.

Stanier, R. Y.: The *Cytophaga* group: A contribution to the biology of myxobacteria, *Bact. Rev.*, 6: 143, 1942.

Van Niel, C. B.: The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria, *Bact. Rev.*, 8: 1, 1944.

Waksman, S. A. y A. T. Henrici: The nomenclature and classification of the actinomycetes, *J. Bact.*, 46: 337, 1943.

Winogradsky, S.: Sur la classification des bacteries, *Ann. inst. Pasteur*, 82: 125, 1952.

CAPÍTULO XVII

VARIACIONES DE LAS BACTERIAS

Aun cuando las bacterias son muy pequeñas y unicelulares, su organización es muy compleja. Una célula bacteriana se divide en dos microorganismos, cada uno de los cuales se asemeja a la célula inicial en aspecto y propiedades. Generalmente se supone que las bacterias contienen genes, individualmente capaces de duplicarse, y que los genes se dividen antes de hacerlo la célula, para pasar la mitad a una célula nueva y la segunda mitad a la otra. Los genes pueden separarse o unirse para formar cromosomas, o bien juntarse de distinto modo, por ejemplo, en una placa delgada; esto no se comprende muy bien.

Generalmente se cree que la fecundación y la miosis no se han demostrado en las bacterias. Por consiguiente, la genética bacteriana se limita en gran parte a la naturaleza del fenómeno de la variación, tan difundido entre las bacterias, y que equivale a la mutación de genes en otros organismos.

Individualidad de las bacterias. Rahn (1951) definió la individualidad como diferencia de acción, reacciones y morfología entre los distintos organismos de una misma especie.

Las moléculas no tienen individualidad; las de un compuesto puro son todas iguales. Un virus cristalizado consta de una sola molécula, y, por ser éstas todas iguales, no puede tener individualidad. En cambio, hay individualidad en los organismos compuestos de muchas moléculas, y las bacterias la tienen, por cumplir esta condición.

Las bacterias que se desarrollan en cultivo puro y condiciones idénticas pueden diferir mucho en cuanto a morfología y lapso de generación. Las diferencias de este último no son heredables, ya que las células de división más rápida no producen una descendencia que se divida con rapidez. Probablemente obedecen a la oportunidad de duplicación de cada gene, y esta oportunidad se puede calcular matemáticamente con aproximación. La individualidad es distinta de la genética; se impone a los factores genéticos, y tiene una base matemática distinta de las leyes de herencia. El número de genes por célula se puede calcular a partir del grado de individualidad del ritmo de crecimiento.

Variación. La variación puede definirse como una divergencia entre los caracteres morfológicos o fisiológicos (usualmente ambos) de una especie y los observados en las células originales del cultivo. La palabra suele emplearse como sinónima de disociación.

Durante los primeros años de la Bacteriología, predominaban los bacteriólogos pleomorfistas, en opinión de los cuales una especie bacteriana podía existir en más de una forma celular. Unos años más tarde, este concepto se modificó en favor de la hipótesis monomórfica, o de fijeza de la forma celular bacteriana. Las que se apartaban más o menos de los tipos normales se desechaban generalmente como formas de involución, células degeneradas o especies diferentes, simples factores de contaminación. En la actualidad se han acumulado pruebas que apoyan la hipótesis pleomórfica primitiva, o de características morfológicas variables en un organismo.

Es profusa la bibliografía que trata de tales formas aberrantes, y está demostrado plenamente que no puede mantenerse ya el criterio del monomorfismo. La cuestión de la inestabilidad de las especies bacterianas es de enorme importancia para todas las ramas de la Bacteriología. El trabajo del bacteriólogo sistematizador (que clasifica bacterias) resulta más difícil de lo que se suponía al principio, pues un microorganismo puede mostrar variaciones tanto en sus reacciones fisiológicas como en sus características de morfología. El fenómeno atañe asimismo a problemas de infección, inmunidad, virulencia y a otros muchos aspectos de la Bacteriología.

La inestabilidad de las bacterias se manifiesta de diversos modos. Formas esféricas, en ciertas condiciones, pueden transformarse en bacilos, y éstos hacerse cocoides; la movilidad cesa en ocasiones, para volver de nuevo; células que toman una coloración lisa y uniforme cuando jóvenes pueden ofrecer un aspecto granular al envejecer. A veces se modifican reacciones fisiológicas, como la fermentación de carbohidratos; algunos microorganismos esporíparos pierden su facultad de producir esporas (hacerse asporógenos); otros encapsulados pierden a veces la capacidad de segregar una cápsula, y especies que normalmente no la producen pueden adquirir tal propiedad si se modifica la composición del medio o la temperatura de incubación. La respuesta antigénica puede variar ostensiblemente; unas especies cultivadas aglutinan de modo espontáneo, mientras que otras pierden tal virtud; bacterias virulentas pierden en ocasiones su aptitud patógena, y otras razas, inofensivas y avirulentas, pueden adquirir virulencia. Estos son unos pocos ejemplos de las variaciones observadas.

Variaciones del tamaño celular con la edad. Es bien sabido que las células jóvenes suelen ser mayores que las viejas. A medida que envejece un cultivo recién inoculado, las células van aumentando progresivamente de tamaño, hasta alcanzar un máximo, y a partir de entonces

se invierte el proceso. Henrici (1928) midió las células de *Bacillus megatherium* desarrolladas en una microcolonia, y advirtió que su longitud aumentaba de 3,7 μ a 17,3 μ en 270 minutos, para disminuir al continuar el período de incubación.

Variaciones de forma de las colonias. Se han reconocido en cultivos bacterianos varios tipos de colonias, las cuales se califican de mucoides, lisas, rugosas, intermedias, diminutas e inconstantes.

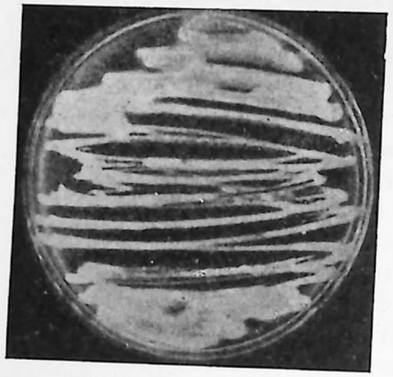


Fig. 158. — Cultivo mucoide de *Escherichia coli* obtenido de excrementos de rata. Variante conseguida incubando la placa a 15° C durante cuatro días.

Griffith (1923) observó dos tipos de colonias al sembrar en estrías un cultivo puro de neumococos en la superficie de un medio sólido: uno mate y rugoso y otro brillante y liso. Designó el primero por variante R *(rough)*, y el segundo por variante S *(smooth)*; éste muestra cápsulas patentes, que no existen en las colonias rugosas.

Dawson (1934) consiguió aislar una variante rugosa del neumococo que se diferencia del tipo señalado por Griffith. En su opinión, lo que éste había denominado fase rugosa era en realidad la variante lisa, mientras que la fase considerada antes como variante lisa resultaba ser la variante M (mucoide), comprobada ya en algunos microorganismos, sobre todo en los del grupo cólicotifoideodisentérico.

Una colonia rugosa responde a la siguiente descripción: bordes muy irregulares, superficie aplanada, desigual y granular; en caldo, los microorganismos producen un sedimento granular y se aglomeran espontáneamente en solución salina fisiológica.

Una colonia lisa puede describirse así: bordes redondos y regulares; superficie convexa, lisa y brillante; en caldo, los microorganismos producen enturbiamiento uniforme, y suspensión estable en solución salina fisiológica.

Formas SR (intermedias). Una colonia intermedia no denota por fuerza el grado equidistante entre los tipos liso y rugoso, sino sólo el aspecto intermedio de la colonia entre las formas S. y R; su desarrollo empieza por una de ellas y termina en la otra.

Formas M (mucoides). Un cultivo mucoide se caracteriza por la aparición de colonias de consistencia pronunciadamente húmeda, brillante y mucoide, con fuerte tendencia a confluir (fig. 158). Las células están encapsuladas con frecuencia. Ambos caracteres se han observado en especies que se suponían carentes de ellos.

Formas D (diminutas). En ocasiones, un cultivo puro de un microorganismo, sembrado en estrías en la superficie de un medio sólido, puede presentar dos variedades de colonias, grandes y pequeñas. Ambas, separadas en cultivos puros, suelen mantener durante muchas generaciones su característica diferencia de tamaño, pero, al cabo, muestran a veces algunas colonias del tipo contrario. El tipo pequeño de colonia

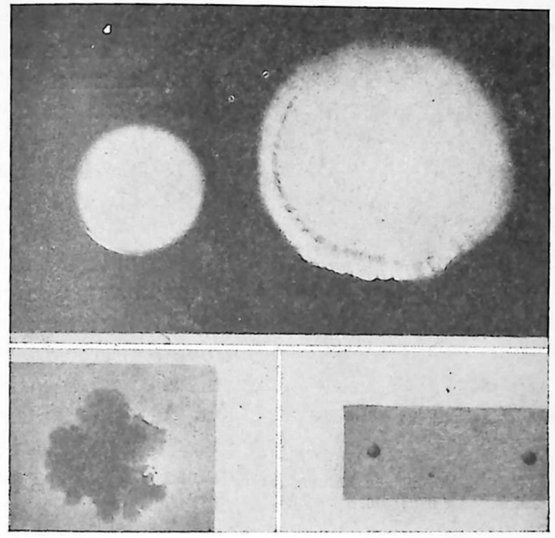


Fig. 159. — Los cuatro tipos principales de colonias de *Corynebacterium diphtheriae*. Arriba, a la izquierda, colonia lisa (*S*) de 48 horas, cultivada a 37° C y ampliada 12 veces; arriba, a la derecha, colonia intermedia (*SR*) de 48 horas, cultivada a 37° C y ampliada 12 veces; abajo, a la izquierda, colonia rugosa (*R*) cultivada 48 horas a 37° C y aumentada 18,8 veces; abajo, a la derecha, colonia diminuta (*D*) cultivada 48 horas a 37° C y ampliada 18,8 veces. (Según Morton.)

constituye la forma D o diminuta; es apenas visible a veces, y mide aproximadamente 1 mm o menos de diámetro (fig. 159). Los microorganismos de ambas clases de colonias aparecen iguales en cuanto a morfología y fisiología, y sólo difieren en el tamaño de las colonias.

Youmans y Delves (1942) cultivaron 17 cepas de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* en medios que contenían cloruro bárico, y comunicaron la producción de numerosas variantes estables e inestables de colonias en dos a seis días. Schnitzer, Camagni y Buck (1943) informaron de la producción de variantes estables de colonias pequeñas de una cepa de *M. pyogenes* var. *aureus*, por la acción de la penicilina. Youmans, Williston y Simon (1945) efectuaron experimentos similares con 10 cepas hemolíticas y patógenas recién aisladas del mismo germen, y obtuvieron variantes de colonias pequeñas de 9 de los 10 cultivos en dos a nueve días,

después de exposición inicial a la penicilina. Todas las variantes de colonias pequeñas eran del tipo inestable.

Véase más información en Weinberg (1950).

Formas L (inconstantes). Muchas bacterias pueden adoptar una forma sin límites definidos ni tamaño constante. Esta clase de desarrollo, denominada fase L, culmina en la producción de numerosos gránulos diminutos que apenas se perciben con un microscopio ligero (fig. 160).

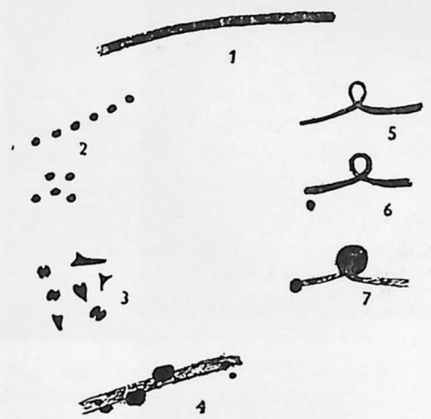


Fig. 160. — Esquema de la formación de cuerpos L, a partir de formas bacilares. (Según Klieneberger-Nobel.)

Se ha comprobado que en la fase L del *Streptobacillus moniliformis* las formas granulares pueden filtrarse a través de membranas de gradocol (página 222) y recuperarse del filtrado en crecido número. Los análisis por filtración muestran que las partículas granulares vienen a ser de igual tamaño que los mayores virus. Mediante métodos apropiados de cultivo, la fase L se ha podido apreciar en gran número de especies; además, en la mayoría de las bacterias ha demostrado ser filtrable.

En opinión de Klieneberger-Nobel (1951 *a*),

la fase L es probablemente el producto de la fusión de elementos pequeños de origen bacteriano. Esta fusión puede ser el equivalente primitivo de una unión sexual en organismos superiores; por consiguiente, el ciclo L se considera como un proceso de regeneración, que tal vez implica una recombinación de genes. Se estimula en cultivos en desarrollo siempre que se altera el equilibrio de multiplicación constante, lo cual puede obedecer a cambio de ambiente o de temperatura, o a muchos factores que originan condiciones ligeramente adversas. La fase L suele ser sólo un período transitorio breve, y reproduce la fase bacilar. Después de una regeneración, las nuevas bacterias pueden surgir en forma de raza diferente, con discrepancias morfológicas, antigénicas o bioquímicas. Si las condiciones especiales del ambiente son más favorables a los individuos alterados que lo han sido a la forma inicial, seguirá un nuevo desarrollo de la variante. Pueden surgir papilas (colonias secundarias) consistentes en microorganismos mejor adaptados a las condiciones desfavorables. Uno de los factores conocidos entre los productores de nuevas razas es el bacteriófago; si se emplea una concentración adecuada del mismo, la lisis de las bacterias va seguida del desarrollo de la fase L. Ésta parece multiplicarse sin que lo estorbe el bacteriófago, y

finalmente reproduce una fase bacteriana que puede resistirlo y dar origen a colonias resistentes.

Véase más información en Dienes (1949), Dienes y Weinberger (1951), Dienes, Weinberger y Madoff (1950), Freundt (1950), Klieneberger-Nobel (1951b), Stempen y Hutchinson (1951 *a*, *b*), Tulasne (1951), Weinberger, Madoff y Dienes (1950).

Cambio de las formas M a S y R. La fase lisa se ha observado con la máxima frecuencia en la mayoría de las especies bacterianas, y a ella sigue la fase rugosa. La menos frecuente parece ser la variante mucoide.

En opinión de algunos autores, las diferentes fases de un cultivo se pueden convertir fácilmente unas en otras en la mayoría de los casos. No parece probado que sea estable en sentido estricto ninguna fase de cultivo, aunque es cierto que algunas no se han podido invertir empleando métodos *in vitro*. Del reducido número de observaciones disponible se deduce que el paso de un cultivo de una fase a otra no es una transformación fortuita, sino que sigue un orden definido de cambios. La transición de S a M es más frecuente que la de R a M; y la de S a M se ha observado menos veces que la de M a S. Al compilar todas las transformaciones reseñadas en la bibliografía, Harley (1937) descubrió que la sucesión M → S → R es más corriente que ninguna de las otras, y parece ser también la más segura de todas.

Colonias secundarias. De tiempo se sabe que las colonias viejas o senescentes de muchas especies de bacterias pueden desarrollarse de nuevo en determinadas condiciones. Esto es lo que suele designarse por fase secundaria de desarrollo, que puede ser breve y limitarse a la formación de diminutas protuberancias o papilas, o algo prolongada, y dar entonces unas colonias hijas bien desarrolladas. Lewis (1933), en sus estudios acerca de la disociación del *Bacillus mycoides*, explica la aparición de colonias en los siguientes términos:

La fase secundaria de crecimiento se debe al agotamiento de substancias nutritivas predilectas y al consumo subsiguiente de otras no habituales por ciertas células. La capacidad de atacar tales substancias se adquiere mediante variación en virtud del estímulo específico que ellas ejercen. Las substancias que han resultado apropiadas para promover un desarrollo secundario son la sacarosa y fracciones proteínicas de identidad desconocida, presentes en extractos de carne, caseína o gelatina.

Las subrazas obtenidas de colonias secundarias muestran una capacidad exaltada para asimilar el compuesto causante de la variación, y no vuelven a producir colonias secundarias en su presencia. Las variantes son relativamente estables.

En la figura 161 se reproducen colonias secundarias de *B. mycoides*.

Relación entre variación y morfología celular. Estudios ya pretéritos han demostrado que las células bacterianas aumentaban en longitud

al pasar de la fase lisa a la rugosa, y que en estas últimas variantes solían observarse masas de filamentos entrelazados. Stevens (1935) comprobó que aumentaba el tamaño de las células de *Clostridium perfringens* al pasar del tipo mucoide a los tipos liso y rugoso. Dawson (1934)

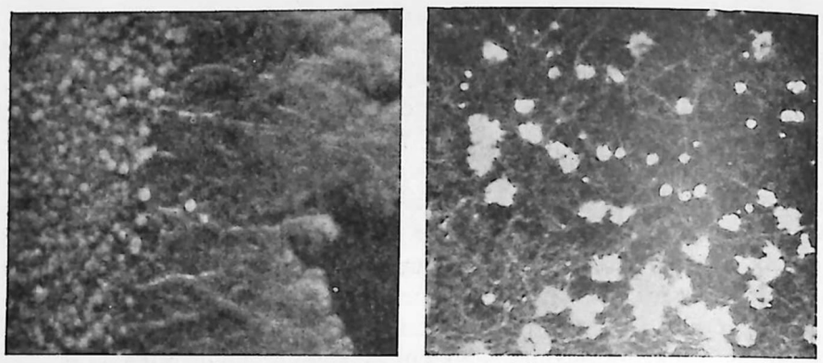


Fig. 161. — Colonias secundarias de *Bacillus mycoides*. Izquierda, porción de una colonia gigante de cepa B en agar, preparada de un cultivo en gelatina de 14 días, y fotografiada el décimo día; derecha, colonias de la cepa 421 al cabo de 14 días en agar con 1 % de peptona. (Según Lewis.)

y otros observaron en cultivos de neumococos el mismo cuadro morfológico; y Dawson, Hobby y Olmstead (1938), en un estudio de las variantes de varios tipos de estreptococos, han llegado a una conclusión similar (fig. 162).

Relación entre la forma y otros atributos de la colonia. En estudios anteriores, y antes de reconocerse la fase mucoide como una entidad, se vió que la variante lisa es más virulenta que la rugosa, de ordinario avirulenta. Los resultados dados a la publicidad muestran que tales conclusiones son esencialmente correctas; los cultivos rugosos carecen regularmente de virulencia y son atoxígenos. Entre las especies bacterianas cuya base mucoide se ha reconocido comúnmente, ésta ha resultado ser la más virulenta y toxicógena, con algunas excepciones. La hemólisis (disolución de eritrocitos por toxinas que segregan algunas especies bacterianas) no parece guardar relación con ninguna de las variantes.

En una revisión de la bibliografía, Hadley (1927) señaló que cada fase de un cultivo se halla estrechamente relacionada con otras características morfológicas, de cultivo y fisiológicas, tales como presencia de cápsulas, morfología celular, reacciones inmunológicas, estructura antigénica, virulencia, movilidad, sensibilidad al bacteriófago y resistencia a la fagocitosis. A partir de entonces, han aparecido trabajos en los que se sugiere la existencia de muchas excepciones, y que las observaciones más recientes apoyan el criterio general de que cada característica de

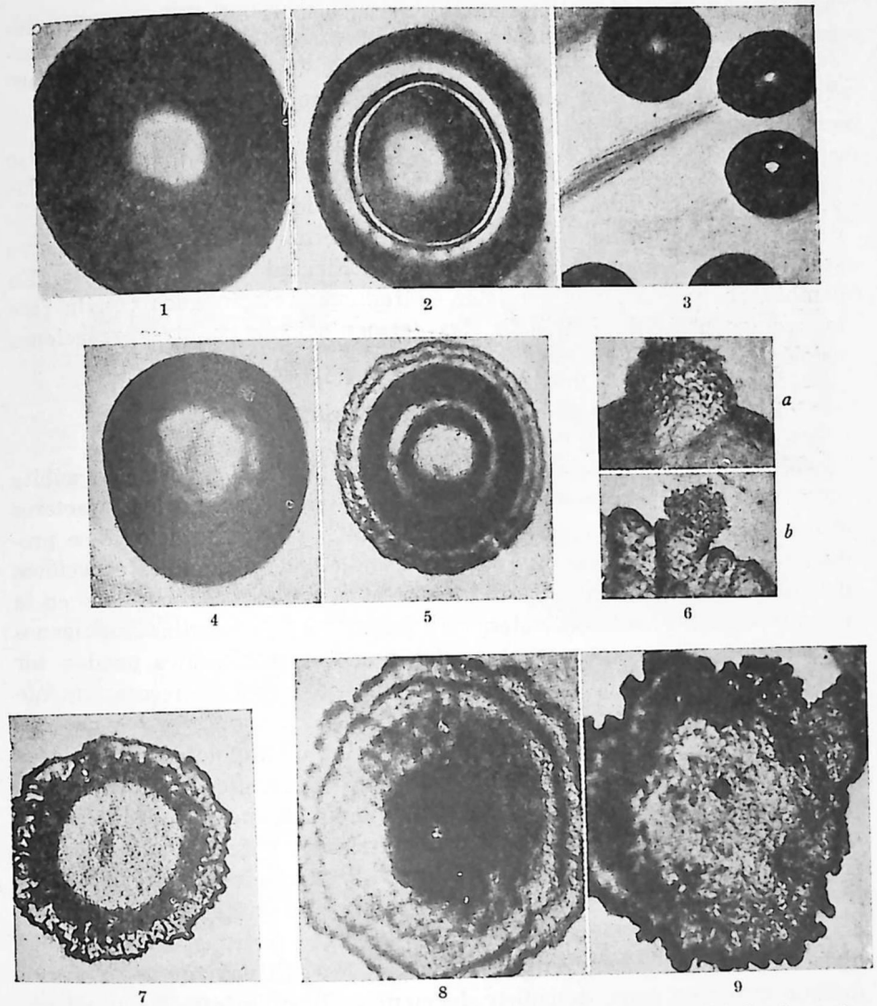


Fig. 162. — *Streptococcus hemolyticus*: 1, colonia M, 18 horas a 37° C; 2, variación S-M pronunciada, 18 horas a 37° C; 3, colonias mate, 18 horas a 37° C; 4, colonia S, dos días a 37° C; 5, colonia SR incipiente, cuatro días a 37° C; 6, variación R en los bordes de colonias SR, seis días a 37° C; 7, colonia SR próxima a la fase R pura, tres días a 37° C; 8, colonia R (tal vez con algunos elementos SR en el centro), tres días a 37° C; 9, colonia R, ocho días a 37° C. (Según Dawson, Hobby y Olmstead.)

una especie está sujeta a una transmisibilidad independiente. En una comunicación posterior, Hadley (1937) resumió esas observaciones diciendo que

... aunque ciertos atributos de una especie bacteriana pueden tener la facultad de variar con independencia de la fase del cultivo, tales casos son tan poco frecuentes que apenas alteran el principio general amplio de que cada fase

de cultivo, en un estado de relativa pureza, se halla estrechamente relacionada con ciertos grupos de caracteres; y que, cuando una fase se ha transformado por completo en otra, se pierden algunos de esos atributos y se adquieren otros nuevos.

Entre los caracteres que más frecuentemente parecen relacionarse con una fase figuran la morfología celular, el agrupamiento de las células, su movilidad, el consumo de carbohidratos específicos, la tendencia al saprofitismo, la estructura antigénica (incluídos los caracteres serológicos e inmunológicos), la toxicogenicidad y la virulencia. En cambio, se ha visto que no están claramente relacionadas con la fase la cromogénesis, la hemólisis, las fermentaciones y otras reacciones fisiológicas.

Véase más información en Hadley y Wetzel (1943).

Mutación. Esta palabra puede definirse como la variación súbita de un gen a una forma diferente, en la que el carácter o los caracteres alterados se mantienen permanentes y estables. Las mutaciones se producen a un ritmo definido, y son independientes de cambios específicos del medio, como lo son entre sí las distintas mutaciones ocurridas en la misma célula. Ciertas substancias conocidas por agentes mutágenos pueden intensificar tales cambios del gen. Las mutaciones pueden ser también reversibles, lo que demuestra que no implican necesariamente pérdidas.

Son agentes mutágenos los rayos X, la luz ultravioleta, las mostazas nitrogenadas, el desoxicolato sódico, la acriflavina, etc. A veces se producen mutaciones espontáneas. Algunos mutantes son más exigentes que los tipos originales en el aspecto nutritivo; entre ellos se cuentan mutantes bioquímicos deficientes análogos a los hallados en ciertos mohos.

El método habitualmente seguido para aislar mutantes bioquímicos consiste en poner un cultivo en placa de agar y transportar colonias aisladas a sendos tubos. Luego se ensayan los cultivos por separado en medios mínimos, para descubrir deficiencias bioquímicas.

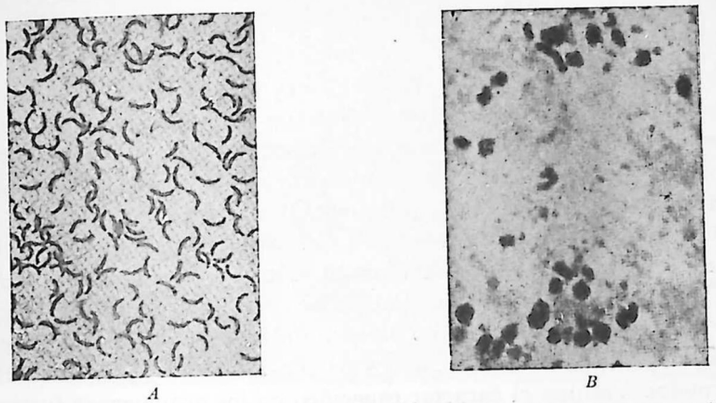
Otro método es el de poner el cultivo en una placa de medio completo diluído que limite el desarrollo de los mutantes deficientes, pero no el de las formas que no han experimentado mutación. Los mutantes se distinguen por sus formas de colonia más pequeñas.

Mutantes fermentativos. La *Escherichia coli* fermenta lactosa y produce ácido y gases. Si tal cultivo se siembra en estrías sobre la superficie de agar lactosado, con un indicador conveniente, pueden distinguirse dos tipos de colonias, una capaz de fermentar lactosa (lactosa-positiva), y otra incapaz de hacerlo (lactosa-negativa).

Cuando el mutante lactosa-negativo se vuelve a sembrar en otra placa, las colonias en desarrollo pueden producir papilas o colonias

secundarias, que contienen células lactosa-positivas. Las papilas se diseminan al azar, lo cual sugiere que cada una de ellas es resultado de una mutación aparte.

Mutantes medicamentosos. Las bacterias dan fácilmente origen a mutantes frente a casi todos los agentes antibacterianos. Estos mutantes parecen ser efecto de la selección de mutaciones espontáneas en las nuevas condiciones. Los mutantes medicamentosos suelen ser específicos, es decir, una mutación a la estreptomicina es independiente de otras



A *B*

Fig. 163. — *Vibrio comma*. *A*, formas normales desarrolladas en agar nutritivo; *B*, formas de involución en agar nutritivo con 1 % de glucina. (*B*, según Gordon y Gordon.)

a la penicilina o a las sulfamidas. Esto explica por qué es necesario disponer de uno o más remedios con actividad contra un mismo germen. La resistencia adquirida por un microorganismo frente a un medicamento no tendrá probablemente efecto frente a los otros.

A veces, los mutantes rebeldes a un medicamento pueden ser de dos clases: unos se desarrollan en presencia o ausencia del mismo, y otros requieren que esté presente para medrar, lo cual constituye su atributo diferencial.

En muchos casos, la resistencia a un medicamento va acompañada de cambios en las necesidades nutritivas. Las formas resistentes pueden ser capaces de sintetizar ciertos aminoácidos que las cepas primitivas requieren como factores de crecimiento. Hay algunas de *Escherichia coli*, resistentes al monocloroacetato sódico, incapaces de desprender gases de azúcares; los lactobacilos cultivados en presencia de fluoruro sódico dan origen a una variante que no puede fermentar glucosa.

La adición de productos químicos (germicidas) y colorantes (agentes bacteriostáticos) a medios de cultivo se traduce con frecuencia en la aparición de variantes suficientemente características para facilitar la identificación de algunas especies (fig. 163).

Adaptación y mutaciones espontáneas. Newcombe (1949) informa que se conocen numerosas variantes bacterianas capaces de desarrollarse en ambientes desfavorables para la cepa original, y cuya presencia ha inspirado dos hipótesis opuestas. La primera supone que el ambiente particular produce el cambio observado en algunas de las bacterias expuestas al mismo, mientras que la segunda sostiene que las variantes surgen de manera espontánea durante el crecimiento en condiciones normales, y que la intervención del medio adverso es puramente selectiva. Éstas son las hipótesis de «adaptación» y de «mutación espontánea», respectivamente. La primera se conoce también por teoría de Lamarck, quien opinaba que los cambios de ambiente hacen variar la estructura, y que los caracteres adquiridos se transmiten a las nuevas células. A base de pruebas experimentales, Newcombe llega a la conclusión de que las variantes son fruto de mutación espontánea, no de adaptación. Ésta parece ser la opinión de la mayoría de los especialistas en este dominio.

Mutación dirigida. El neumococo, *Diplococcus pneumoniae,* se ha clasificado en más de cuarenta tipos serológicos principalmente, a base de la reacción de aglutinación. Por lo que se sabe, todos los tipos contienen la misma proteína, y sólo difieren en la composición de los polisacáridos capsulares; los polisacáridos no son antígenos, pero, combinados con proteína, regulan el carácter específico de los anticuerpos producidos contra cada tipo.

Dawson y Sia (1931) cultivaron células rugosas (R) no encapsuladas de neumococos tipo II en un medio líquido que contenía antisuero R, y células lisas (S) encapsuladas muertas por calor, y comprobaron que las células R se transformaban en variantes S de neumococos tipo III, por haber adquirido la estructura capsular y la especificidad biológica de estos últimos.

Avery, MacLeod y McCarty (1944), y McCarty y Avery (1946 *a, b*), aislaron una fracción biológicamente activa de neumococos tipo III, que, en cantidades minúsculas, era capaz de provocar la formación de variantes R no encapsuladas de neumococos tipo II en células completamente encapsuladas del mismo tipo específico del microorganismo muerto por el calor de donde se había tomado el material inductor (fig. 164).

La fracción activa consistía principalmente, si no del todo, en una forma viscosa muy polimerizada de ácido desoxirribonucleico, aislada de neumococos en estado prácticamente puro. La enzima desoxirribonucleasa (pág. 320) destruía rápidamente su propiedad de provocar una mutación.

Boivin (1947) ha comunicado resultados similares en relación con sus trabajos sobre el bacilo cólico. Ha comprobado la extraordinaria multiplicidad de tipos antigénicos de *Escherichia coli,* cada uno de los cuales posee su propio polisacárido característico. Como los tipos de

neumococo, la *E. coli* puede experimentar una degradación antigénica, de formas S a R, por pérdida de su polisacárido. En sus formas S, los tipos de *E. coli* difieren entre sí en constitución química y especificidad serológica de sus polisacáridos; las formas R, desarrolladas en un filtrado de cultivos de las variantes S, daban con frecuencia origen a células S.

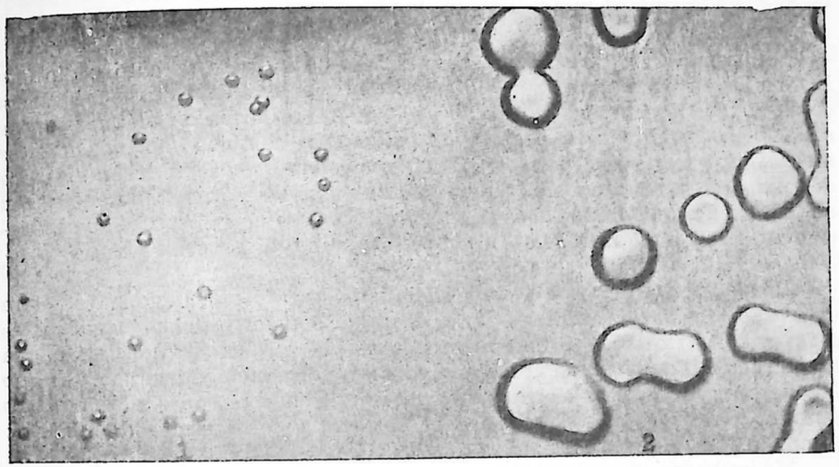


Fig. 164. — 1, colonias de neumococos tipos II (R); variantes de neumococo tipo II (R) desarrollada en medio de agar con principio transformador activo aislado de neumococos tipo III. Las colonias mucoides, lisas y brillantes, son características del neumococo tipo III, y se distinguen fácilmente de las pequeñas colonias rugosas de la cepa R original. (Según Avery, Mac Leod y McCarty.)

El mismo resultado se obtuvo cultivando células R en caldo con adición de un autolisado de aquéllas.

Como en el neumococo, el principio activo resultó ser una forma viscosa muy polimerizada de ácido desoxirribonucleico; el ácido ribonucleico no mostró actividad.

Ciclos vitales en bacterias. La variación bacteriana suele interpretarse como efecto de cambios de ambiente, o de un desarrollo ciclogénico normal y ordenado, que se conoce mejor por ciclo vital.

Lewis (1932, 1933, 1937, 1938), en una serie de estudios sobre *Bacillus mycoides, Azotobacter chroococcum, A. beijerinckii, Rhizobium meliloti* y *R. trifolii,* dedujo que nada prueba el concepto de que las formas variantes de un cultivo representen fases de un ciclo vital pleomórfico complejo por el que haya de pasar un microorganismo en un sistema ciclogénico de desarrollo.

Burke, Swartz y Klise (1943) presentaron pruebas en apoyo de la presencia de ciclos vitales en las bacterias. Describen cambios horarios observados en una cepa pleomórfica de un germen análogo al *Micrococcus pyogenes* var. *aureus,* cultivado en caldo fluente para eliminar

el efecto de una acumulación de metabolitos. En su opinión, el microorganismo pasa regularmente por un ciclo coco → bacilo móvil → coco en 12 horas; a veces se observan filamentos, pero éstos representan un factor secundario en el ciclo. Los experimentos de filtración no demostraron una fase que atravesara los filtros.

Humphries (1944), en su obra sobre el problema de disociación de la *Klebsiella pneumoniae*, dice en conclusión:

Los cambios de carácter que se producen en la masa de cultivo durante la disociación bacteriana se han explicado tal vez con demasiada frecuencia como efecto de cambios en los mecanismos hereditarios de algunas de las células, en virtud de mutaciones espontáneas o de cambios impresos en estos mecanismos por la acción directa de ciertos estímulos de ambiente, seguidos de una acción selectiva del medio favorable a las formas mutantes. Sin embargo, en estos últimos años, algunos autores ven en el proceso de disociación un desarrollo ciclogénico normal del «micrófito de especie»: teoría «ontogénica» de Hadley.

Hoy, ninguna de estas teorías tiene fundamento adecuado, ni siquiera satisfactorio, en el experimento. Es muy difícil obtener pruebas convincentes a favor de la teoría de la mutación en ausencia de ciclo sexual. Por fuerza ha de seguir faltando base apropiada para la teoría ciclogénica hasta que se adquieran conocimientos acerca de las condiciones en que tales cambios pueden continuar y se demuestre el desarrollo consecuente de un ciclo completo.

Sin embargo, suponiendo que una de estas dos teorías explique cumplidamente la variación de fase en los cultivos, por lo menos existe entre ambos conceptos una diferencia fundamental susceptible de estudio experimental. Si la transición de fase en los cultivos es resultado de mutaciones en los diversos caracteres considerados, a falta de asociaciones de caracteres, y en presencia de distintos ambientes selectivos o impresivos, puede esperarse que la sucesión de cambios de carácter ocurra de modo casual durante la interfase. Por el contrario, si el proceso es ciclogénico, el tipo de transición de fase habrá de ser ordenado en todo ambiente que permita una continuación de tal cambio.

Humphries ha comprobado que los cambios de carácter expresivos de las diversas transformaciones de fase en los cultivos se presentan poco menos que en cualquier orden imaginable. Estos resultados experimentales no sustentan la teoría «ontogénica» de Hadley. La sucesión fortuita parece explicarse mejor por el concepto de mutación celular con el concurso de condiciones selectivas de ambiente.

Véase más información sobre ciclos vitales bacterianos en Kvittingen (1949 *a*, *b*).

Datos complementarios sobre variación microbiana se encontrarán en Austrian (1952), Braun (1947 *a*, *b*, 1953), Catcheside (1951), Demerec y Cahn (1953), Kelner (1949), Lederberg (1947, 1948, 1949, 1951 *a*, *b*, 1952), Lederberg, Cavalli y Lederberg (1952), Lederberg y Lederberg (1952), Luria (1947), McElroy y Friedman (1951), Mellon (1948), Newcombe (1953), Newcombe y Scott (1949), Norman (1953), Oeding (1949), Ryan y Schneider (1949), Zinder y Lederberg (1952).

REFERENCIAS

Austrian, R.: Bacterial transformation reactions, *Bact. Rev.*, **16**: 31, 1952.

Avery, O. T., C. M. MacLeod y M. McCarty: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, *J. Exp. Med.*, **79**: 137, 1944.

Boivin, A.: Directed mutation in colon bacilli, by an inducing principle of desoxyribonucleic nature: its meaning for the general biochemistry of heredity, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **12**: 7, 1947.

Braun, W.: Bacterial dissociation. A critical review of a phenomenon of bacterial variation, *Bact. Rev.*, **11**: 75, 1947*a*.

—: Studies on bacterial variation ands its relation to some general biological problems, *Am. Naturalist*, **81**: 262, 1947*b*.

—: «Bacterial Genetics», Filadelfia, W. B. Saunders Company, 1953.

Burke, V., H. Swartz y K. S. Klise: Morphological life cycle of a staphylococcus-like organism and modification of the cycle, *J. Bact.*, **45**: 415, 1943.

Catcheside, D. G.: «The Genetics of Micro-Organisms», Londres, Sir Isaac Pitman & Sons, Ltd., 1951.

Dawson, M. H.: Bacterial variation in pneumococcus and *Streptococcus hemolyticus*, *Proc. Soc. Exp. Biol, Med.*, **31**: 590, 1934.

—, G. L. Hobby y M. Olmstead: Variation in the hemolytic streptococci, *J. Infectious Diseases*, **62**: 138, 1938.

— y R. H. P. Sia: In vitro transformation of pneumococcal types. I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro, *J. Exp. Med.*, **54**: 681, 1931.

Demerec, M. y E. Cahn: Studies of mutability in nutritionally deficient strains of *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **65**: 27, 1953.

Dienes, L.: The development of *Proteus* cultures in the presence of penicillin, *J. Bact.*, **57**: 529, 1949.

— y H. J. Weinberger: The *L* forms of bacteria, *Bact. Rev.* **15**: 245, 1951.

—, — y S. Madoff: The transformation of typhoid bacilli into *L* forms under various conditions, *J. Bact.*, **59**: 755, 1950.

Freundt, E. A.: Observations on Dienes' *L* type growth of bacteria, *Acta Path.*, **27**: 159, 1950.

Hadley, P.: Microbic dissociation, *J. Infectious Diseases*, **40**: 1, 1927.

—: Further advances in the study of microbic dissociation, *ibid.*, **60**: 129, 1937.

—: Bearing of dissociative variation on the species-concept among the *Schizomycetes*, *ibid.*, **65**: 267, 1939.

— y V. Wetzel: Conditions contributing to streptococcal virulence. I. Intraphasic contrasted with inter-phasic variation, *J. Bact.*, **45**: 529, 1943.

Henrici, A. T.: «Morphologic Variation and the Rate of Growth of Bacteria», Springfield, Ill., Charles C. Thomas. Publisher, 1928.

Humphries, J. C.: Bacterial variation. The influence of environment upon the dissociation pattern of *Klebsiella pneumoniae*, *Yale J. Biol. Med.*, **16**: 639, 1944.

Kelner, A.: Studies on the genetics of antibiotic formation: the induction of antibioticforming mutants in actinomycetes, *J. Bact.*, **57**: 73, 1949.

Klieneberger-Nobel, E.: Filterable forms of bacteria, *Bact. Rev.*, **15**: 77, 1951*a*.

—: The *L*-cycle: a process of regeneration in bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 525, 1951*b*.

Kvittingen, J.: Studies of the life-cycle of *Proteus* Hauser, *Acta Path.*, **26**: 24, 1949*a*; part 2, *ibid.*, 855, 1949*b*.

Lederberg, J.: Gene recombination and linked segregations in *Escherichia coli*, *Genetics*, **32**: 505, 1947.

—: Problems in microbial genetics, *Heredity*, **2**: 145, 1948.

—: Bacterial variation, *Ann. Rev. Microbiol.*, 1949.

—: Prevalence of *Escherichia coli* strains exhibiting genetic recombination, *Science*, **114**: 68, 1951*a*.

—: «Papers in Microbial Genetics», Madison, University of Wisconsin Press, 1951*b*.

—: Cell genetics and hereditary symbiosis, *Physiol. Rev.*, 32: 403, 1952.
—, L. L. Cavalli y E. M. Lederberg: Sex compatibility in *Escherichia coli*, *Genetics*, 37: 720, 1952.
— y E. M. Lederberg: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants, *J. Bact.*, 63: 399, 1952.
Lewis, I. M.: Dissociation and life cycle of *Bacillus mycoides*, *J. Bact.*, 24: 381, 1932.
—: Secondary colonies of bacteria with special reference to *Bacillus mycoides*, *ibid.*, 25: 359, 1933.
—: Cell inclusiones and the life cycle of *Azotobacter*, *ibid.*, 34: 191, 1937.
—: Cell inclusions and the life cycle of rhizobia, *ibid.*, 35: 573, 1938.
Luria, S. E.: Recent advances in bacterial genetics, *Bact. Rev.*, 11: 1, 1947.
McCarty, M. y O. T. Avery: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance, *J. Exp. Med.*, 83: 89, 1946*a*. III. An improved method for the isolation of the transforming substance and its application to pneumococcus Types II, III, and VI, *ibid.*, 83: 97, 1946*b*.
McElroy, W. D. y S. Friedman: Gene recombination in luminous bacteria, *J. Bact.*, 62: 129, 1951.
Mellon, R. R.: Antigenic relationships between *M*, *S*, and *R* phases of streptococci and their diphtheroid descendants, *J. Immunol.*, 60: 91, 1948.
Newcombe, H. B.: Origin of bacterial variants, *Nature*, 164: 150, 1949.
—: The delayed appearance of radiation-induced genetic change in bacteria, *Genetics*, 38: 134, 1953.
— y G. W. Scott: Factors responsible for the delayed appearance of radiation-induced mutants in *Escherichia coli*, *ibid.*, 34: 475, 1949.
Norman, A.: Production of phenocopies in *Aerobacter aerogenes* by ultraviolet radiation, *J. Bact.*, 65: 151, 1953.
Oeding, P.: «Difteribasillens Dissosiasjon», Oslo, A. W. Broggers Boktrykkeri, 1949.
Rahn, O.: Individuality of bacteria, *Northwest Sci.*, 25: 107, 1951.
Ryan, F. J. y L. K. Schneider: Mutations during the growth of biochemical mutants of *Escherichia coli*, *Genetics*, 34: 72, 1949.
Schnitzer, R. J., L. J. Camagni y M. Buck: Resistance of small colony variants *(G-forms)* of a *Staphylococcus* towards the bacteriostatic activity of penicillin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 53: 75, 1943.
Stempen, H. y W. G. Hutchinson: The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris OX*-19. I. Bright phase contrast observations of living, bacteria, *J. Bact.*, 61: 321, 1951*a*; II. Comparative cytology of bacilli and large bodies, *ibid.*, 61: 337, 1951*b*.
Stevens, F. A.: The dissociation of *Cl. welchii*, *J. Infectious Diseases*, 57: 275, 1935.
Tulasne, R.: Les formes *L* des bactéries, *Rev. d'immunol.*, 15: 223, 1951.
Weinberg, E. D.: Vitamin requirements of dwarf colony variants of bacteria, *J. Infectious Diseases*, 87: 299, 1950.
Weinberger, H. J., S. Madoff y L. Dienes: The properties of *L* forms isolated from *Salmonella* and the isolation of *L*, forms from *Shigella*, *J. Bact.*, 59: 765, 1950.
Youmans, G. P. y E. Delves: The effect of inorganic salts on the production of small colony variants by *Staphylococcus aureus*, *J. Bact.*, 44: 127, 1942.
—, E. H. Williston y M. Simon: Production of small colony variants of *Staphylococcus aureus* by the action of penicillin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 58: 56, 1945.
Zinder, N. D. y J. Lederberg: Genetic exchange in *Salmonella*, *J. Bact.*, 64: 679, 1952.

CAPÍTULO XVIII

ASOCIACIONES DE BACTERIAS

Rara vez, o nunca, se encuentran microbios en su estado natural vegetando como especies puras o aisladas; lo normal es hallar dos o más especies mezcladas. Por eso es a veces erróneo deducir de estudios de laboratorio, a base de cultivos puros, los cambios exactos que los microorganismos producen en su ambiente natural.

Puede haber sencillas mezclas de dos o más especies en las que los microorganismos no se influyan recíprocamente, pero esto es excepcional. A veces se asocian diferentes especies bacterianas, o bien bacterias y otras clases de microbios, como levaduras, mohos, algas y protozoos.

Simbiosis. En muchos casos, el crecimiento y la reproducción son más vigorosos en asociaciones favorables que en cultivos de una sola especie, y esto es lo que se conoce por simbiosis, es decir, vida en común de dos o más especies de microorganismos pacíficamente asociadas en beneficio mutuo.

Ciertas bacterias terrícolas del género *Rhizobium* se desarrollan en tumores o nódulos producidos en las raíces de plantas que pertenecen principalmente a la familia *Leguminosas*. Estos microorganismos asimilan el nitrógeno atmosférico libre y sintetizan con él compuestos orgánicos. Las bacterias proporcionan así a las plantas nitrógeno asimilable, y toman substancias nutritivas de la savia del vegetal. Al parecer, existe en este caso una simbiosis perfecta (pág. 664).

Muchos ejemplos de simbiosis mencionados en la bibliografía no lo son en realidad, pues en la asociación sólo parece beneficiarse uno de los elementos; entre estos casos pude señalarse la influencia favorable de un aerobio sobre el desarrollo de un anaerobio: aquél reduce la tensión de oxígeno y crea un ambiente adecuado para que prospere el segundo; éste se aprovecha de la asociación, mientras que el aerobio no gana ni pierde. El caso debe considerarse como una especie de comensalismo o de antibiosis, más bien que de simbiosis. Los ejemplos genuinos de bacterias que viven en simbiosis con otras especies bacterianas, con provecho para ambas partes, son insólitos en la Naturaleza.

Comensalismo. Un microorganismo puede ser incapaz de desarrollarse en presencia de cierto substrato; pero si coincide con otro germen capaz de atacar el substrato y producir uno o varios compuestos que aquél pueda utilizar, la vegetación se manifiesta, y tal asociación recibe el nombre de comensalismo o vida en común de dos especies con beneficio para una de ellas y sin daño ni provecho para la otra.

Según Waksman y Lomanitz (1925), el *Bacillus cereus* se desarrolla con gran rapidez en un medio sintético que contenga caseína como única fuente de nitrógeno. La caseína se hidroliza enérgicamente, y proporciona aminoácidos y otros productos fraccionarios; esta hidrólisis es más rápida en ausencia de carbohidratos fermentables. En cambio, el *Pseudomonas fluorescens* es incapaz de atacar y utilizar la caseína en provecho de su estructura o como energía, si bien asimila aminoácidos con facilidad (fig. 165).

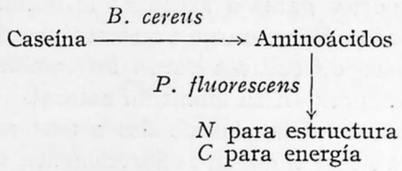


Fig. 165. — Acción del *B. cereus* y del *P. fluorescens* sobre la caseína y sus productos de descomposición.

El *Bacillus cereus* constituye un caso típico de microorganismo proteolítico capaz de degradar proteínas naturales y dar compuestos de menor peso molecular. El *Pseudomonas fluorescens* no es proteolítico, pero puede utilizar aminoácidos libres como generadores de nitrógeno asimilable y de carbono energético.

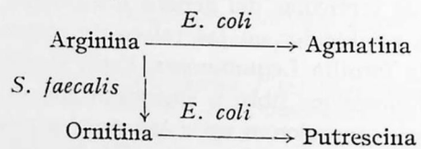


Fig. 166. — Acción de la *E. coli* y del *S. faecalis* sobre la arginina y la ornitina.

Sembrando ambos microorganismos en el medio antes citado, las alteraciones que experimenta la molécula de caseína son distintas de las ocasionadas por cada organismo independientemente. El *B. cereus* ataca primero la caseína, y pone en libertad aminoácidos y otros productos, y el *P. fluorescens* descompone los aminoácidos a medida que se van formando; así, el cultivo muestra pronto más células de *P. fluorescens* que de *B. cereus*. El primero se beneficia francamente con la asociación, mientras que la situación del segundo no se modifica.

Gale (1940) informa que la *Escherichia coli* puede descarboxilar arginina y la ornitina, y dar agmatina y putrescina, respectivamente,

pero no convierte arginina por hidrólisis en ornitina. Por su parte, el *Streptococcus faecalis* hidroliza la arginina a ornitina, pero no descarboxila la arginina a agmatina, ni la ornitina a putrescina (fig. 166).

En un medio que contenga arginina, la *E. coli* y el *S. faecalis* no producen putrescina por separado; en cambio, sembrando los dos microorganismos en el mismo medio, el *S. faecalis* produce ornitina, sobre

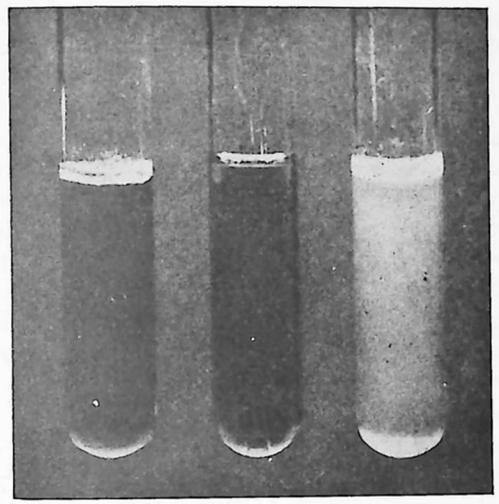


Fig. 167. — Comensalismo bacteriano. Izquierda, caldo nutritivo inoculado con *Bacillus subtilis* (nótese la gruesa película, sin vegetación visible en el caldo.) Centro, caldo nutritivo inoculado con *Clostridum sporogenes* (el microorganismo no se desarrolla). Derecha, caldo nutritivo inoculado con una mezcla de *B. subtilis* y *Cl. sporogenes* (el desarrollo del primero crea condiciones favorables para el del segundo).

la cual actúa la *E. coli* para dar putrescina. Esta especie saca provecho de la asociación, mientras que la otra no experimenta probablemente efecto alguno.

Otro ejemplo de comensalismo que suele emplearse en el laboratorio es el cultivo de un germen anaerobio en presencia de un aerobio facultativo. En una placa de Petri se vierte fundido un medio sólido adecuado, y se deja solidificar el agar; en la superficie de una mitad de la placa se siembra en estrías el anaerobio, y se hace lo mismo con el aerobio facultativo en la otra mitad. Se pega la tapa a la mitad inferior del platillo de Petri, utilizando escayola o material similar. El aerobio consume el oxígeno encerrado y elimina el dióxido de carbono; la tensión de oxígeno se reduce pronto lo suficiente para que se desarrolle el anaerobio. Éste se beneficia claramente con la asociación, y el aerobio no se aprovecha ni se perjudica. Se puede emplear un medio líquido cuando interese un cultivo mixto (fig. 167).

Sinergia. Este tipo de asociación se considera común en la Naturaleza. Propusieron el término Holman y Meekison (1926), con el significado de acción conjunta de dos microorganismos en un medio carbohidratado, con producción de gases que no engendra ninguno de aquéllos al desarrollarse por separado.

Los primeros estudios sistemáticos sobre sinergia se deben probablemente a Sears y Putnam (1923), quienes informaron que muchas parejas de gérmenes producen gases en un medio azucarado, y no lo hacen respectivamente en cultivos puros. Admiten, como explicación del fenómeno, que uno de los microorganismos puede formar ácido, y el otro desarrolla los gases; el primero degrada el carbohidrato y deja libre una substancia que el segundo aprovecha, con desprendimiento gaseoso. La substancia atacada por el germen productor de gases de la pareja no es resultado final de la acción del microbio acidógeno, sino una fase intermedia del metabolismo. Holman y Meekison confirmaron los descubrimientos de Sears y Putnam, y ampliaron sus trabajos; en la tabla 28 se exponen sus datos acerca de varias parejas de gérmenes que elaboran gases. La figura 168 muestra un ejemplo típico de sinergia. a base de caldo sacarosado y de los gérmenes *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* y *Escherichia coli.*

TABLA 28. — PAREJAS DE BACTERIAS QUE PRODUCEN GAS EN ASOCIACIÓN

Carbohidrato	Microorganismos
Lactosa	*Micrococcus pyogenes* var. *aureus* + *Salmonella schottmuelleri*
	Streptococcus faecalis + *Salmonella schottmuelleri*
	Streptococcus faecalis + *Salmonella choleraesuis*
	Micrococcus pyogenes var. *aureus* + *Proteus vulgaris*
	Streptococcus faecalis + *Proteus vulgaris*
	Streptococcus faecalis + *Salmonella paratyphi*
Sacarosa	*Micrococcus pyogenes* var. *aureus* + *Escherichia coli*
	Streptococcus faecalis + *Escherichia coli*
	Streptococcus equinus + *Salmonella schottmuelleri*
	Streptococcus equinus + *Salmonella paratyphi*
	Micrococcus pyogenes var. *aureus* + *Salmonella paratyphi*
Manita	*Micrococcus pyogenes* var. *aureus* + *Proteus vulgaris*
	Streptococcus faecalis + *Proteus vulgaris*
	Streptococcus pyogenes + *Proteus vulgaris*
	Shigella paradysenteriae + *Proteus vulgaris*
	Salmonella typhosa + *Proteus vulgaris*

Castellani (1926) informó que la *Salmonella typhosa* y el *Proteus morganii* producían gases de algunos carbohidratos cuando se desarrollan juntos, lo que no ocurre cultivándolos por separado en cultivos puros. Graham (1932), experimentando con los mismos gérmenes, hizo saber que las dos especies asociadas forman por sinergia gases a partir de manita; la *S. typhosa* da un compuesto estable a expensas de manita, y el *P. morganii* degrada el compuesto y desprende gases. La *S. typhosa*, cultivada sola, proporciona un compuesto que resultó estable a 100° C; si este cultivo se mata por calor y se inocula luego con *P. morganii*, fermenta el citado compuesto intermedio y se liberan gases idénticos

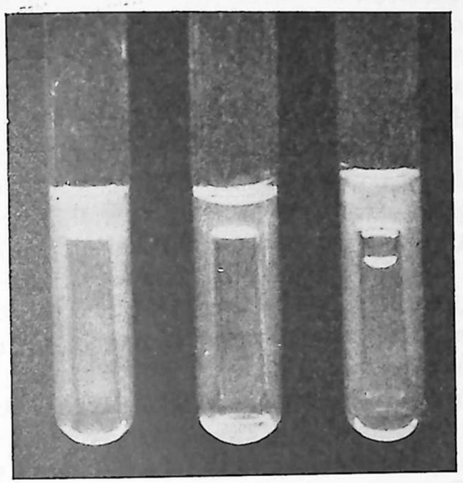


Fig. 168. — Sinergia bacteriana. Izquierda, *Escherichia coli* cultivada en caldo sacarosado. Centro, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* desarrollado en caldo sacarosado. Derecha, mezcla de *E. Coli* y *M. pyogenes* var. *aureus* en caldo sacarosado, con formación de gases.

a los obtenidos de una mezcla de los dos gérmenes cultivados juntos. Resultados similares comunicaron Greer y Nyhan (1928) y Atkinson (1935).

El fenómeno de la sinergia adquiere probablemente su máxima importancia en los análisis bacteriológicos del agua, donde a veces se llega a presunciones falsas a causa de las actividades conjuntas de dos o más especies bacterianas. También se observa a veces el efecto opuesto, o sea que el microorganismo productor de gases pierde esta propiedad cuando se asocia a una especie distinta.

Atkinson y Wood (1938) han puesto de relieve la importancia de las parejas sinérgicas en los análisis de aguas, por dar ocasión a informes positivos falsos por presunción. Aislaron microorganismos desarrollados en asociación sinérgica, uno de ellos incapaz de fermentar lactosa, que producía ácido y gases a expensas de glucosa, y el otro, productor de ácido y no de gases a partir de lactosa. Asimismo aislaron dos pares de gérmenes que contenían ambos un elemento no fermentador de

lactosa del grupo *Proteus*. En una de las parejas, tal elemento se hallaba combinado con *Streptococcus faecalis*, y en el otro, con *Eberthella belfastiensis*; esta última pareja es la que con más frecuencia induce a admitir reacciones positivas erróneas.

Es general la tendencia de uno de los miembros de una pareja a contrarrestar el desarrollo del otro. Esto puede obedecer a que un microorganismo elabore productos metabólicos en detrimento del otro, a una mayor concentración de hidrogeniones, a un ritmo mayor de desarrollo de uno de los gérmenes apareados, etc. Por tanto, la presencia o ausencia de gases no demuestra necesariamente que haya o no haya *E. coli* en una muestra de agua.

Antibiosis. Un microorganismo se defiende de sus enemigos de diversos modos: puede producir catabolitos que alteren las condiciones de un medio, tales como pH, presión osmótica y tensión superficial, y hagan el ambiente desfavorable para el desarrollo de microorganismos más exigentes. Asimismo puede elaborar substancias tóxicas específicas que perturben el metabolismo de otros gérmenes hasta el punto de que mueran o sean incapaces de reproducirse. Estas substancias se denominan antibióticos, y el fenómeno recibe el nombre de antibiosis o antagonismo, que puede definirse como vida en común de dos especies de gérmenes, una de ellas francamente nociva para la otra, hasta el extremo de hacerla sucumbir.

El fenómeno de la antibiosis no es un descubrimiento reciente. Ya en 1877 advirtió Pasteur que ciertos microorganismos saprófitos del aire podrían detener el crecimiento del bacilo carbuncoso. Aproximadamente al mismo tiempo se demostró que las bacterias patógenas desaparecían mucho más aprisa en terreno natural que en el esterilizado previamente por calor. Desde entonces se han dado a conocer muchas observaciones sobre cultivos mixtos, cultivados en placas de agar, en el que un germen es ostensible antagonista de otro, lo cual se manifiesta por zonas claras en torno a colonias del primero.

Fleming (1929) obtuvo en un cultivo de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* sobre placa de agar un moho contaminante que producía un pigmento verde e impedía el desarrollo bacteriano hasta cierta distancia en torno suyo. Cultivó el microorganismo en caldo, y descubrió que un filtrado del cultivo era capaz, aun muy diluído, de estorbar el desarrollo de diversas bacterias patógenas. Como el moho resultó ser una especie de *Penicillium (P. notatum)*, Fleming le dió el nombre de «penicilina». No fué posible aislar y purificar el antibiótico, y casi todos se olvidaron de la penicilina, menos su descubridor, que continuó experimentando con cultivos del moho.

Dubos (1939) aisló del suelo un bacilo esporífero capaz de destruir bacilos grampositivos vivos, y cuyos cultivos autolisados eran fatales para especies vivientes de micrococos, neumococos y ciertos estreptococos. El microorganismo era el *Bacillus brevis*, bastoncillo esporíparo grande, grampositivo, similar el *B. subtilis*, y se dió el nombre de «gramicidina» al antibiótico resultante; éste, agregado a caldo nutritivo, impedía el desarrollo de micrococcos grampositivos, pero no retardaba la reproducción de bacterias gramnegativas.

Entre tanto, un grupo de bioquímicos y bacteriólogos de la Universidad de Oxford, Inglaterra, revisaron las posibilidades de aislamiento y purificación de la penicilina. Hasta 1940 no lograron aislar el antibiótico en su forma natural y hacerlo accesible a ulteriores estudios. La preparación bruta resultó ser más eficaz contra diversas enfermedades que las sulfamidas, las cuales disfrutaban de una popularidad universal por entonces. Se comprobó que la penicilina no era apenas tóxica, de modo que podía administrarse sin riesgo a dosis muy superiores a la curativa eficaz.

Reservas de antibióticos. El aire contiene muchos gérmenes microscópicos, cada uno de los cuales puede desarrollar actividad antibiótica en medios apropiados.

El suelo es acaso el depósito más rico de microorganismos dotados de acción antibiótica, principalmente bacterias, actinomicetos y mohos. Según Thom y Morrow (1936), «Una cucharada tetera de tierra contiene centenares de millones de bacterias, millones de actinomicetos, centenares de miles de esporas de mohos, decenas de millares de protozoos y centenares de gusanos nemátodos. En tal ambiente, un microorganismo delicado, como el *Penicillium notatum*, necesita una protección comparable a un tanque en la guerra humana». Una de las propiedades de tales organismos es la de excretar substancias que detienen o anulan el desarrollo de sus vecinos.

Habitualmente se emplean dos técnicas generales para descubrir y aislar organismos que demuestran actividad antibacteriana. La primera se basa en la presunción de que el efecto desarrollado contra una sola especie de ensayo basta para seleccionar organismos antagónicos. En este método se mezcla una muestra de tierra con un medio de agar fundido adecuado, en dilución conveniente, y el conjunto se vierte en platillos de Petri. Una vez solidificado el agar, se invierte la placa y se incuba hasta que aparecen colonias dispersas; se cubre entonces la placa con una suspensión del germen examinado y se incuba de nuevo. Las bacterias en estudio forman entonces una vegetación sólida sobre la placa de agar, dejando zonas claras de inhibición en torno a colonias de organismos terrícolas capaces de producir un antibiótico hostil a aquéllas. Las colonias rodeadas de zonas claras se llevan a medios de agar inclinado y se conservan para ulteriores estudios. Utilizando una serie de placas de agar y tierra, cubiertas por distintas especies de ensayo, el procedimiento sirve para aislar formas enemigas de una amplia variedad de microorganismos.

En el segundo método se siembra en estrías un germen sobre un segmento de placa de agar, y se incuba hasta conseguir un desarrollo visible. Luego se siembran en estrías sendas suspensiones de varios gérmenes de ensajo, perpendicularmente al cultivo maduro, a partir de su borde, y se incuban otra vez las placas hasta que se aprecie vegetación de todas las especies examinadas. Si el germen separado produce substancias antibióticas, las especies de ensayo no medran a distancias variables del cultivo original, y la longitud de los espacios claros es proporcional a su sensibilidad a los gérmenes activos que se difunden desde el cultivo que los produce.

Métodos de cultivo. Al parecer, todos los microorganismos productores de antibióticos que se han estudiado hasta ahora han de disponer de oxígeno libre para desarrollar una actividad metabólica normal. Por lo común se emplean tres métodos de cultivo, todos ellos basados en la introducción de una abundante provisión de aire en el ambiente: 1.°, cultivo somero superficial, donde los gérmenes se desarrollan sobre la superficie de medios líquidos y forman una esterilla firme; 2.° cultivo somero sumergido, donde los microorganismos se siembran en delgadas capas de medio y el aire llega al fondo de los cultivos por difusión, y 3.°, cultivo sumergido profundo, donde los medios se inoculan y se agitan mecánicamente durante todo el período de incubación. Este último método produce una vegetación más abundante en menos tiempo, y requiere menos espacio y material; es el que se emplea comercialmente para preparar antibióticos.

Medición de la actividad antibiótica. Se emplean comúnmente tres métodos para evaluar la actividad antibiótica: el de placa y cilindros de Oxford, el de la placa de agar recortado y el de los discos de papel.

En el método de Oxford, el germen que ha de someterse a antibiosis se siembra en agar fundido, y éste se vierte en un platillo de Petri. Una vez solidificado, en la superficie del agar se colocan cilindros de arcilla porosa abiertos por ambos extremos, y se llenan con diluciones del antibiótico. En torno a los cilindros aparecerán zonas claras, por quedar detenido el crecimiento al difundirse el antibiótico de los cilindros en el agar (fig. 169). En el método de la placa de agar recortado se prepara como antes un platillo con agar inoculado, y de éste se recortan y separan uno o varios discos; los huecos se llenan con diluciones del antibiótico, y la placa se incuba a la temperatura apropiada. Después de la incubación, alrededor de los huecos se verán zonas claras, donde el desarrollo se ha paralizado por difusión del antibiótico en el agar. En el método de los discos de papel, se emplean círculos de papel de filtro, de unos 10 mm de diámetro, en vez de cilindros de porcelana. Se prepara el agar como en los casos anteriores y se vierte en platillos de Petri; en la superficie del agar solidificado se colocan discos de papel poroso y se saturan con un determinado volumen de diluciones de antibiótico. Después de la incubación se ven alrededor de los discos zonas claras donde el antibiótico difundido ha impedido la vegetación (figura 170).

Naturaleza de los antibióticos. Los antibióticos poseen ciertas propiedades que los distinguen bien de los agentes químicos empleados de ordinario como antisépticos y germicidas. Sólo es posible comprender

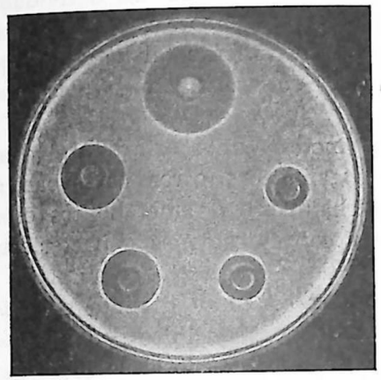


Fig. 169. — Evaluación de la actividad antibiótica por el método de placa y cilindros de Oxford. Se vierte agar fundido e inoculado con *Sarcina lutea* en una placa de Petri, y con una pipeta se introducen en los cilindros volúmenes iguales de soluciones de subtilina a concentraciones escalonadas de 1:1000 a 1:1.000.000. La zona máxima corresponde a la dilución de subtilina al 1:1000.

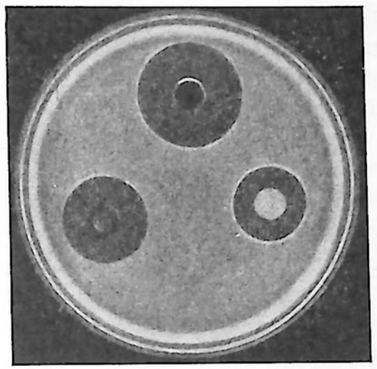


Fig. 170. — Evaluación de la actividad antibiótica por varios métodos. Se siembra *Sarcina lutea* en agar fundido, y la mezcla se vierte en una placa de Petri. En los tres ensayos se ha empleado una dilución de subtilina al 1:1000. Arriba, método de la placa de agar recortado; izquierda, método de placa y cilindros de Oxford; derecha, método de los discos de papel.

la naturaleza, el modo de acción y el empleo de los antibióticos cuando se consideran su origen, su composición química, sus propiedades físicas y sus efectos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Producen antibióticos los microorganismos de todas clases, tales como bacterias, levaduras, mohos, plantas y animales. Los antibióticos más útiles hasta ahora proceden de actinomicetos y otras bacterias, y de mohos. Algunos son segregados al exterior de las células y en torno a ellas; otros permanecen retenidos ampliamente en las células, y han de retirarse por extracción.

Los antibióticos difieren en sus propiedades físicas y químicas dentro de límites muy extensos. A veces la diferencia es muy pequeña, como lo prueba el gran número de penicilinas distintas que se obtienen incorporando ciertos precursores afines al medio de cultivo.

Algunos microorganismos pueden producir dos antibióticos. Por ejemplo, el *Bacillus brevis* da tirotricina, que ha resultado ser una mezcla de gramicidina y tirocidina. Otros originan más de dos antibió-

ticos: el *Streptomyces lavendulae* elabora estreptotricina, lavendulina, estreptolina y cloromicetina; y el *Aspergillus fumigatos* da fumigacina, gliotoxina y fumigatina.

Ciertos antibióticos proceden de más de un microorganismo; la penicilina se obtiene de *Penicillium notatum, P. chrysogenum* y *A. flavus*; y la estreptomicina, de *S. griseus* y *S. bikiniensis*.

La composición del medio puede influir o no en las actividades antibacterianas de un antibiótico. Algunos substratos carecen de efecto apreciable, y otros pueden reducir considerablemente tal actividad por neutralización del agente. Así la adición de sangre inactiva a veces por completo un antibiótico.

Los antibióticos actúan de diversos modos: unos estorban el desarrollo y la división celular de microorganismos; otros perturban su respiración, y otros impiden el aprovechamiento de metabolitos esenciales. Pueden ser germicidas a grandes concentraciones y bacteriostáticos en preparaciones menos concentradas.

La sensibilidad a un antibiótico puede ser muy distinta en diferentes cepas de un microorganismo. Las cepas sensibles son generalmente capaces de adquirir resistencia a un antibiótico si se dejan por algún tiempo en contacto con éste; el período de desarrollo de tal resistencia varía según los antibióticos: las bacterias tardan poco en hacerse resistentes a la estreptomicina, y bastante más tiempo en el caso de la penicilina.

Importancia de los antibióticos. Como se ha dicho antes, casi todos los grupos de organismos vivos elaboran antibióticos. Sin embargo, los más importantes proceden de actinomicetos y otras bacterias y de mohos.

El número de antibióticos aumenta sin cesar, y son centenares los identificados y estudiados hasta ahora. En la tabla 29 se resumen los más importantes, con sus características.

El campo de los antibióticos parece ofrecer perspectivas ilimitadas en Medicina. Poderosos antibióticos, como la penicilina, han demostrado ser de tan enorme importancia para la destrucción de gérmenes, especialmente patógenos, que se extiende cada vez más la labor investigadora en busca de otros nuevos y mejores. Como es difícil creer que ya se hayan aislado los mejores antibióticos, podemos esperar aún sensacionales descubrimientos en este terreno.

Véase más información en Addinall (1950), Bowman (1947), Brian (1949, 1951), Corper y Cohn (1949), Courtillet (1949), Erlanson (1951), Finlay y otros (1951), Florey (1946), Inskeep y otros (1951), Landerkin, Smith y Lochhead (1950), Lochhead y Landerkin (1949), Long (1950), Long y otros (1949), Pratt y Dufrenoy (1949 *a, b*), Routien y Finlay (1952), Smith y otros (1948), Smolens y Vogt (1953), Spoehr y otros (1949), Stevenson y Lochhead (1953), Uroma y Virtanen (1947), Waksman (1947, 1948), Welsch (1947), Williams y otros (1948).

TABLA 29. — ALGUNOS ANTIBIÓTICOS IMPORTANTES PRODUCIDOS POR BACTERIAS Y MOHOS

Antibióticos	Producidos por	Microorganismos sensibles	Propiedades
Bacterias			
Aureomicina	*Streptomyces aureofaciens*	Muchas bacterias grampositivas y gramnegativas; con actividad también contra algunos virus y rickettsias.	Muy activa *in vivo*; toxicidad escasa.
Bacitracina	Cepa de *Bacillus subtilis*	Principalmente microorganismos grampositivos.	Algo tóxica *in vivo*; uso externo principalmente.
Cloranfenicol (cloromicetina)	*Streptomyces venezuelae*	Muchas bacterias grampositivas y gramnegativas; activa asimismo contra algunos virus y rickettsias.	Activa *in vivo*; toxicidad escasa.
Estreptomicina	*Streptomyces griseus*	Bacterias gramnegativas, así como microorganismos ácidorresistentes.	Muy activa *in vivo*; toxicidad escasa.
Gramicidina	*Bacillus brevis*	Bacterias grampositivas.	Uso local solamente.
Neomicina	*Streptomyces fradiae*	Principalmente microorganismos gramnegativos, y también bacterias ácidorresistentes.	Muy activa *in vivo*; escasa toxicidad.
Polimixina (aerosporina, bacilosporina)	*Bacillus polymyxa*	Principalmente bacterias gramnegativas.	Activa *in vivo*; algo tóxica.
Subtilina	Cepa de *Bacillus subtilis*	Principalmente bacterias grampositivas, y también microorganismos ácidorresistentes.	Muy activa *in vivo*; baja toxicidad.
Terramicina	*Streptomyces rimosus*	Bacterias grampositivas y gramnegativas; también rickettsias y algunos virus.	Activa *in vivo*; toxicidad escasa.
Tirocidina	*Bacillus brevis*	Bacterias grampositivas y gramnegativas; algunos mohos.	No es activa *in vivo*.
Tirotricina (mezcla de gramicidina y tirocidina)	*Bacillus brevis*	Principalmente bacterias grampositivas.	Muy tóxica; para uso externo solamente.
Viomicina	*Streptomyces puniceus*	Bacterias grampositivas y gramnegativas, y también microorganismos ácidorresistentes.	Activa *in vivo*; baja toxicidad.
Mohos			
Citrinina	*Penicillium citrinum*	Principalmente bacterias grampositivas.	No activa *in vivo*; tóxica en relación con su actividad.
Clavacina	*Aspergillus clavatus*	Bacterias grampositivas y gramnegativas; algunos mohos.	Activa *in vivo*; tóxica.
Gliotoxina	*Glíocladium fimbriatum*	Bacterias grampositivas; algunas bacterias gramnegativas, y también mohos.	No activa *in vivo*; muy tóxica.
Penatina	*Penicillium notatum*	Bacterias grampositivas y gramnegativas.	No activa *in vivo*; baja toxicidad.
Penicilina	*Penicillium notatum*	Bacterias grampositivas, micrococos gramnegativos, y espiroquetas.	Muy activa *in vivo*; apenas tóxica.

REFERENCIAS

Addinall, C. R.: Antibiotics—their chemistry and production, *Can. Chem. Proc. Ind.*, **34**: 108, 1950.

Atkinson, N.: Synergic gas production by bacteria, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **13**: 67, 1935.

— y E. J. F. Wood: The false positive reaction in the presumptive test for *Bact. coli* in water, *ibid.*, **16**: 111, 1938.

Bowman, H. H. M.: Antibiosis, *Ohio J. Sci.*, **47**: 177, 1947.

Brian, P. W.: The production of antibiotics by micro-organisms in relation to biological equilibria in soil, *Symposia Soc. Exp. Biol.*, **111**: 357, 1949.

—, Antibiotics produced by fungi, *Bot. Rev.*, **17**: 357, 1951.

Castellani, A.: Fermentation phenomena when different species of microorganisms are in close association, *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **23**: 481, 1926.

Corper, H. J. y M. L. Cohn: The probable mechanism of streptomycin action in tuberculosis, *Yale J. Biol. Med.*, **21**: 181, 1949.

Courtillet, D.: Contribution à l'étude des substances antibiotiques produites par les bacteries du groupe du *Bacillus subtilis*, Paris, Imprimerie Richard, 1949.

Dubos, R. J.: Bactericidal effect of an extract of a soil bacillus on gram positive cocci, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **40**: 311, 1939.

Erlanson, P.: Determination of the sensitivity *in vitro* of bacteria to chemotherapeutic agents, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Supl. 85, 1951.

Finlay, A. C. y otros: Viomycin a new antibiotic active against mycobacteria, *Am. Rev. Tuberc.*, **63**: 1, 1951.

Fleming, A.: On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Brit. J. Exp. Path.*, **10**: 226, 1929.

Florey, H. W.: Steps leading to the therapeutic application of microbial antagonisms, *Brit. Med. Bull.*, **4**: 248, 1946.

Gale, E. F.: The production of amines by bacteria. 3. The production of putrescine from arginine by *Bacterium coli* in symbiosis with *Streptococcus faecalis*, *Biochem. J.*, **34**: 853, 1940.

Graham, J. G.: Bacterial synergism—the formation by *B. typhosus* or *B. coli anaerogenes* from mannitol of an intermediate substance from which Morgan's bacillus produces gas, *J. Hyg.*, **32**: 385, 1932.

Greer, F. E. y F. V. Nyhan: The sanitary significance of lactose-fermenting bacteria not belonging to the *B. coli*, group 3. Bacterial associations in cultures containing lactose- fermenting bacteria, *J. Infectious Diseases*, **42**: 525, 1928.

Holman, W. L. y D. M. Meekison: Gas production by bacterial synergism, *J. Infectious Diseases*, **39**: 145, 1926.

Inskeep, G. C.: Bacitracin—product of biochemical engineering, *Ind. Eng. Chem.*, **43**: 1488, 1951.

Landerkin, G. B., J. R. G. Smith y A. G. Lochhead: A study of the antibiotic activity of actinomycetes from soils of Northern Canada, *Can. J. Research*, C, **28**: 690, 1950.

Lochhead, A. G. y G. B. Landerkin: Aspects of antagonisms between microorganisms in soil, *Plant and Soil*, **1**: 271, 1949.

Long, P. H.: The use and impact of antibiotic therapy, *Penn. Med. J.*, **53**: 209, 1950.

— y otros: Antibiotics derived from *Bacillus polymyxa*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**: 853, 1949.

Pratt, R. y J. Dufrenoy: Recent research on penicillin action, *Texas Rep. Biol. Med.*, **7**: 180, 1949*a*.

— y —: «Antibiotics», Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1949*b*.

Sears, H. J. y J. J. Putnam: Gas production by bacteria in symbiosis, *J. Infectious Diseases*, **32**: 270, 1923.

Smith, R. M. y otros: Chloromycetin: biological studies, *J. Bact.*, **55**: 425, 1948.

Smolens, J. y A. B. Vogt: Studies on antibiotic resistance and the nucleic acid content of bacteria, *J. Bact.*, **66**: 140, 1953.

Spoehr, H. A. y otros: Fatty acid antibacterials from plants, *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 586, 1949.

Stevenson, I. L., y A. G. Lochhead: The use of a percolation technique in studying antibiotic production in soil, *Can. J. Botany*, **31**: 23, 1953.

Thom, C., y M. B. Morrow: Experiments with mold inoculation in cotton root rot areas, *Proc. Soil. Sci. Soc. Am.*, **1**: 223, 1936.

Uroma, E., y O. E. Virtanen: Antibiotics of yeasts, *Ann. Med. Exp. et Biol. Fenniae (Helsinki)*, **25**: 36, 1947.

Waksman, S. A.: «Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances», Cambridge, Mass., The Commonwealth Fund, Harvard University Press, 1947.

—: Antibiotics, *Biol. Rev.*, **23**: 452, 1948.

— y S. Lomanitz: Contribution to the chemistry of decomposition of proteins and amino acids by various groups of microorganisms, *J. Agr. Research*, **30**: 263, 1925.

Weslsch, M.: «Phénomènes d'antibiose chez les actinomycètes», Gembloux (Bélgica), Imprimerie J. Duculot, Éditeur, 1947.

Williams, J. H., y otros: Aureomycin—a new antibiotic, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**: 175, 1948.



CAPÍTULO XIX

BACTERIOLOGÍA DEL AIRE

El aire es una mezcla de gases, y su composición no es constante. La atmósfera consiste en gases permanentes y cantidades variables de aire y partículas sólidas. Según Landsberg (1951), el aire tiene la composición expuesta en la tabla adjunta.

Elemento	Volumen %	Amplitud
Nitrógeno	78,03	
Oxígeno	20,99	
Argón (argo)	0,94	
Dióxido de carbono	0,03	
Hidrógeno	0,01	
Neón	0,0012	
Criptón (cripto)	0,0010	
Helio	0,0004	
Xenón (xeno)	0,0001	
Ozono	Muy variable	2 a 20 $\times 10^{-7}$
Vapor de agua	Muy variable	0 a 4
Polvo	Muy variable	0 a millones de partículas por mililitro.

La composición varía ligeramente con la latitud, y en menos grado con la altitud. El ozono existe en la atmósfera por fotosíntesis a partir de oxígeno, bajo la influencia de la radiación ultravioleta solar. Este proceso se desarrolla a altitudes de 24 a 35 Km, donde la concentración del ozono es mucho mayor que en la superficie. La mayor parte del vapor de agua está concentrado en las capas inferiores de la atmósfera; su proporción suele ser de 1,2 % en volumen, poco más o menos, pero en tiempo frío puede descender casi hasta cero. Casi todas las muestras de aire contienen materias en suspensión: polvo, bacterias, levaduras, mohos, granos de polen, etc.; a diferencia de la porción gaseosa, las partículas suspendidas varían considerablemente.

El aire no constituye un ambiente natural para el desarrollo y la reproducción de microbios; no contiene la humedad necesaria ni substancias nutritivas en forma que puedan utilizar las bacterias y otros organismos microscópicos. Por eso, el aire no posee flora propia; a pesar de ello, se encuentran en el aire microorganismos, y su presencia es de gran importancia para la economía y la salud públicas.

Las bacterias llegan al aire por distintos medios, principalmente con el polvo que contiene células vegetativas secas y esporas. La mayoría de estos gérmenes son saprófitos, esto es, seres que viven de materia orgánica muerta. Tienen gran importancia en la industria conservera, las refinerías de azúcar, las granjas lecheras, los laboratorios biológicos, etcétera; en suma, son los microorganismos que contaminan el aire.

Las especies varían algo, según las localidades, pero ciertas formas se presentan casi invariablemente. Mohos y levaduras se encuentran muy a menudo en el aire, y en algunos puntos superan en número a las bacterias. Estos microorganismos producen esporas capaces de resistir un ambiente desfavorable durante largos períodos de tiempo. Los bacilos aerobios esporíparos del suelo son frecuentes en el aire; el miembro más conocido de este grupo es el *Bacillus subtilis*, conocido por bacilo del heno, y probablemente el organismo bacteriano más común en la Naturaleza, con asiento normal en el suelo y la vegetación. Por formar esporas, resiste mucho la desecación y otras condiciones adversas de ambiente. También hay en el aire sarcinas y micrococos, y a estos dos grupos suelen pertenecer los microorganismos cromógenos esféricos, saprófitos, que lo pueblan.

NÚMERO DE BACTERIAS EN EL AIRE

El número de bacterias contenidas en el aire depende del movimiento del ambiente y de la cantidad de polvo agitado. Un ambiente activo contiene más bacterias que otro más sosegado; su número es mayor en habitaciones sucias y descuidadas que en las limpias.

Un terreno rico, fértil y cultivado alberga más bacterias viables que otro arenoso o calizo sin cultivar. En consecuencia, el aire de encima del primero contendrá más microorganismos que el de encima del suelo baldío; y análogamente, en el aire que cubre un páramo hay más microbios que en el de una extensión de tierra llena de vegetación, pues en aquél es más fácil que las corrientes de aire los arrastren.

Con ocasión de exámenes detenidos, se han aislado microorganismos del aire del mar (ZoBell, 1942); pero éste suele contenerlos en menor número que el de origen continental o terrestre. Por ser diferentes sus necesidades de sal, es posible distinguir entre formas bacterianas de mar, de tierra y de agua dulce en 80 a 90 % de los casos. La mayoría de las bacterias del aire marino son bacilos gramnegativos no esporíparos de la familia *Bacteriáceas*, y en menor proporción de las *Seudo-*

monadáceas, Baciláceas y otras. En cambio, *Baciláceas* y *Micrococáceas* y esporas de mohos predominan generalmente en aire de tierra.

Las bacterias permanecen en el aire durante lapsos variables, según la velocidad de las corrientes, el tamaño de las partículas donde se fijan y la humedad de la atmósfera. Las bacterias son ligeramente más pesadas que el aire, y se depositan lentamente en una atmósfera tranquila; basta un ligero soplo de viento para mantenerlas en suspensión casi indefinidamente, si no están adheridas a partículas de polvo o gotitas de agua. En este caso, caen al suelo con rapidez mucho mayor.

Una atmósfera húmeda contiene menos microbios que otra seca, porque las gotitas de humedad los hacen bajar al suelo. El aire de una nevera suele estar libre de gérmenes. Por igual razón, el aire contiene durante los meses de verano muchos más microorganismos que en los húmedos del invierno. El aire espirado lentamente de los pulmones es estéril, pues los tramos húmedos de las vías respiratorias retienen las bacterias. Las pipetas no necesitan tapones de algodón para evitar que se contamine su contenido; se ponen sólo para que no lleguen a la boca otros productos.

ALTITUDES QUE ALCANZAN LOS MICROBIOS

En sus trabajos sobre microbiología de las capas elevadas de aire, Proctor (1935) y Proctor y Parker (1938), han comprobado que estos seres pueden alcanzar altitudes considerables. Según ellos,

> La aptitud de estos microorganismos para alcanzar alturas de 6,000 metros y más, por la acción casual de corrientes de aire, es significativa sobre todo porque sugiere posibilidades casi ilimitadas de movimiento en dirección horizontal. También tiene importancia el hecho de que sobrevivan tanto tiempo, a pesar de ser muchos los factores desfavorables para su existencia.
>
> La presencia de polen a grandes alturas es otro indicio de la intervención del aire como vehículo de transporte de pólenes anemófilos a grandes distancias.
>
> Las grandes cantidades de polvo obtenidas en comparación con el número de microorganismos respectivos interesa en lo que concierne a las diversas procedencias del polvo; algunos focos, como el suelo, pueden contener bacterias en gran proporción, mientras que en otros casos pueden ser estériles las partículas procedentes de chimeneas e industrias.

RECUENTO DE BACTERIAS DEL AIRE

Kock (1881) empleaba medios sólidos en placas y los exponía al aire durante períodos variables de tiempo. Luego incubaba las placas y recontaba las colonias.

Este es uno de los procedimientos más sencillos para analizar aire, pero no tiene valor en el aspecto cuantitativo, ya que no indica el

número de microbios contenidos en un volumen dado de aire. Sin embargo, proporciona datos relativos y se emplea comúnmente con ese objeto.

En la figura 171 se exponen los resultados de exponer placas a distintos ambientes por tiempos iguales, e incubarlas a 37° C durante 24 horas. Puede apreciarse que la población bacteriana aumenta con la actividad de la atmósfera.

Petri (1888) filtraba aire a través de un tubo con arena pasada previamente por un tamiz de 100 mallas, en cantidad adecuada para

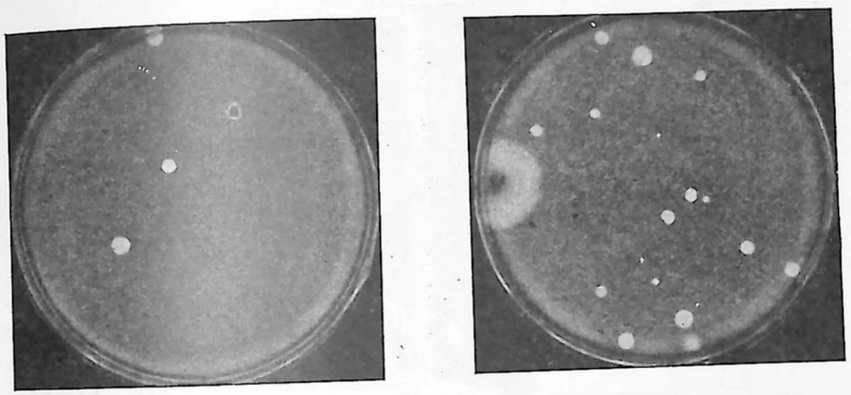


Fig. 171
Bacterias del aire. Izquierda, colonias en desarrollo sobre placa de agar, expuestas a una atmósfera tranquila (oficina) durante diez minutos. Derecha, colonias similares expuestas a una atmósfera activa (laboratorio) durante igual lapso.

retener los gérmenes en la arena. Ésta se agitaba luego con solución salina estéril, para suspender las bacterias, y se llevaba en porciones iguales a placas de Petri, donde se mezclaba con agar fundido.

En 1909 la American Public Heath Association adoptó oficialmente, como procedimiento normalizado para el análisis bacteriológico del aire una modificación del método de la arena, de Petri (fig. 172). Sobre un tapón perforado de goma, previamente cubierto con un trocito de tela de cedazo, se dispone una capa de arena fina, de 1 cm de espesor, en un tubo de vidrio de 70 mm de longitud y 15 mm de diámetro; por el agujero del tapón se pasa un tubo de 6 mm de diámetro y 40 mm de longitud, en comunicación con un frasco aspirador. Se obtura el extremo superior del filtro de arena con un tapón de corcho, por el que pasa un tubo de las mismas dimensiones que el inferior, doblado en ángulo de 45° para que no caigan bacterias ni polvo en el filtro. Después de pasar por éste un volumen conocido de aire, se agita la arena en 10 ml de agua esterilizada, y se montan partes alícuotas en placas de agar nutritivo.

Ruehle (1915, *a*, *b*) recomendó una modificación del método de la

arena de Petri, que fué adoptado en 1917 por el Comittee on Standard Methods for the Examination of Air. En esta variante, el tubo pequeño de abajo se suelda al grande, y se prescinde así del tubo de goma y de la tela de cedazo; la capa de arena descansa sobre un poco de algodón introducido en el resalto de la soldadura.



Fig. 172
Modificación del filtro de arena de Petri, adaptada por la American Public Health Association, 1909.

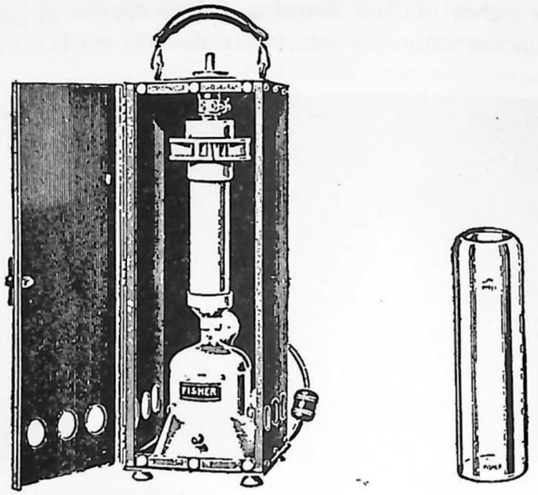


Fig. 173
Izquierda, centrífuga de aire internacional de Wells. Derecha, tubo de aire de la centrífuga. (Con licencia Fisher Scientific Company.)

Wells (1933) describe un instrumento para recontar bacterias del aire utilizando el principio de la centrífuga para su separación. El instrumento funciona a semejanza de una centrifugadora de leche, que separa de un líquido partículas algo pesadas. El rápido giro de un cilindro de vidrio sobre su eje vertical hace pasar una corriente de aire por un tubo central, de donde sale deslizándose a lo largo de una delgada capa de agar nutritivo depositada en las paredes del cilindro; sobre el agar se depositan bacterias y otros microorganismos suspendidos en el aire. Después de incubar, aparecen colonias visibles en los puntos de precipitación de cada bacteria, y pueden contarse.

Según el autor, en un solo aparato se combinan cuatro operaciones distintas:

1.ª Se origina y regula una corriente de aire.
2.ª Se mide el volumen de aire.
3.ª Se recogen las bacterias.
4.ª Las bacterias se desarrollan y pueden contarse en el medio colector, sin pasarlas a placas.

La centrífuga de Wells se maneja bien y con rapidez, y es portátil. La prueba se efectúa de una sola vez, y el aparato tiene una amplia esfera de aplicación, ya que sirve cualquier medio sólido, de acuerdo con los tipos de microorganismos que hayan de cultivarse.

Hollaender y Dalla Valle (1939) han descrito un aparato de embudo para obtener muestras de bacterias del aire (fig. 174). Consiste en un

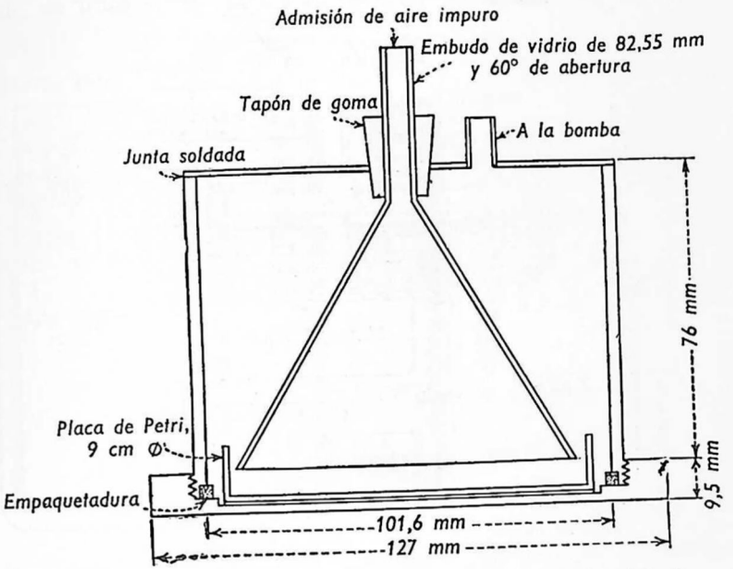


Fig. 174. — Aparato de embudo para recoger bacterias del aire. (Según Hollaender y Dalla Valle.)

recipiente de latón con fondo amovible, y provisto de un embudo de vidrio de 60° y unos 8 cm, que se coloca invertido a cosa de 1 cm del fondo de una placa corriente de Petri; ésta se dispone en la parte inferior del recipiente, antes de usarla, y luego se atornilla bien contra la arandela indicada en la figura. La parte interior y el borde del embudo se limpian bien con alcohol antes de empezar. La muestra de aire pasa por el pico del embudo, y los microorganismos y el polvo que arrastra son despedidos hacia el medio contenido en la placa de Petri; para impulsar el aire se utiliza una bomba impelente ordinaria, montada en serie con un contador, y la velocidad más conveniente viene a ser de unos 28 litros por minuto. Los autores estiman su aparato de embudo más útil que la centrífuga de Wells, y obtienen resultados algo más altos que en ésta cuando el número de bacterias es bajo. El método es sencillo, el aparato se puede transportar bien y toda la prueba se efectúa en una sola operación.

Luckiesh, Taylor y Holladay (1946) recomiendan emplear un colector

de chorro radial (fig. 175), utilizando el principio del de ranura primeramente empleado por Bourdillon, Lidwell y Thomas (1941). El aire que ha de examinarse pasa por el aparato impulsado mediante una bomba de vacío acoplada a la salida; penetra en un cilindro cerrado de metal, según se indica, pasa por una ranura radial abierta en el fondo

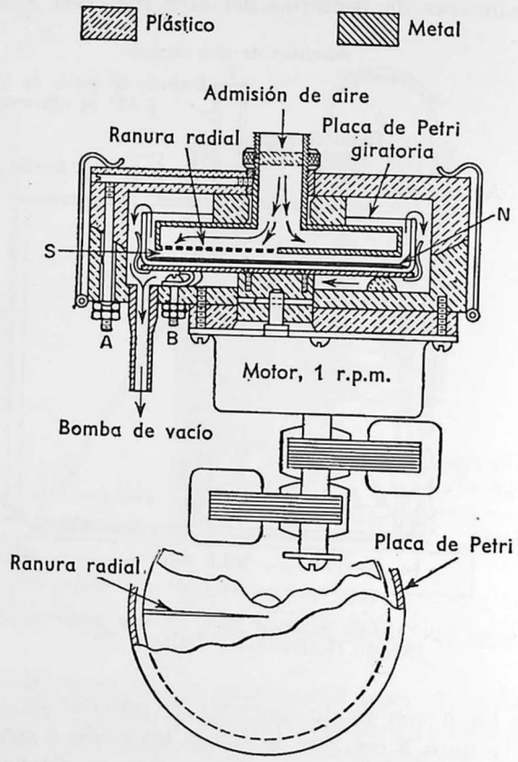


Fig. 175
Sección vertical del colector de aire en chorro radial; abajo, planta de la ranura radial con relación al platillo de Petri. (Según Luckiesh, Taylor y Holladay.)

del cilindro, y llega con gran velocidad al medio de cultivo montado en el platillo de Petri; abajo salva el borde del mismo y sale por un agujero inferior. A razón de unos 28 litros por minuto, la velocidad del aire a través de la ranura se aproxima a 30 m por segundo. La placa de Petri se hace girar a 2 r.p.m., a fin de distribuir uniformemente las colonias por la superficie del medio de cultivo.

La utilidad del colector se ha podido apreciar acoplando en serie con él otros distintos; al parecer, el colector de chorro radial recoge más del 95 % de las bacterias que el aire contiene.

Los mismos autores han aplicado también la técnica del principio electrostático a la colección de bacterias e ideado un colector de aire

que calificaron de electrostático duplex (fig. 176). Se colocan los dos platillos de Petri en las dos unidades de material plástico provistas de tapas amovibles. Un ventilador eléctrico impulsa aire a velocidad igual a través de las dos unidades, de las cuales una tiene el electrodo inferior negativo, y positivo el superior, un cono metálico más bien achatado; en la otra unidad, las condiciones eléctricas están invertidas. La tensión aplicada de unos 7.000 voltios procede de un rectificador de semionda

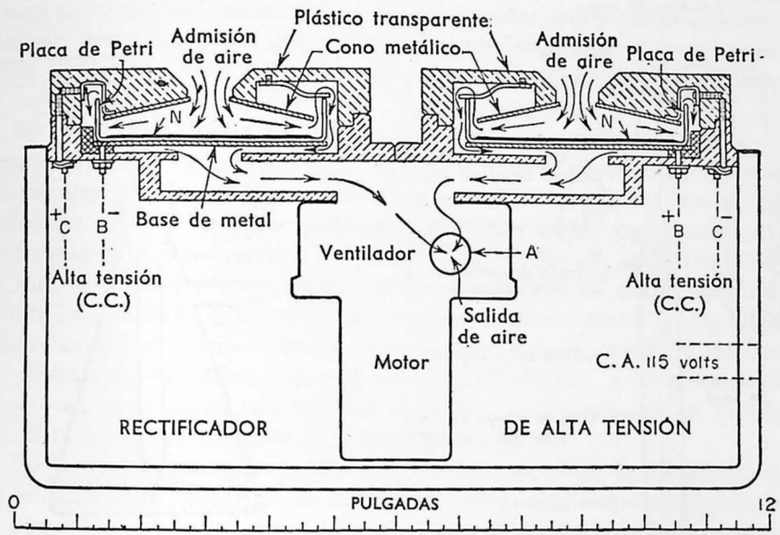


Fig. 176. — Sección vertical del colector electrostático duplex de aire. (Según Luckiesh, Taylor y Holladay.)

con un transformador de alta tensión y una válvula de $879/2 \times 2$; el aire pasa por cada unidad a unos 14 litros por minuto.

En el aire existen simultáneamente bacterias con carga positiva y negativa. Las primeras se recogerán en el electrodo negativo (en el platillo de Petri colocado encima), y las segundas, en el electrodo positivo. Por consiguiente, una unidad recoge en la placa de Petri las de carga positiva, y otra, las de carga negativa.

Lemon (1943) ha recomendado un sencillo aparato para recoger microorganismos de un volumen de aire conocido (fig. 177). El aparato consiste en un tubo de aireación Folin, de vidrio, que en un extremo lleva una dilatación con seis agujeros. El tubo se pasa por un tapón de dos orificios, y la bombilla se centra junto al fondo del tubo de ensayo que sirve de recipiente. El sifón de Kjeldahl con tabique cuadrado de vidrio está acortado a propósito por ambos extremos, y en la admisión se practica una ligera curvatura para poderla insertar en el otro agujero del tapón. Un contador mide la velocidad con que el aire

entra por el extremo superior abierto del tubo de Folin. Al extremo de salida del sifón de Kjeldahl se conecta una bomba neumática.

Todo el cuentaburbujas se puede esterilizar en autoclave o enjuagándolo con alcohol de 70 % y secándolo. El aire, introducido a razón de 25 a 30 litros por minuto, se dispersa a través de 20 ml de caldo que contiene dos a tres gotas de aceite de oliva para que no haga

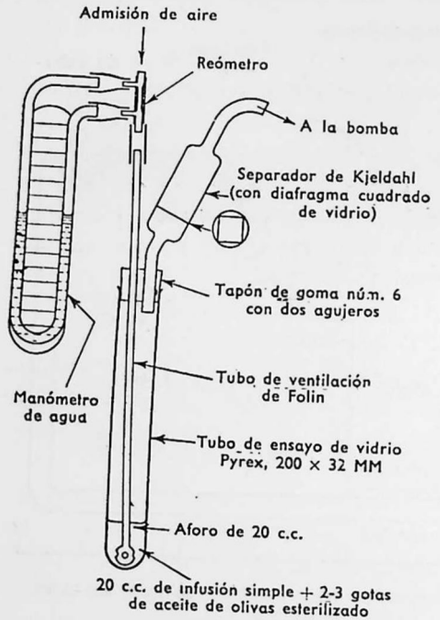


Fig. 177. — Aparato colector de bacterias del aire. (Según Lemon.)

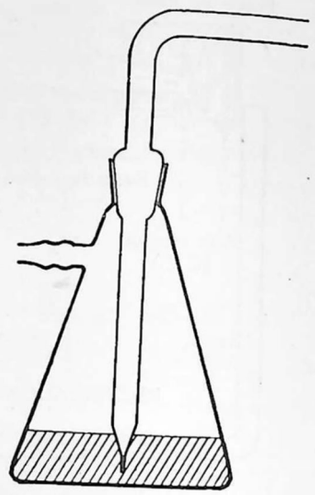


Fig. 178.
Inyector capilar; véase descripción en el texto. (Según Kluyver y Visser.)

espuma. Las muestras de aire de habitaciones suelen medir unos 300 litros para dar resultados satisfactorios.

Kluyver y Visser (1950) compararon varios colectores de aire y llegaron a la conclusión de que el más útil era el de inyección capilar (figura 178), empleado por Rosebury (1947). El aire se pone en contacto con el agua por medio de un tubo capilar, que tiene por objeto deshacer grumos o agregados de bacterias. Lo mejor es situar el orificio capilar unos 5 mm por encima del fondo del frasco, y al menos 5 mm por debajo de la superficie del agua. Luego se mezcla una parte alícuota de agua con el agar nutritivo fundido y se cuenta el número de colonias desarrolladas. El aparato recoge no menos del 99 % de las esporas de *Bacillus cereus* procedentes de aire artificialmente contaminado.

Más información sobre colectores de bacterias del aire se encontrará en Bentzen, Morch y Skadhauge (1947), Du Buy y Hollaender (1945), Du Buy, Hollaender y Lackey (1945), Rosebury (1947), Wells y otros (1947).

IMPORTANCIA DEL ESTADO DE SUSPENSIÓN

Los microbios del aire no están casi nunca libres, sino generalmente adheridos a partículas flotantes de polvo, saliva o carbón. El estado de suspensión influye mucho en la velocidad de sedimentación de las bacterias del aire. Es de gran importancia distinguir entre microorganismos saprófitos del suelo, que se levantan como polvo continuamente, y los que proceden de tejidos orgánicos e invaden el aire al toser, estornudar, hablar o cantar. Los primeros no tienen probablemente carácter patógeno, pero sí los segundos.

El estado de suspensión de las bacterias incorporadas al aire en estas condiciones es diferente. Los microorganismos libres son poco más pesados que el aire, y se depositan muy despacio en una atmósfera tranquila; una ligera brisa basta para mantenerlos en suspensión casi indefinidamente. Las partículas de polvo cargadas de bacterias caen con mayor rapidez y permanecen en una atmósfera de polvo por poco tiempo. Las gotitas expelidas al aire cuando se tose o estornuda no caen siempre inmediatamente al suelo a poca distancia de su origen; a medida que disminuye su tamaño, la superficie que exponen a la resistencia del aire se hace mayor con relación al peso o la atracción de la Tierra, lo cual reduce gradualmente su velocidad de caída.

De la superficie expuesta depende también el ritmo de evaporación, que se acelera al disminuir el tamaño de las gotitas; el de algunas es tan pequeño, que se evaporan por completo al caer desde la altura de una persona erguida. Se ha calculado que miden aproximadamente 0,1 mm de diámetro. Los residuos de gotas de estas dimensiones flotan o son arrastrados por los vientos más flojos y, en realidad, entran a formar parte de la atmósfera misma.

Puede decirse que las infecciones del aire provienen de dos tipos de gotitas, según el tamaño de éstas. La infección genuina por gotitas corresponde a las mayores de 0,1 mm de diámetro, que caen rápidamente a poca distancia de su origen antes de secarse. El otro tipo de infección por gotitas puede calificarse de aérea, término que se aplica a los residuos secos de gotitas infectadas (núcleos de microgótulas) de diámetro inferior a 0,1 mm. El tiempo que permanecen suspendidas en el aire depende de la actividad de la atmósfera. La infección por gotitas puede transformarse en aérea cuando se evaporan gotas grandes al caer al suelo y se levantan luego a modo de polvo. Puede verse que la primera se mantiene localizada y concentrada, en tanto que la segunda recorre a veces grandes distancias, y es diluída.

El polvo de salas de hospital, cuarteles y otros lugares en donde se aglomera gente, se contamina notoriamente mucho con ciertas bacterias patógenas productoras de enfermedades del aparato respiratorio,

en particular de infecciones estreptocócicas. Estos microorganismos, al dispersarse en el aire desde el pavimento, las ropas de cama y las de los ocupantes del local, mientras se barre, se hacen las camas o se viste a los enfermos, provocan una contaminación general del ambiente muy propicia a la propagación del mal por contacto directo o indirecto con el polvo infectado. Estudios recientes sugieren que la difusión de afecciones de las vías respiratorias en esta forma es más importante que la inhalación directa de gotitas o núcleos de microgótulas infecciosas.

Para más información, consúltense los trabajos de Duguid y Wallace (1948), y Loosli (1947, 1948).

GÉRMENES PATÓGENOS DEL AIRE Y MEDIOS DE COMBATIRLOS

Técnicas modernas desarrolladas durante los últimos quince años han provocado un interés mayor por la bacteriología del aire. Antes se suponía que el aire apenas participaba en la transmisión de infecciones de una persona a otra; esto no puede ya mantenerse, pues se ha demostrado cumplidamente que el aire puede transmitir infecciones, sobre todo las del aparato respiratorio, y que éstas se presentan a veces con frecuencia, sobre todo en locales cerrados, como aposentos, oficinas, salas de espectáculos, vestíbulos, etc.

Wells (1935, 1938), investigando acerca de infecciones aéreas, llega a las siguientes conclusiones:

1.ª Al toser o estornudar pueden proyectarse al aire gotitas con microorganismos procedentes de superficies infectadas.

2.ª La mayoría de estas gotas son suficientemente pequeñas para evaporarse antes de llegar al suelo, y dejan suspendidos en el aire diminutos residuos.

3.ª Estos núcleos, donde los gérmenes permanecen viables durante largo tiempo, pueden ser arrastrados por corrientes de aire como las partículas de humo de un cigarrillo.

4.ª El aire respirado en común por diversas personas reunidas en una habitación u otro local cerrado pueden transportar así gérmenes de una persona a otra y dar ocasión a que se fijen en los tejidos sensibles de las vías respiratorias.

Jennison (1941, 1942), Jennison y Edgerton (1940) y Jennison y Turner (1941), mediante fotografía rápida, demostraron que la distancia a que se expelen la mayoría de las gotitas espiradas no rebasa 60 a 90 cm, y a menudo es menor; en cambio, las descargadas al toser o estornudar alcanzan una velocidad de más de 40 m por segundo. Tal rapidez, en aire seco, acarrearía su evaporación casi instantánea, con producción

de núcleos de gotitas minúsculas. Asimismo probaron que la gran mayoría de las gotitas de estornudos, antes de evaporarse sensiblemente, miden 0,1 a 2 mm de diámetro.

Duguid (1946) hizo visibles gotitas introduciendo colorante en la boca del sujeto un momento antes de cada ensayo; los colorantes empleados fueron rojo Congo, eosina y fluoresceína. Una vez disueltos éstos en la boca, se provoca la expulsión de gotas por estornudo, tos, o haciendo hablar. La rociada se dirigía hacia una placa corrediza mantenida a 76 mm delante de la boca, en ensayos verbales, y 152 mm en los de tos y estornudo. Las placas se examinaron al microscopio y se midió el diámetro de 12.000 gotitas con ayuda de un ocular micrométrico; así se vió que esta dimensión variaba entre 0,001 y 2 mm, con 95 % entre 0,002 y 0,1 mm. Las gotitas más pequeñas eran relativamente más numerosas después de estornudar que después de toser o hablar.

Boyland, Gaddum y McDonald (1947) han descrito un aparato para determinar la penetración de partículas suspendidas en el aire a través de la nariz. Midieron esta penetración empleando partículas de una aspersión líquida en ratas, conejos, cabras, ovejas y personas, y comprobaron que era inversamente proporcional a la velocidad de circulación por la nariz. Las partículas del orden de 0,001 mm de diámetro pasaban a todas velocidades, y sólo muy pocas, mayores de 0,015 mm, lo hacían exclusivamente con escasa rapidez.

Estos resultados parecen indicar que las partículas menores constituyen para la salud un peligro mayor que las grandes, porque pueden introducirse mejor en las profundidades de los pulmones.

Du Buy, Arnold y Olson (1947) emplearon *Lactobacillus acidophilus*, residente normal en la cavidad de la boca, como organismo de ensayos en estudios sobre bacterias del aire. Según estos autores, los lactobacilos de las vías aéreas superiores no llegaban a suspenderse en número apreciable en el aire que rodea a un individuo al hablar, toser o estornudar. Los resultados de experimentos acerca de la relación cuantitativa entre el número de gérmenes suspendidos en el aire y de los recuperados del aire, indican que ha de haber en suspensión 10^5 a 10^7 microorganismos por mililitro para proporcionar una muestra de aire de la cual puedan recuperarse microorganismos. Los lactobacilos suspendidos en el aire a partir de un medio líquido, por medios naturales o artificiales, sedimentaban desde el aire con gran rapidez.

Walter y Hucker (1942) han comprobado que los estreptococos β están relativamente muy difundidos en las barreduras del suelo de locales públicos, particularmente de escuelas. Algunos estreptococos dispersos sobreviven más de cinco días si se siembran artificialmente en polvo seco esterilizado, y más de 31 horas al esparcirlos sobre la superficie de tablas de pavimento y dejarlos allí a la temperatura ambiente.

Hamburger, Green y Hamburger (1945 *a*, *b*) examinaron la nariz y la

garganta de pacientes en dos hospitales militares, e informan que aproximadamente 2/3 de los aquejados de tonsilitis-faringitis estreptocócica o escarlatina dan cultivos nasales positivos. En el 95 % de los casos, los estreptococos hemolíticos β persisten más en la garganta que en la nariz. Se recuperaron muchos más estreptococos hemolíticos del aire de salas de pacientes con cultivos positivos de nariz que de aquellas en que tales cultivos eran negativos, y positivos los de garganta. Con la desaparición de gérmenes de la nariz coincidía una disminución del número de los recuperados del aire ambiente. Los portadores de estreptococos hemolíticos β con cultivos nasales fuertemente positivos representan un grupo mucho más peligroso que aquellos en que sólo eran positivos los cultivos faríngeos.

Hamburger (1947) ha hecho cultivos cuantitativos de las manos de portadores de estreptococos hemolíticos en la nariz, y de individuos que cambiaron con ellos apretones de manos. Los resultados demostraron que por este medio pueden transmitirse hasta 49.900 de estos gérmenes patógenos, y que los números más altos corresponden a los portadores que se acababan de sonar en pañuelos esterilizados.

Hamburger y Robertson (1948) han determinado el número de estreptococos descargados en el aire de un local de experimentación al estornudar, toser y hablar. Así consiguieron diferenciar entre estreptococos expelidos en gotitas grandes, rápidamente depositadas, y estreptococos contenidos en núcleos de gótulas que permanecían en el aire al menos varios minutos.

Reconocieron cuatro tipos de dispersión por estornudo (fig. 179). En el más corriente se expulsaba un número moderado de microbios en gotitas grandes que caían rápidamente al suelo a 45 cm del sujeto, pero muy pocos núcleos de gotitas, o ninguno. En uno de estos dos tipos menos corrientes se expulsaron escasos estreptococos en núcleos de gotitas al estornudar, y ninguno en gotitas grandes; y en el otro no se recuperó un solo estreptococo del aire. En el tipo más insólito se expulsaron muchos estreptococos en gotitas grandes y en núcleos de gotitas minúsculas, y se recogieron muchos aun a 290 cm del sujeto examinado.

Loosli, Lemon, Wise y Robertson (1948) y Lemon, Loosli y Hamburger (1948) efectuaron un estudio bacteriológico de polvo de pavimentos, camas, ropas de vestir y aire, en los barracones de un campamento. La contaminación estreptocócica de las naves era reducida durante los meses de invierno y verano, e intensa en los de primavera, al aumentar la frecuencia de afecciones respiratorias entre el personal.

Los individuos con cultivos positivos de nariz y garganta daban números mucho mayores de los correspondientes tipos de estreptococos que aquellos que sólo los presentaban en los de garganta. En los barracones donde la mayoría de los cultivos positivos obtenidos de las camas, del polvo y del aire mostraban el mismo tipo de *Streptococcus*, este

tipo predominaba en los cultivos positivos de nariz y garganta del personal alojado en los barracones.

El número mayor de cultivos positivos del aire se obtuvo en las naves donde las camas y el suelo estaban muy contaminados de estreptococos hemolíticos. Los recuentos más altos por cada 28 litros de aire, y los cultivos más frecuentemente positivos, coincidieron con el período de máxima actividad, como el de levantarse, vestirse, barrer el piso y hacer las camas.

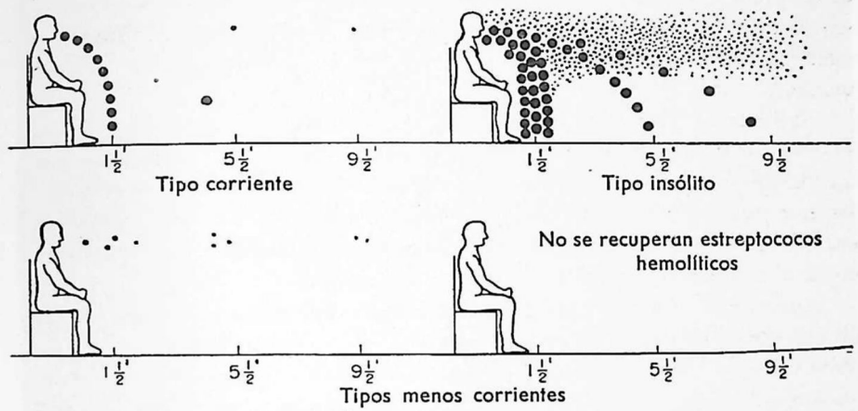


Fig. 179. —Tipos de expulsión de estreptococos hemolíticos al estornudar sus portadores. Los puntos gruesos representan gotitas grandes, que cayeron rápidamente al suelo y se recogieron en placas de sedimentación. Los puntos pequeños corresponden a «núcleos de gotitas minúsculas», que permanecieron largo tiempo suspendidos en el aire. (Según Hamburger y Robertson.)

Wells, Ratcliffe y Crumb (1948) agregaron suspensiones homogéneas de células sueltas de *Mycobacterium tuberculosis* al aire respirado por conejos, y determinaron su concentración. Según su informe, los núcleos depositados a menos de 3 cm por minuto en aire tranquilo penetraban sin excepción en los pulmones, y se fijaban en las superficies alveolares del órgano entero. En cuatro a cinco semanas se desarrollaron tubérculos visibles en los puntos de fijación. Menos del 10 % de los núcleos depositados a razón de 30 cm por minuto llegaron a los pulmones, y los restantes no afectaron aparentemente al animal. Más de 10.000 bacilos de un cultivo que producía tubérculos en el pulmón se ingirieron sin efecto perceptible. En conclusión, opinan que la inhalación de unos pocos bacilos tuberculosos en los núcleos de gotitas expulsados al toser o estornudar es más importante que la de números mucho mayores de microorganismos en partículas mayores deslizados al interior de las vías respiratorias altas e ingeridos.

Efecto de la humedad atmosférica sobre la supervivencia. Lester (1948) expuso ratones blancos a atmósferas que contenían cantidades

conocidas de virus gripales atomizados (cepa PR8), de potencia constante en condiciones de humedad variable, y comprobó que una cantidad de suspensión de virus atomizados capaz de ocasionar una mortalidad de 100 % en animales expuestos a humedades relativas de 30 y de 80 %, respectivamente, sólo hacían sucumbir a 22,5 % de los ratones con 50 % de humedad. Los grados de humedad comprendidos entre estos valores proporcionaron resultados intermedios. La infecciosidad de los virus del aire disminuyó con 50 % de humedad tan aprisa, que fué imposible lograr un índice de mortalidad de 100 % entre los ratones expuestos, aun aumentando mucho la dosis de virus atomizados.

El empleo de una suspensión de virus dializados con 50 % de humedad ocasionó la muerte de todos los ratones expuestos. Esto sugiere que la influencia deletérea de la humedad guarda relación con la presencia de cloruro sódico en la suspensión atomizada.

Dunklin y Puck (1948) han comunicado resultados similares con neumococos, estreptococos y micrococos, lo que induce a pensar que el factor causante del efecto letal de la humedad es común a partículas húmedas con las bacterias mencionadas o con virus A de gripe.

Lidwell y Lowbury (1950 *a*) observaron que las bacterias del polvo sobreviven más en muestras conservadas en un armario que las almacenadas a 4° C en una nevera donde la humedad relativa variaba entre 75 y 90 %, según se comprobó. El inconveniente de la gran humedad había sobrepujado sin duda la ventaja de la temperatura próxima al cero.

Ciertos gérmenes patógenos pueden multiplicarse efectivamente en el polvo cuando la humedad atmosférica se aproxima al punto de saturación. Esto no es corriente en interiores, pero puede ocurrir en habitaciones sin calefacción durante el invierno o en pisos que se mantengan húmedos.

Contra la creencia general de que es más sano un clima seco, debe insistirse en que muchas bacterias, y probablemente también virus, toleran mejor atmósferas secas que las húmedas.

Véase más información en Ames y Nungester (1949), Comission on Acute Respiratory Diseases (1945), Dautrebande, Highman, Alford y Weaver (1948), Habel (1945), Hodes, Schwentker, Chenoweth y Peck (1945), Lurie (1945), Phair y Schoenbach (1945), Ouchterloyn (1949), Wheeler y Jones (1945).

Diseminación aérea de gérmenes durante operaciones de laboratorio. Se han producido infecciones en el personal de laboratorios al manipular con gérmenes patógenos tales como *Brucell abortus, B. melitensis* y *Pasteurella tularensis*. En muchos casos, el origen de estas infecciones no se ha aclarado, y tampoco se las ha relacionado con accidentes ya conocidos con ocasión de manejar cultivos. Se han aceptado muchas técnicas de laboratorio sin fijarse en lo que puedan contribuir a la diseminación de microorganismos en el aire.

Johansson y Ferris (1946), por medio de técnicas taquifotográficas y colectoras de aire, demostraron que ciertas operaciones bacteriológicas corrientes, como el trasiego con pipeta o directo y la agitación vigorosa de material para diluir, producían a menudo contaminaciones bacterianas del aire y del ambiente (fig. 180). Poco más de una mitad de las operaciones de laboratorio revelaron aerosoles de gotitas formados al despedir

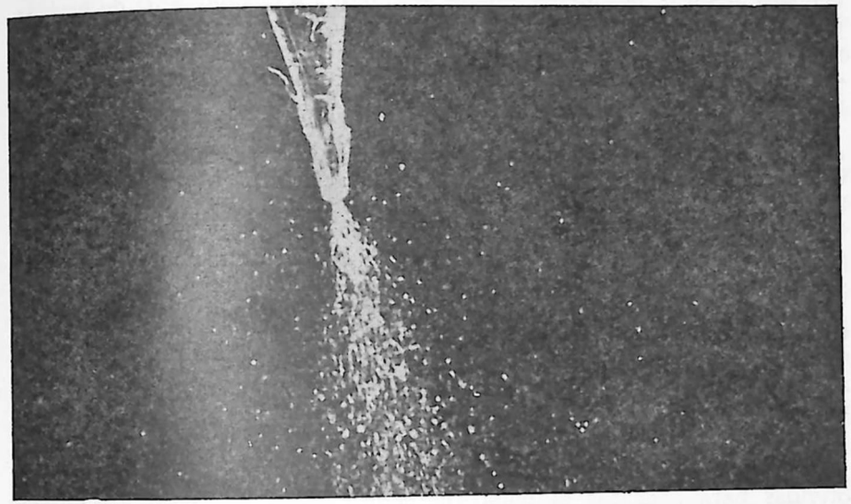


Fig. 180. — Expulsión de la última gota de una pipeta; se dejó escurrir el líquido, y, para expulsar la gota remanente, se sopló con moderada fuerza.

soplando la última gota de una pipeta o al quitar los tapones de los tubos fuertemente agitados. Son indudables los riesgos de manejar algunos de los agentes más infecciosos con el material comúnmente usado en los laboratorios.

Desinfección del aire. Se han empleado y encontrado practicables diversos métodos para la continua desinfección del aire en recintos cerrados. Pueden clasificarse como sigue:

1.° Supresión del polvo, particularmente aplicando emulsiones oleosas a suelos, mantas y sábanas.
2.° Inactivación de bacterias y virus mediante vahos y vapores.
3.° Inactivación de bacterias y virus con rayos ultravioleta.

Supresión del polvo. Como ya se ha explicado, se encuentran en el polvo microorganismos patógenos, parásitos y saprófitos, cuya eliminación o destrucción es de gran importancia para la economía y la salud pública.

Según Loosli (1947),

La proporción de bacterias en el polvo de residencias, escuelas, fábricas, oficinas y hospitales varía según los diversos ambientes. Predominan los gérmenes saprófitos, pero a veces se encuentran agentes parásitos y patógenos en crecido número. Personas sanas y enfermos lanzan más o menos continuamente bacterias al aire en secreciones y excresiones varias: *a)* de las vías respiratorias (secreciones nasales y faríngeas, esputos, descarga del oído, la apófisis mastoides y los senos); *b)* de los conductos gastrointestinal y urinario (heces, vómitos, orina); *c)* de la piel (escamas y pelos, lesiones cutáneas sépticas, membrana mucosa, conjuntiva y vagina), y *d)* de heridas (supuraciones de heridas sépticas, quemaduras y abscesos). Así como el polvo de la atmósfera exterior puede no ser peligroso, el que se encuentra en locales cerrados debe considerarse siempre como un foco potencial de agentes patógenos.

El polvo, como vehículo para diseminar agentes productores de enfermedades, se ha estudiado sobre todo en relación con infecciones de las vías respiratorias, de la piel, y con infecciones secundarias de quemaduras y heridas. Se ha comprobado la existencia de abundantes estreptococos hemolíticos, estafilococos, neumococos, bacilos diftéricos y bacilos tuberculosos en el polvo del piso de salas de hospitales, y también que sobreviven en el ambiente por espacio de largo tiempo. Poco se sabe acerca de la supervivencia de virus en el polvo; pero se ha comprobado que el virus *A* de gripe sigue viviendo hasta diez días en el polvo del suelo sin perder su capacidad de producir infección en animales sensibles. Los gérmenes expelidos en gran número por las vías respiratorias en gotitas y núcleos de gotitas terminan por sedimentar y formar parte del componente bacteriano del polvo.

Es muy eficaz untar con aceite los pisos, las ropas de cama y otras prendas para suprimir el polvo, la pelusa y las bacterias contenidas en el aire. La acción del aceite es puramente mecánica. Hoy se conocen métodos para tratar superficies y telas con aceite, todos ellos practicables por su sencillez y su baratura. Aunque los focos más importantes de gérmenes patógenos en el ambiente de salas de hospital son los pisos y las ropas de cama, conviene aceitar todas las superficies (pisos, mesas, tableros de pupitres, etc.), así como todos los tejidos (mantas, sábanas, pijamas, ropas de enfermeras y médicos, etc.), para suprimir el polvo lo más completamente posible.

Hasta ahora, del estudio de esta cuestión se desprende que, aplicando aceite a los pisos, las ropas de cama y otros tejidos, se puede reducir notablemente la frecuencia de las infecciones de las vías respiratorias por estreptococos en salas de hospitales y cuarteles.

Más información contienen los trabajos de Loosli (1948), Miller y otros (1948), Shechmeister y Greenspan (1947), Willmon, Hollaender y Langmuir (1948).

Efecto de los hipocloritos. Adward y Lidwell (1943) han señalado la posibilidad de destruir 90 a 99 % o más de los virus de gripe en una atmósfera agregándole suficiente gas hipocloroso para alcanzar una concentración final de 1 : 2.000.000. Resultados análogos se obtienen empleando hipoclorito sódico.

Challinor (1943) pulverizó en el aire una solución de hipoclorito sódico al 1 %, y dió cuenta de una notable reducción del número de bacterias. En su opinión, aplicando este práctico y sencillo método de desinfección del aire podría reducirse la propagación de infecciones por este medio.

Elford y Van den Ende (1945) han informado que la eficacia de los hipocloritos y los aerosoles de ácido hipocloroso, a concentraciones de 0,1 a 0,3 partes de HClO por millón, contra microbios del aire, dependía de la proporción de humedad. El grado de inactivación de estreptococos y estafilococos pulverizados como aerosoles resulta bajo cuando la humedad relativa no llega a 50 %; si ésta se mantiene entre 70 y 90 %, los microorganismos mueren muy rápidamente.

Efecto de los glicoles. Robertson, Bigg, Puck y Miller (1942), y Puck, Robertson y Lemon (1943), atomizaron propilenglicol en el aire y manifiestan que 1 g de compuesto vaporizado en 2 a 4 millones de mililitros de aire esterilizan inmediatamente y por completo el aire rociado previamente con neumococos, estreptococos, estafilococos, *Hemophilus influenzae* y otros microorganismos, así como con virus de gripe. El proceso germicida resultó eficaz sobre todo a una temperatura inferior a 27° C, con una humedad atmosférica relativa de 45 a 70 %.

Bigg (1943) supone que los glicoles ejercen su acción bactericida por su importante propiedad física, la higroscopicidad. Las moléculas de glicol se disuelven en la película de humedad que envuelve cada célula bacteriana; cuando la concentración del producto se hace suficientemente grande, se despoja de humedad a la célula, y ésta muere.

Loosli, Smith, Gauld. Robertson y Puck (1947) estudiaron el efecto de los vapores de trietilenglicol en salas de hospitales, y comprobaron que una concentración de 55 a 70 % de estos vapores reducía en 31 a 70 % el número de bacterias del ambiente.

Krugman y Swerdlow (1949) descubrieron que el vapor saturado de trietilenglicol producía rápidamente la muerte de virus de parotiditis y de enfermedad de Newcastle contenidos en el aire.

Lester y otros (1949) han estudiado la rapidez con que el trietilenglicol mataba bacterias recién atomizadas en diversas condiciones de humedad atmosférica y saturación proporcional del aire con sus vapores. Comprobaron que en condiciones óptimas (15 a 40 % de humedad relativa y 40 a 100 % de la saturación con vapores de glicol a la temperatura ordinaria) es muy rápida la acción bactericida. En uno a dos minutos de exposición, murieron 80 a 90 % de las bacterias, y en tres a cuatro minutos, las muestras de aire estaban esencialmente estériles. La rapidez bactericida, con cualquier humedad relativa entre 5 y 55 %, aumenta progresivamente a medida que asciende la saturación proporcional de los vapores de glicol. Al rebasar la humedad relativa 50 %, se observó una rápida disminución de la rapidez bactericida con cualquier satu-

ración proporcional de tales vapores; con una humedad relativa de 60 %, esa rapidez era de 1/5 a 1/6 de la óptima conseguida con grados menores de humedad.

Véase más información en Johnson (1950), Lester, Kaye, Roberson y Dunklin (1950), Personnel of United States Naval Medical Research Unit N.º 4 (1952), Puck (1947 *a*, *b*), Rosebury (1947), Meiklejohn, Kingsland y Boldt (1947).

Efecto de la luz ultravioleta. Los rayos ultraviolados de la luz solar o de lámparas de diversos tipos ejercen una acción destructiva

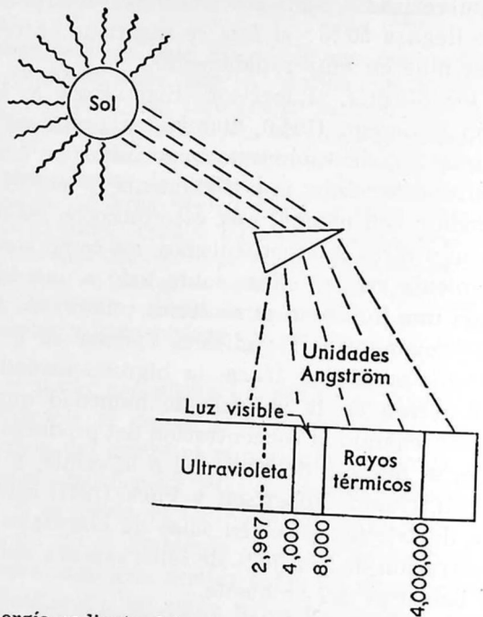


Fig. 181. — La energía radiante del sol puede dividirse en tres amplios grupos: energía de onda larga, como el calor, que es invisible; energía visible, que produce luz y color, y energía de onda corta, como el ultravioleta invisible. El efecto germicida corresponde a esta última. (Con licencia de General Electric Company.)

pronunciada sobre bacterias, virus y otros microorganismos suspendidos en el aire. La desinfección radiante del aire depende del tipo de infección, del estado de suspensión, de la humedad de la atmósfera, del volumen del recinto, de la calidad de la radiación, la energía y longitud de los rayos, la exposición total, la uniformidad de exposición y el movimiento del aire (Wells, 1942).

Se han empleado ampliamente con este objeto lámparas de vapor de mercurio a baja presión. Según Luckiesh y Holladay (1942 *a*, *b*), y Luckiesh, Taylor y Knowles (1947), estas lámparas emiten un 99 % de su flujo ultravioleta en una región espectral muy estrecha, próxima a 2537 Å, con un máximo a 2650 Å (fig. 181).

Edward, Lush y Bourdillon (1943) informan que por lo menos 99 %, y probablemente más, de los virus de gripe y vacuna pulverizados en el aire morían en pocos segundos por exposición a una lámpara de luz ultravioleta. Tales lámparas son particularmente útiles para prevenir la propagación de infecciones víricas de las vías aéreas superiores.

Miller y otros (1948) han aplicado radiaciones ultravioleta a los pisos y al aire de las capas superiores en barracones de reclutas, y dan cuenta de una reducción en 19,2 % del total de afecciones respiratorias. La cifra de infecciones por *Streptococcus* era muy elevada, y se consiguió reducirla en 24 %.

Para más información, véanse Du Buy y otros (1948), Jarrett, Zelle y Hollaender (1948), Langmuir, Jarret y Hollaender (1948), Lidwell y Lowbury (1950b), Lurie (1947), Perkins (1947), Perkins, Bahlke y Silverman (1947), Robertson (1947), Wells (1945), Willmon, Hollaender y Langmuir (1948).

REFERENCIAS

Ames, A. M., y W. J. Nungester: The initial distribution of air-borne bacteria in the host, *J. Infectious Diseases*, **84**: 56, 1949.

Bentzen, O., E. Morch, y K. Skadhauge: Investigation into infection by air and dust in bacteriological laboratories, *Acta Path.*, **24**: 401, 1947.

Bigg, E.: Effect of propylene glycol on bacterial spores, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **53**: 120, 1943.

Bourdillon, R. B., O. M. Lidwell, y J. C. Thomas: A slit sampler for collecting and counting air-borne bacteria, *J. Hyg.*, **41**: 197, 1941.

Boyland, E., J. H. Gaddum, y F. F. McDonald: Nasal filtration of airborne droplets, *J. Hyg.*, **45**: 290, 1947.

Challinor, S. W.: Bacteriological observations on the air of occupied premises. I. Air disinfection with hypochlorites. A simple practical method of disinfecting the air of occupied premises, *J. Hyg.*, **43**: 16, 1943.

Commission on Acute Respiratory Diseases: Atypical pneumonia, *Am. J. Med. Sci.*, **209**: 55, 1945.

Dalla Valle, J. M., y A. Hollaender: The effectiveness of certain types of commercial air filters against bacteria (*B. subtilis*), *Pub. Health Reports*, **54**: 695, 1939.

Dautrebande, L., B. Highman, W. C. Alford, y F. L. Weaver: Studies on aerosols. III. Production of liquid aerosols with an average mean micellary diameter under one-half micron, study of the agglutination of liquid micellae, *Arch. intern. pharmacodynamie*, **76**: 247, 1948.

Du Buy, H. G., F. A. Arnold, y B. J. Olson: Studies on the air transmission of microorganisms derived from the respiratory tract, *Pub. Health Reports*, **62**: 1391, 1941.

—, J. E. Dunn, F. S. Brackett, W. C. Dreessen, P. A. Neal, y I. Posner: An evaluation of ultraviolet radiation of sleeping quarters as a supplement of accepted methods of disease control, *Am. J. Hyg.*, **48**: 207, 1948.

— y A. Hollaender: Sampling devices, *Am. J. Med. Sci.*, **209**: 172, 1945.

—, —, y M. D. Lackey: A comparative study of sampling devices for airborne microorganisms, *Pub. Health Reports*, Suppl. 184, 1945.

Duguid, J. P.: The size and the duration of air-carriage of respiratory droplets and droplet-nuclei, *J. Hyg.*, **44**: 471, 1946.

— y A. T. Wallace: Air infection with dust liberated from clothing, *Lancet*, p. 845, Nov. 27, 1948.

Dunklin, E. W., y T. T. Puck: The lethal effect of relative humidity on air-borne bacteria, *J. Exp. Med.*, **87**: 87, 1948.

Edward, D. G., y O. M. Lidwell: Studies on air-borne virus infections. III. The killing of aerial suspensions of influenza virus by hypochlorous acid, *J. Hig.*, 43: 196, 1943.

—, D. Lush, y R. B. Bourdillon: Studies on air-borne virus infections. II. The killing of virus aerosols by ultra-violet radiation, *ibid.*, 43: 11, 1943.

Elford, W. J., y J. van den Ende: Studies on the disinfecting action of hypochlorous acid gas and sprayed solution of hypochlorite against bacterial aerosols, *J. Hyg.*, 44: 1, 1945.

Habel, K.: Mumps and chickenpox as air-borne diseases, *Am. J. Med. Sci.*, 209: 75, 1945.

Hamburger, M., Jr.: Transfer of beta hemolytic streptococci by shaking hands, *Am. J. Med.*, 2: 23, 1947.

—, M. J. Green, y V. G. Hamburger: The problem of the «dangerous carrier» of hemolytic streptococci. I. Number of hemolytic streptococci expelled by carriers with positive and negative nose cultures, *J. Infectious Diseases*, 77: 68, 1945*a*; II. Spread of infection by individuals with strongly positive nose cultures who expelled large numbers of hemolytic streptococci, *ibid.*, 77: 96, 1945*b*.

— y O. H. Robertson: Expulsion of Group A hemolytic streptococci in droplets and droplet nuclei by sneezing, coughing and talking, *Am. J. Med.*, 4: 690, 1948.

Hodes, H. L., F. F. Schwentker, B. M. Chenoweth, y J. L. Peck, Jr.: Scarlet fever as an air-borne infection, *Am. J. Med. Sci.*, 209: 64, 1945.

Hollaender, A., y J. M. Dalla Valle: A simple device for sampling air-borne bacteria, *Pub. Healt Reports*, 54: 574, 1939.

— y J. W. Oliphant: The inactivating effect of monochromatic ultraviolet radiation on influenza virus, *J. Bact.*, 48: 447, 1944.

Jarret, E. T., M. R. Zelle, y A. Hollaender: Studies of the control of acute respiratory disease among naval recruits. II. Limitations of ultraviolet irradiation in reducing air-borne bacteria in barracks with low ceillings, *Am. J. Hyg.*, 48: 233, 1948.

Jennison, M. W.: The dynamics of sneezing—studies by high-speed photography, *Sci. Monthly*, 52: 24, 1941.

—: Atomizing of mouth and nose secretions into the air as revealed by high-speed photography, *Aerobiology, Am. Assoc. Advance. Sci., Symposium*, 17: 106, 1942.

— y H. E. Edgerton: Droplet infection of air: Highspeed photography of droplet production by sneezing, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 43: 455, 1940.

— y C. E. Turner: The origin of droplet and air-borne infections, *The Trained Nurse and Hospital Rev.*, 106: 186, 1941.

Johansson, K. R., y D. H. Ferris: Photography of air-borne particles during bacteriological plating operations, *J. Infectious Diseases*, 78: 238, 1946.

Johnson, E. P.: Triethylene glycol in the control of air-borne dissemination of pneumoencephalitis (Newcastle Disease), *Virginia J. Sci.*, 1: 123, 1950.

Kluyver, A. J., y J. Visser: The determination of microorganisms in air, *Antonie van Leeuwenhoek*, 16: 299, 1950.

Koch, R.: Zur Untersuchung von pathogenen Organismen, *Mitt. Kaiser Gesundh.*, 1: 32, 1881.

Krugman, S., y B. Swerdlow: Lethal effect of triethylene glycol vapor on air-borne mumps virus and Newcastle disease virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71: 680 1949.

Landsberg, H.: Origin and physics of the atmosphere, *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 13: 154, 1951.

Langmuir, A. D., E. T. Jarrett, y A. Hollaender: Studies of the control of acute respiratory diseases among naval recruits. III. The epidemiological pattern and the effect of ultraviolet irradiation during the winter of 1946-1947, *Am J. Hyg.*, 48: 240, 1948.

Lemon, H. M.: A method for collection of bacteria from air and textiles, *Proc Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 298, 1943.

—, C. G. Loosli, y M. Hamburger, Jr.: The transmission and control of respiratory diseases in army barracks. II. The spread of hemolytic streptococcal infections among enlisted personnel. *J. Infectious Diseases*, 82: 72, 1948.

Lester, W., Jr.: The influence of relative humidity on the infectivity of air-borne influenza A virus (PR8 strain), *J. Exp. Med.*, 88: 361, 1948.

—, S. Kaye, O. H. Roberson, y E. W. Dunklin: Factors of importance in the use of triethylene glycol vapor for aerial disinfection, *Am. J. Pub. Health*, 40: 813, 1950.

—, O. H. Robertson, T. T. Puck, H. Wise, y M. Smith: The rate of bactericidal action of triethylene glycol vapor on microorganisms dispersed into the air in small droplets. *Am. J. Hyg.*, 50: 175, 1949.

Lidwell, O. M., y E. J. Lowbury: The survival of bacteria in dust. II. The effect of atmospheric humidity on the survival of bacteria in dust, *J. Hyg.*, 48: 21, 1950*a*; IV. Atmospheric humidity and the bactericidal action of ultra-violet irradiation, *ibid.*, 48: 38, 1950*b*.

Loosli, C. G.: Dust and its control as a means of disinfection of air, *Am. J. Pub. Health*, 37: 353, 1947.

—: Problem of dust control for the disinfection of air, *ibid.*, 38: 409, 1948.

—, H. M. Lemon, H. Wise, y O. H. Roberston: Studies on the transmission and control of respiratory disease within army barracks. I. Hemolytic streptococcal contamination of the environment, *J. Infectious Diseases*, 82: 59, 1948.

—, M. H. D. Smith, R. L. Gauld, O. H. Robertson, y T. T. Puck: Control of cross-infections in infants' wards by the use of triethylene glycol vapor, *Am. J. Pub. Health*, 37: 1385, 1947.

Luckiesh, M., y L. L. Holladay: Tests and data on disinfection of air with germicidal lamps, *Gen. Elec. Rev.*, 45: 223, 1942*a*.

— y —: Designing installations of germicidal lamps for occupied rooms, *ibid.*, 45: 343, 1942*b*.

—, A. H. Taylor, y L. L. Holladay: Sampling devices for air-borne bacteria, *J. Bact.*, 52: 55, 1946.

—, —, y T. Knowles: Killing air-borne respiratory microorganisms with germicidal energy, *J. Franklin Inst.*, 244: 267, 1947.

Lurie, M. B.: Experimental air-borne tuberculosis, *Am. J. Med. Sci.*, 209: 156, 1945.

—: Experimental air-borne tuberculosis and its control, *Am. Rev. Tuberc.*, 55: 124, 1947.

Miller, W. R., E. T. Jarrett, T. L. Willmon, A. Hollaender, E. W. Brown, T. Lewandowski, y R. S. Stone: Evaluation of ultraviolet radiation and dust control measures in control of respiratory disease at a naval training center, *J. Infectious Diseases*, 82: 86, 1948.

Ouchterloyn, Ö.: Air-borne infections. III. *Acta Med. Scand.*, 134: 296, 1949.

Perkins, J. E.: The present status of the control of air-borne infections, *Am. J. Pub. Health*, 37: 13, 1947.

—, A. M. Bahlke, y H. F. Silverman: Effect of ultra-violet irradiation of classrooms on spread of measles in large rural central schools, *ibid.*, 37: 529, 1947.

Personal de la U. S. Naval Medical Research Unit N.º 4: The use of triethylene glycol vapor for control of acute respiratory diseases in Navy recruits. I. Physical factors and the effect of air-borne bacteria; II. Effect on acute respiratory diseases, *Am. J. Hyg.*, 55: 203, 215, 1952.

Petri, R. J.: Eine neue Methode Bakterien und Pilzsporen in der Luft nachzuweisen und zu zählen, *Z. Hyg.*, 3: 1, 1888.

Phair, J. J., y E. B. Schoenbach: The transmission and control of meningococcal infections, *Am. J. Med. Sci.*, 209: 69, 1945.

Proctor, B. E.: The microbiology of the upper air. II. *J. Bact.*, 30: 363, 1935.

— y B. W. Parker, Microbiology of the upper air. III. An improved apparatus and technique for upper air investigations, *ibid.*, 36: 175, 1938.

Puck, T. T.: The mechanism of aerial disinfection by glycols and other chemical agents. I. Demonstration that the germicidal action occurs through the agency of the vapor phase. *J. Exp. Med.*, 85: 729, 1947*a*; II. An analysis of the factors governing the efficiency of chemical disinfection of the air, *ibid.*, 85: 729, 1947*b*.

Puck, T. T.: O. H. Robertson, y H. M. Lemon: The bactericidal action of propylene glycol vapor on microorganisms suspended in air. II. The influence of various factors on the activity of the vapor, *ibíd.*, **78**: 387, 1943.
Robertson, O. H.: The dispersal of respiratory pathogens in relation to the occurrence and control of air-borne infections, *Am. Rev. Tuberc.*, **55**: 109, 1947.
—, E. Bigg. T. T. Puck, y B. F. Miller: The bactericidal action of propylene glycol vapor on microorganisms suspended in ar. I. *J. J. Exp. Med.*, **75**: 593, 1942.
Rosebury, T.: «Experimental Air-borne Infection», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1947.
—, G. Meiklejohn, L. C. Kingsland, y M. H. Boldt; Disinfection of clouds of meningopneumonitis and psittacosis viruses with triethylene glycol vapor, *J. Exp. Med.*, **85**: 65, 1947.
Ruehle, G. L. A.: Recent methods of bacterial air analysis, *Am. J. Pub. Health*, **5**: 603, 1951*a*.
—: Methods of bacterial analysis of air, *J. Agr. Research*, **4**: 343, 1915*b*.
Schechmeister, I. L., y F. S. Greenspan: The relation of the oil treatment of floors and bedding to the control of respiratory diseases among naval personnel, *Am. J. Hyg.*, **46**: 376, 1947.
Walter, W. G., y G. J. Hucker: Pathogenic bacteria in public places, *Soap Sanit. Chemicals*, February, 1942.
Wells, W. F.: Apparatus for study of the bacterial behavior of air, *Am. J. Pub. Health*, **25**: 58, 1933.
—: Air-borne infection and sanitary air control, *J. Ind. Hyg.*, **17**: 253, 1935.
—: Air-borne infections, *Modern Hosp.*, **51**: 66, 1938.
—: Radiant disinfection of air, *Arch. Phys. Therapy*, **23**: 143, 1942.
—: Measurement of air-borne infection by the disinfection of air, *Am. J. Med. Sci.*, **209**: 177, 1945.
—, C. T. Butterfield, F. W. Gilcreas, E. C. Robertson, y C.-E. A. Winslow: Bacteriological procedures in sanitary air analysis, *Am. J. Pub. Health*, **37**: 1023, 1947.
—, H. L. Ratcliffe, y C. Crumb: On the mechanics of droplet nuclet infection II. Quantitative experimental air- borne tuberculosis in rabbits, *Am. J. Hyg.*, **47**: 1, 1948.
Wheeler, S. M., y T. D. Jones: Factors in the control of the spread of acute respiratory infections with reference to streptococcal illness and acute rheumatic fever, *Am. J. Med. Sci.*, **209**: 58, 1945.
Willmon, T. L., A. Hollaender, y A. D. Langmuir: Studies of the control of acute respiratory diseases among naval recruits. I. A review of a four-year experience with ultraviolet irradiation and dust suppressive measures, 1943 a 1947, *Am. J. Hyg.*, **48**: 227, 1948.
ZoBell, C. E.: Microorganisms in marine air, *Aerobiology, Am. Assoc. Advance. Sci., Symposium*, **17**: 55, 1942.

CAPÍTULO XX

BACTERIOLOGÍA DEL MAR[1]

El océano, que cubre casi tres cuartas partes de la superficie de la Tierra, alberga numerosas especies de bacterias y microorganismos afines. Se han encontrado bacterias vivas en agua de mar y en depósitos recogidos a profundidades máximas.

Se supone que las bacterias desempeñan un importante papel en la economía del mar, donde actúan como agentes bioquímicos, geológicos e hidrobiológicos. Aunque beneficiosas en su mayoría, algunas son patógenas para plantas y animales marinos, echan a perder pescado u otros productos alimenticios, o contribuyen a la corrosión de obras del hombre, y algunas especies son causa de la peligrosa corrupción del agua en zonas localizadas.

CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS MARINAS

Morfológicamente, las bacterias marinas se parecen a las encontradas en otros ambientes, aunque las estadísticas señalan que hay relativamente más bacilos y vibriones gramnegativos en el mar que en el suelo o en aguas dulces. Asimismo, es mayor la proporción de bacterias marinas móviles y pigmentadas. Cocos y actinomicetos abundan menos en el mar que en tierra.

Por término medio, las bacterias marinas son más pequeñas que las encontradas en la leche, el estiércol, aguas residuales, la tierra y aguas dulces. Entre las excepciones se cuentan representantes de *Rodobacterineas, Clamidobacteriales* y *Espiroquetales marinas,* muchas de las cuales son grandes.

En general, las bacterias marinas se desarrollan más despacio que la mayoría de las del suelo o las aguas sucias, y sus colonias son también más pequeñas. Como grupo, las bacterias marinas son fuertemente proteolíticas, y no con tanta frecuencia sacarolíticas como las del suelo o las aguas dulces. En el mar predominan los gérmenes aerobios facultativos, y son relativamente pocos los aerobios estrictos.

1. Este capítulo es obra del Dr. Claude E. ZoBell, de la Scripps Institution of Oceanography, Universidad de California, La Jolla, Calif., a quien estamos muy agradecidos por haberlo preparado amablemente para su publicación.

La mayoría de las bacterias que licuan el agar proceden de aguas marinas. Stanier (1941) y Humm (1946) han descrito un gran número de microbios marinos que digieren agar; este producto es una galactana que se encuentra en algas marinas, de las cuales las más importantes en el comercio son especies del género *Gelidium*.

La bioluminiscencia es también, sobre todo, una propiedad de microorganismos del mar (Harvey, 1940). ZoBell (1946 *a*), ha compilado una lista de 34 especies de bacterias fotógenas aisladas del mar por diversos investigadores.

Mencionan otras características singulares de las bacterias marinas ZoBell y Feltham (1934), y ZoBell y Upham (1944).

Requisitos de salinidad. De no estar diluída por lluvias torrenciales, hielo derretido o agua fluvial, el agua del mar contiene generalmente 3,3 a 3,6 % de substancias sólidas, en su mayor parte cloruro sódico, con cantidades menores de sulfato magnésico e indicios de casi todos los cationes y aniones conocidos (Sverdrup y otros, 1942). Así, no debe sorprender el hecho de que la mayoría de las bacterias marinas se desarrollen mejor en medios preparados con agua de mar o soluciones salinas similares.

Aun cuando a veces se califican de halófilas, las bacterias marinas no lo son tanto, ni mucho menos, como las encontradas en el Gran Lago Salado (ZoBell y otros, 1937), en el mar Muerto (Elazari-Volcani, 1940), aguas muy saladas (Hof, 1935) o en salinas, que pueden contener casi diez veces más sal que el agua de mar. La tabla 30 expone las cifras comparativas obtenidas preparando placas de muestras de diferentes procedencias en agar nutritivo con soluciones minerales compensadas de diferente salinidad.

TABLA 30. — INDICE MEDIO PROPORCIONAL DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS DE DISTINTOS ORÍGENES, EN PLACAS DE AGAR NUTRITIVO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SAL

Procedencia de las bacterias	Concentración de sal en agar nutritivo					
	0,5 %	2 %	3,5 %	7 %	15 %	30 %
Agua de mar . .	19,2	61,7	100,0	38,3	7,4	0,0
Fango marino . .	23,9	54,2	100,0	43,5	6,1	0,2
Salina	4,3	12,6	19,6	30,4	64,9	100,0
Gran Lago Salado.	1,7	8,0	14,1	26,3	72,2	100,0
Tierra de jardín .	100,0	56,1	25,2	9,8	4,6	0,4
Aguas residuales .	100,0	44,8	13,5	5,7	2,7	0,0
Agua de río . . .	100,0	47,3	22,8	6,2	1,9	0,0

El agua de mar artificial y las soluciones salinas isotónicas han resultado inferiores al agua de mar natural para el cultivo de microorganismos marinos. Korineck (1927) afirmaba que las bacterias del mar se podían distinguir de las de aguas dulces a base de sus necesidades específicas de salinidad.

Tolerancia a la temperatura. La mayoría de las bacterias marinas se desarrollan mejor a temperaturas entre 12° y 25° C; son muy pocas las que medran a 30° C, y, como han señalado Zo-Bell y Conn (1940), la de 37° C puede ser mortal. Hess (1934) observó que muchas especies son fisiológicamente activas entre —3 y 6,5° C. Casi todas las especies de bacterias marinas se reproducen lentamente entre 0 y 4° C, que es la escala de temperatura de un 80 % en volumen del océano.

Efecto de la presión hidrostática. Las actividades de las bacterias en el mar sufren la influencia de la presión hidrostática, que aumenta alrededor de 0,1 atm por metro de profundidad. Aproximadamente el 90 % de los mares da profundidades de 1000 a 10 000 metros, lo cual significa que la presión hidrostática oscila entre 100 y 1000 atm, poco más o menos. ZoBell y Johnson (1949) han comprobado que, a diferencia de las bacterias barófilas de los abismos marinos, pocas bacterias terrestres en la fase logarítmica de crecimiento toleran presiones superiores a 300 atmósferas. Las bacterias marinas de aguas poco profundas no toleran presiones hidrostáticas mayores que las barófobas (sensibles a la presión) encontradas en el suelo, aguas sucias u otros focos superficiales. En cambio, se han hallado en abundancia bacterias barófilas en varias simas oceánicas de 7.200 a 10.460 m de profundidad (ZoBell, 1952 *a*).

Según ZoBell y Oppenheimer (1950), las presiones hidrostáticas halladas en aguas profundas afectan a la morfología y también a la reproducción y el metabolismo de las bacterias marinas en medios nutritivos. Los efectos de la presión varían según la especie, la fase de crecimiento, la composición del medio, el tiempo de exposición y la temperatura.

Concentración de hidrogeniones necesaria. La mayoría de los microorganismos marinos prosperan mejor con pH de 7,2 a 7,6; esto es algo más alcalino que el agua de mar, cuyo pH oscila entre 7,5 y 8,5. Se han encontrado en sedimentos marinos bacterias vivas dentro de una escala de pH de 6,4 a 9,4.

INTERCAMBIO DE BACTERIAS ENTRE TIERRA Y MAR

Pocas bacterias terrestres de aguas dulces transportadas continuamente al mar por ríos, desagües de cloacas, vientos, aves marinas migratorias y otros agentes sobreviven largo tiempo en el mar, excepto en zonas muy viciadas o diluídas del litoral (Burke y Baird, 1931). Beard

y Meadowcroft (1935) observaron en el agua del mar una rápida disminución del número de *Salmonella thyposa* y de *Escherichia coli*.

El agua de mar natural, según Carpenter y otros (1938), mata un 80 % de las bacterias de aguas sucias en media hora. Los resultados de inspecciones sanitarias, resumidos por Knowlton (1929), muestran que el número de bacterias de esas aguas disminuye con la distancia desde los desagües mucho más a prisa de lo que cabe atribuirlo a la dilución. El agua del mar Negro, en opinión de Krassilnikov (1938), es germicida para bacterias terrestres, pero deja de serlo por ebullición.

Las bacterias tíficas y otras coliformes pueden sobrevivir en crustáceos marinos durante semanas, según Hunter y Harrison (1928).

ZoBell (1942 *a*) ha informado que el viento arrastra numerosas bacterias del mar a gran distancia tierra adentro, pero que estos microorganismos desaparecen pronto entre los terrestres, más abundantes. Salvo en peces marinos o en los medios del microbiólogo, las bacterias del mar no sobreviven lejos de sus orillas.

ABUNDANCIA DE BACTERIAS EN EL MAR

Revistas extensas compiladas por Benecke (1933) y ZoBell (1946 *a*) indican que las bacterias se hallan ampliamente distribuídas en el mar. Mediante preparaciones en placas, que descubren sólo una pequeña proporción de microorganismos viables, se aprecia la presencia de unas pocas células por mililitro hasta varios centenares de miles por mililitro de agua de mar. Las cifras más altas corresponden a aguas costeras ricas en substancias orgánicas, o contiguas a la interficie o zona de contacto entre agua y fango.

En el mar abierto, la abundancia de bacterias suele aumentar con la profundidad desde la superficie hasta 40 ó 50 metros más abajo, y luego disminuye en capas más profundas. La población bacteriana por debajo de la zona fotosintética, que corresponde a 10 hasta 50 metros de fondo, queda limitada principalmente, según ZoBell (1947*a*), por la escasa concentración de substancia orgánica.

El número de bacterias que contiene el mar parece estrechamente relacionado con la riqueza del fitoplancton, más que con cualquier otro factor ecológico. Entre la abundancia de bacterias y de plancton han encontrado cierto paralelismo Waksman y otros (1933) en el agua del mar, y Henrici (1938) en el lago Alexander.

El efecto benéfico del plancton proviene en parte de la substancia orgánica que proporciona a las bacterias, y en parte, de las superficies sólidas que ofrece. Es limitado el número de bacterias que flotan libremente en el agua; la mayoría se adhieren a sólidos en suspensión, tales como los cuerpos o restos de organismos del plancton. Como indica

ZoBell (1943), las superficies sólidas tienden a concentrar substancias nutritivas orgánicas, a retardar la difusión de enzimas bacterianas y a ofrecer un lugar de reposo a las formas sésiles.

El hábito sésil de las bacterias acuáticas es la base de la técnica del portaobjetos sumergido que emplearon Henrici (1933), Hotchkiss y Waksman (1936), ZoBell (1943) y otros para evaluar la abundancia de bacterias por el método microscópico directo. Waksman y Vartiovaara (1938) comprobaron que la mayoría de las bacterias de depósitos del fondo marino quedaban adsorbidas o adheridas a partículas del sedimento.

Bacterias en depósitos del fondo. Drew (1912) encontró un promedio de 160.000.000 bacterias por gramo de fango del fondo marino junto a la isla de Andros, en las Indias Occidentales. Lloyd (1931) contó 300.000 por gramo en fango del golfo de Clyde, en la costa occidental de Escocia. Bavendamm (1932) descubrió hasta 16.800.000 bacterias por gramo de fango calcáreo recogido en los alrededores del archipiélago de Bahama. Por recuentos en placa, Mare (1942) ha calculado que el fango recogido en el canal de la Mancha contenía 0,3 a 2 mg de bacterias vivas por gramo.

Lloyd (1931), Reuszer (1933) y otros han observado una disminución gradual del número de bacterias al profundizar en fango marino. Así se aprecia por los datos de la tabla 31, obtenidos por ZoBell (1942 b) a base de tres cargas cilíndricas extraídas por perforación del fondo del océano Pacífico, frente a la costa de California del Sur.

TABLA 31. — NÚMERO DE BACTERIAS POR GRAMO DE FANGO MARINO EXTRAÍDO POR PERFORACIÓN DE DISTINTAS PROFUNDIDADES

Profundidad de perforación (pulgadas)	Puesto número		
	14 : 37	14 : 45	14 : 53
0-1	38 000 000	7 500 000	840 000
1-2	940 000	250 000	102 000
4-5	88 000	160 000	63 000
9-10	36 000	23 000	19 000
14-15	2 400	8 700	1 500
19-20	400	2 100	2 200
39-40	330	200	190
79-80	130	100	140
99-100	290	150	140

Se han encontrado bacterias en el fondo de los cilindros más largos, algunos de más de 25 pies (unos 7 $^1/_2$ metros), constituidos por sedimentos de varios milenios. Testimonios de la presencia de bacterias en sedimentos marinos antiguos han sido resumidos por ZoBell y Rittenberg (1948).

La mayoría de las bacterias encontradas en depósitos del fondo del mar han resultado ser anaerobias facultativas o estrictas. Algunas de ellas oxidan hidrógeno molecular como fuente de energía (ZoBell, 1947 b).

$$4\,H_2 + CaSO_4 \rightarrow CaS + 4\,H_2O; \quad \Delta F_{298} = -56\,750 \text{ cal}$$
$$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\,H_2O; \quad \Delta F_{298} = -31\,030 \text{ cal.}$$

La energía derivada de tales reacciones puede servir para la síntesis de substancia celular bacteriana mediante reducción de dióxido de carbono:

$$2\,H_2 + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + H_2O; \quad \Delta F_{298} = +6\,740 \text{ cal.}$$

donde (CH_2O) representa el sillar primario de la síntesis de substancia orgánica.

LAS BACTERIAS COMO AGENTES GEOLÓGICOS

Las bacterias de los depósitos del fondo del mar promueven muchos procesos en los que intervienen compuestos orgánicos, componentes inorgánicos y factores fisicoquímicos. Uno de los procesos geoquímicos que estudiaron los microbiólogos fué la precipitación del carbonato cálcico, que Drew (1912) atribuyó a las actividades de bacterias nitrificantes en mares subtropicales. Las amplias observaciones de Bavendamm (1932) demostraron que la precipitación referida en esos mares forma parte de un proceso microbiológico.

La solubilidad y la precipitación del carbonato cálcico en el agua del mar son principalmente función del pH. La concentración de hidrogeniones en sedimentos marinos puede aumentarse por obra de microorganismos que formen amoníaco, reduzcan nitratos a nitritos, reduzcan sulfatos, destruyan o descarboxilen ácidos orgánicos o utilicen dióxido de carbono. En cambio, la producción de dióxido de carbono o ácidos orgánicos, la oxidación de sulfuro de hidrógeno o azufre, la formación de nitratos, la asimilación de amoníaco o la liberación de fosfatos de compuestos orgánicos, son procesos microbianos que tienden a reducir la concentración de hidrogeniones.

Sedimentación de hierro y manganeso. Harder (1919) y Cholodny (1926) han bosquejado varios modos de intervención de las bacterias en la acumulación y transformación del hierro sedimentado. Thiel (1925) ha estudiado la precipitación microbiana de manganeso en fangos marinos. A actividad bacteriana atribuye Butkevich (1928) las concreciones de hierro y manganeso en el mar Blanco; este autor encontró en abundancia especies de *Gallionella*.

La sedimentación marina de hierro o manganeso en estado reducido u oxidado depende del potencial de oxidación-reducción, o Eh. Las bacterias parecen ser los principales agentes dinámicos que modifican ese potencial en sedimentos marinos. En presencia de materia orgánica, las bacterias provocan condiciones reductoras consumiendo oxígeno y produciendo sulfuro de hidrógeno u otros agentes de reducción.

En opinión de ZoBell (1946 b), el potencial de oxidación-reducción influye bastante sobre la composición, la reactividad química, la diagénesis, el color, la población biológica y otras propiedades de sedimentos recientes. Las condiciones reductoras parecen conducir asimismo a la formación y conservación de hidrocarburos del petróleo.

Origen del petróleo. Generalmente, los geólogos convienen en que el petróleo se ha formado en sedimentos marinos por alteración de restos orgánicos de plantas y animales. Las bacterias pueden contribuir al proceso modificando las condiciones del sedimento (ZoBell, 1952 b).

En ambientes muy reductores, la modificación microbiana de substancias orgánicas es capaz de originar residuos relativamente más ricos en hidrógeno y más escasos en oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Esto se traduce en la acumulación de complejos orgánicos más semejantes al petróleo que sus predecesores, pues el petróleo se compone en gran parte de hidrocarburos gaseosos, líquidos y sólidos.

La producción microbiana de metano es una propiedad común de los sedimentos marinos, y hay pruebas de que las bacterias del mar forman hidrocarburos superiores. Aunque esto no quiere decir que produzcan petróleo, se admite generalmente que las bacterias contribuyen al proceso.

Las bacterias de los sedimentos marinos pueden modificar los hidrocarburos del petróleo. Virtualmente, todos los hidrocarburos están expuestos a la acción microbiana en condiciones propicias (ZoBell, 1946 c).

ACCIÓN DE LAS BACTERIAS MARINAS SOBRE SUBSTANCIAS ORGÁNICAS

La actividad más importante de las bacterias del mar es la mineralización o modificación de substancias orgánicas (Waksman, 1934). Aunque son arrastradas al mar grandes cantidades de estas substancias desde tierra, y las plantas fotosintéticas producen todavía más, el contenido orgánico del agua del mar no suele rebasar 5 mg por litro. La mayoría de los depósitos del fondo marino contienen menos del 5 % de substancias orgánicas. Atendiendo a la eficacia con que las bacterias descomponen este material, el mar se ha descrito como el depósito séptico mayor y más positivo del mundo.

La descomposición bacteriana de organismos muertos en el mar va acompañada de aprovechamiento de oxígeno, prducción de amoníaco, formación de dióxido de carbono y liberación de fosfatos. Waksman y Renn (1936) observaron que un 60 % de la materia orgánica atacada

se mineraliza, y el 40 % restante se convierte en substancia celular bacteriana.

Los carbohidratos y aminoácidos sencillos son rápidamente atacados por bacterias marinas; los polisacáridos complejos, lípidos y proteínas se degradan más lentamente. Varias especies de hongos marinos estudiadas por Barghoorn y Linder (1944) utilizan xilosa, galactosa, maltosa, almidón, celulosa o pectina.

Gérmenes que descomponen la celulosa. Waksman, Carey y Reuszer (1933) comprobaron que generalmente existen bacterias que descomponen la celulosa en el agua del mar, y sobre todo en depósitos del fondo y manchas de plancton. La mayoría de esas bacterias son aerobias, pero se encuentran algunas anaerobias; estos microorganismos consumen muy diversas clases de azúcar.

Bavendamm (1932) halló en todas las muestras de fango marino examinadas bacterias que digerían la celulosa. Stanier (1941) aisló de substancias marinas cuatro nuevas especies de bacterias capaces de digerir celulosa y también agar.

Digestión de agar. Humm (1946) ha descrito todos los gérmenes marinos que digieren agar, pertenecientes a diversas especies, entre ellas 17 nuevas. A lo largo de la costa de Carolina del Norte encontró 2 a 150 de ellas por mililitro de agua del mar, y 80 000 a 20 000 000 por gramo de fango. Todas consumían glucosa, fructosa, galactosa, manosa, celobiosa y maltosa; 90 % utilizaban xilosa y lactosa; 85 %, sacarosa y salicina, y 53 %, arabinosa, rafinosa y glicerina. Un 70 % de ellas atacaban el ácido algínico; 20 %, la celulosa, y 25 %, la quitina.

Descomposición de quitina Entre los productos resultantes de la descomposición de la quitina por bacterias del mar estudiadas por ZoBell y Rittenberg (1938) figuran dióxido de carbono, amoníaco, ácido acético y azúcares reductores. La quitina es una glucosamina compleja, con la fórmula empírica $C_{32}H_{54}O_{21}N_4$. Por ser el principal componente del exoesqueleto de los artrópodos y existir comúnmente en moluscos, celenterios, protozoos y hongos, en el océano se producen grandes cantidades de quitina. Los copépodos solos fabrican varias toneladas anuales de esta substancia.

Hock (1940) aisló bacterias quitinoclásticas de arenas marinas, fango, agua del mar, crustáceos en descomposición y contenido intestinal de varios animales marinos. Tales bacterias alojadas en el intestino de animales digieren probablemente para ellos la quitina ingerida. Hess (1937) halló numerosas bacterias quitinoclásticas en lesiones del caparazón enfermo de bogavantes o cabrajos y langostas. Del fango marino, Campbell y Williams (1951) aislaron 29 cepas de bacterias capaces de extraer de la quitina el carbono y el nitrógeno que necesitan.

Bacterias proteolíticas. La mayoría de las bacterias marinas son activamente proteolíticas, y atacan con rapidez compuestos nitrogenados,

poniendo en libertad amoníaco y dióxido de carbono. Los 60 cultivos puros de bacterias marinas estudiados por ZoBell y Upham (1944) liberaban amoníaco de peptona; 47 licuaban la gelatina, y 30 hidrolizaban la caseína.

La ictioproteína es muy susceptible de descomposición bacteriana, como lo demuestra la rápida producción de amoníaco, indol, trimetilamina, histamina, sulfuro de hidrógeno y otros productos de degradación de proteínas (Beatty y Gibbons, 1947). Waksman y otros (1938) advirtieron que microorganismos del plancton, especialmente zooplancton rico en material proteínico, experimentan en el agua del mar una descomposición rápida.

La mayoría de las bacterias marinas estudiadas por Ostroff y Henry (1939) asimilan asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, propionamida, acetamida, hipuratos, urea y creatinina. Waksman y Renn (1936) comprobaron que las bacterias descomponen en dos a cinco días, a 20° C, 2 a 4 mg de glicina, alanina, fenilalanina, ácido glutámico, tirosina y asparagina por litro de agua de mar, con desprendimiento de amoníaco.

Las bacterias marinas que liberan amoníaco de gelatina y urea son activas, según Rubentschik (1925), a temperaturas no mayores de —2,5° C

CICLO DEL NITRÓGENO EN EL MAR

Como en tierra, las bacterias parecen transformar nitrógeno y sus compuestos en el mar. Existe asimismo un ciclo de compuestos nitrogenados entre la tierra y el mar, por desagüe desde el suelo. Salvo la insignificante cantidad de compuestos nitrogenados que retiran el hombre (en forma de peces) y las aves pescadoras (depósitos de guano), el nitrógeno se difunde desde el mar sobre todo en estado gaseoso.

Nitrificación. Aunque los datos compilados por Rakestraw (1936) indican que seguramente las bacterias oxidan cantidades bastante grandes de amoníaco en el mar, los procedimientos convencionales de cultivo por concentración no suelen demostrar la presencia de bacterias nitrificantes en el mar, de no ser cerca de tierra. Carey (1938) dedujo que estas bacterias están confinadas sobre todo al agua de la zona fotosintética y a las porciones más superficiales de los depósitos marinos del fondo.

La mayoría de los intentos para demostrar que las bacterias oxidan de nitritos a nitratos han dado resultados negativos, aunque tales microorganismos no se encuentran en los depósitos del fondo del mar.

Reducción de nitratos. Numerosos investigadores han presentado muy diversas bacterias marinas que reducen los nitratos en medios nutritivos. Estudios resumidos por Bavendamm (1932) y Waksman,

Hotchkiss y Carey (1933) indican, sin embargo, que, excepto en ambientes localizados, no es adecuada la substancia orgánica del mar para producir energía con destino a la desnitrificación bacteriana.

Fijación de nitrógeno. Los testimonios de que en el mar existen especies fijadoras de nitrógeno, de los géneros *Azotobacter* y *Clostridium*, han sido revisados por Bavendamm (1932), Benecke (1933) y Waksman, Hotchkiss y Carey (1933); pero aún no se sabe hasta qué punto fijan el nitrógeno. En realidad, todo el problema del ciclo del nitrógeno en el mar sigue siendo muy confuso, aunque se cree que las bacterias desempeñan en el mismo un importante papel.

REGENERACIÓN DE FOSFATOS

La rápida liberación de fosfatos del plancton marino en descomposición ha sido observada por Seiwell y Seiwell (1938). Por su parte, Renn (1937) ha investigado la intervención de las bacterias en este proceso, que hace posible utilizar el fósforo como alimento de las plantas en el mar.

CICLO DEL AZUFRE EN EL MAR

La mayoría de las bacterias saprófitas del mar descomponen substancias albuminosas y ponen en libertad sulfuro de hidrógeno. En condiciones anaeróbicas, el azufre orgánico es convertido casi por entero en sulfuro de hidrógeno por compuestos orgánicos mixtos que contienen azufre, pero este elemento puede ser oxidado abiogénicamente a medida que se libera en agua del mar oxigenada.

En aguas estancadas, el sulfuro de hidrógeno se acumula a veces en concentraciones suficientes para causar la muerte a los animales marinos. En tales condiciones, puede producirse mucho sulfuro de hidrógeno por reducción de sulfatos.

Reducción de sulfatos. Como han expuesto ZoBell y Rittenberg (1938), abundan los reductores de sulfatos en depósitos marinos del fondo. Como son anaerobias, tales bacterias se encuentran muy pocas veces en el agua de mar. El *Desulfovibrio aestuarii* es el principal reductor marino de sulfatos, aunque puede haber otros géneros y especies dotados de tal propiedad.

Las bacterias reductoras de sulfatos consumen una gran variedad de compuestos orgánicos. Ciertos cultivos descritos por Sisler y ZoBell (1950) pueden utilizar hidrógeno molecular como fuente de energía. Su presencia corriente en salinas de pozos petrolíferos sugiere la posible asociación de reductores de sulfatos, conformación de petróleo.

Bacterias sulfurosas. Se han encontrado en el mar varios géneros de bacterias sulfurosas acrómicas, que oxidan sulfuros, azufre elemental, sulfitos, tiosulfatos u otros compuestos inorgánicos de azufre. Algunas parecen ser exclusivamente especies marinas, y otras viven tanto en el mar como fuera de él.

Baas-Becking (1925) y Bavendamm (1924) comprobaron que, en aguas someras, donde se forma sulfuro de hidrógeno, abundan las bacterias sulfurosas acrómicas, y también formas purpúreas. La oxidación del sulfuro de hidrógeno depende de las especies bacterianas, la tensión de oxígeno, la concentración de ácido sulfhídrico, la penetración de la luz y otros factores (Van Niel, 1936).

En regiones circunscritas investigadas por Gietzen (1931), las bacterias sulfurosas purpúreas abundan a veces lo suficiente para dar color al agua. Según Baas-Becking (1925), tales bacterias se encuentran en agua de 0,05 a 7,5 % de salinidad en cloruro sódico. Prefieren la luz solar difusa o atenuada, baja tensión de oxígeno, y la presencia de sulfuro de hidrógeno, comúnmente proporcionado por reductores de sulfatos.

Más información sobre la fisiología de este grupo de bacterias se encuentra en los tratados de Van Niel (1931, 1936), y Gietzen (1931).

BACTERIOLOGÍA DE LOS PECES MARINOS

La *Escherichia coli* y las bacterias coliformes afines no son residentes normales de los intestinos o vísceras de peces de mar. Cuando se encuentran en la carne de pescado indican que éste procede de aguas impuras, o que ha habido contaminación durante el transporte, la manipulación o la venta (Griffiths, 1937).

La flora bacteriana normal de los intestinos y vísceras depende ampliamente de las costumbres alimenticias del pez y del tipo de alimento ingerido. Con frecuencia, el conducto intestinal de los peces no comestibles no contiene bacterias.

Numerosas bacterias marinas se hallan asociadas a verdín superficial y agallas de peces. Es discutible que el tejido muscular de peces vivos o recién pescados esté siempre estéril, pero poco después de pescarlos se producen infecciones. Predominan especies de *Achromobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, Proteus, Bacillus, Serratia* y *Micrococcus*. La población bacteriana de peces muertos aumenta rápidamente, a un ritmo que depende sobre todo de la temperatura. Las bacterias que se desarrollan en peces ocasionan decoloración y otras alteraciones inconvenientes (Beatty y Gibbons, 1937).

Bacteriología de los moluscos. Aunque normalmente se hallan exentos de bacterias patógenas en aguas claras, las ostras, las almejas, los

mejillones y otros mariscos pueden contaminarse en aguas impuras o por manipulación impropia. Casi todas las epidemias de fiebre tifoidea o de cólera asiático atribuídas a los mariscos han tenido por causa el consumo de ostras «cebadas» en aguas saladas cerca de desembocaduras de alcantarillas o de ríos contaminados (Prescott y otros, 1946).

Como las ostras pueden albergar gérmenes patógenos durante semanas (Hunter y Harrison, 1928), los mariscos de origen dudoso deberán hervirse antes de comerlos.

A los moluscos se adhieren ordinariamente numerosas bacterias. Desde el punto de vista sanitario, carecen de importancia, si bien pueden favorecer las descomposición de los mariscos durante el almacenaje. Han resumido métodos de análisis bacteriológico de los moluscos Perry (1939) y Wilson y McCleskey (1951).

Las ostras y otros moluscos se hallan también expuestos a enfermedad. La muerte en masa de ostras en una epidemia tipo se ha achacado a infecciones microbianas. Un parásito protista, *Dermocystidium marinum*, ha sido señalado como infeccioso por Mackin (1951), y cierta enfermedad de las ostras es obra del flagelado *Hexamita*, con el concurso de bacterias e invasores secundarios (Mackin y otros, 1952). En la mayoría de las ostras del comercio ha encontrado Dimitroff (1926) espiroquetas, ostensibles parásitos del intestino.

EFECTOS DE LAS BACTERIAS EN ANIMALES MARINOS

Los animales marinos parecen ser susceptibles de infecciones microbianas, aunque se han hecho pocas observaciones, excepto en acuarios (ZoBell, 1946 *a*).

La inmensa mayoría de las bacterias del mar son beneficiosas para la población animal. Muchas especies que viven normalmente en el intestino de esos animales ayudan a digerir los alimentos. Enzimas bacterianas catalizan la hidrólisis de celulosa, quitina y otras substancias químicas complejas que sirven de pasto a los animales marinos.

Por ser muy nutritivas, y habitualmente fáciles de digerir, las bacterias constituyen una parte importante de la dieta de muchos animales del mar. MacKinitie (1935) y Mare (1942) han señalado la importancia de las bacterias como alimento de especies marinas abisales.

Las bacterias fotógenas o luminiscentes del integumento, o desarrolladas en los órganos luminosos de ciertos animales marinos, hacen que éstos brillen en la obscuridad (Harvey, 1940).

LAS BACTERIAS EN MARES INTERIORES

Aunque el mar Muerto, con una proporción aproximada de 30 % de sal, tiene fama de no albergar seres vivos, Elazari-Volcani (1940) ha encontrado bacterias en gran número en muestras de agua y fango retiradas del mismo. Los microorganismos medraban en medios nutritivos con 3 a 30 % de sal.

Una abundante flora bacteriana que comprendía varios géneros fué observada en portas de vidrio sumergidos por Smith y ZoBell (1937) en el Gran Lago Salado, mar interior casi tan salino como el mar Muerto. El desarrollo de microcolonias en los portaobjetos sumergidos demostró que las bacterias se multiplicaban en el agua salada y no eran simples habitantes pasivos.

Su gran contenido en sulfuros hace nueve décimas partes del mar Negro virtualmente inhabitable para cualquier forma viviente, excepto bacterias. Éstas predominan igualmente en el mar Caspio (Butkewich, 1938).

REFERENCIAS

Baas-Becking, L. G. M.: Studies on the sulfur bacteria, *Ann. Botany (London)*, 39: 613, 1925.

Barghoorn, E. S. y D. H. Linder: Marine fungi: their taxonomy and biology, *Farlowia*, 1: 395: 1944.

Bavendamm, W.: «Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Suss- und Salzwassers», G. Fischer, Jena, 1924.

—: Die mikrobiologische Kalkfällung in der tropischen See., *Arch. Mikrobiol.*, 3: 205, 1932.

Beard, P. J. y N. F. Meadowcroft: Survival and rate of death of intestinal bacteria in sea water, *Am. J. Pub. Health.*, 25: 1023, 1935.

Beatty, S. A. y N. E. Gibbons: The measurement of spoilage in fish, *J. Biol. Board Can.*, 3: 77, 1937.

Benecke, W.: Bakteriologie des Meeres, «Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden», Abt. 9, Tl. 5, 717, 1933.

Burke, V. y L. A. Baird: Fate of fresh water bacteria in the sea, *J. Bact.*, 21: 287, 1931.

Butkevich, V. S.: Die Bildung der Eisenmangan-Ablagerungen am Meeresboden und die daran beteiligten Mikroorganismen, *Ber. d. wiss. Meeresinst., Moscow*, 3 (3): 5, 1928.

—: On the bacterial population of the Caspian and Azov seas, *Mikrobiologiya*, 7: 1005, 1938.

Campbell, L. L. y O. B. Williams: A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin, *J. Gen. Microbiol.*, 5: 894, 1951.

Carey, C. L.: The occurrence and distribution of nitrifying bacteria in the sea, *J. Marine Research*, 1: 291, 1938.

Carpenter, L. V., L. R. Setter y M. Weinberg: Chloramine treatment of sea water, *Am. J. Pub. Health*, 28: 929, 1938.

Cholodny, N.: Die Eisenbakterien, G. Fischer, Jena, 1926.

Dimitroff, V. T.: Spirochaetes in Baltimore market oysters, *J. Bact.*, 12: 135, 1926.

Drew, G. H.: Report of investigations on marine bacteria carried on at Andros Island, Bahamas, British West Indies, in May, 1912, *Carnegie Inst. Wash. Yearbook*, núm. 11, pág. 136, 1912.

Elazari-Volcani, B.: Studies on the microflora of the Dead Sea, disertación, Hebrew University, Jerusalem, 1920.
—: Studies on the microflora of the Dead Sea, resume of thesis published by Daniel Sieff Research Institute, Rehovoth, Palestine, 1940.
Gietzen, J.: Untersuchungen über marine Thiorhodacean, *Centr. Bakt.*, II. Abt., **83**: 183, 1931.
Griffiths, F. P.: A review of the bacteriology of fresh marine-fishery products, *Food Research*, **2**: 121, 1937.
Harder, E. C.: Iron-depositing bacteria and their geologic relations, *U. S. Geol. Survey, Prof. Papers*, **113**: 1, 1919.
Harvey, E. N.: Living light, Princeton, Princeton University Press, 1940.
Henrici, A. T.: Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique, *J. Bact.*, **25**: 277, 1933; IV. Seasonal fluctuations of lake bacteria in relation to plankton production, *ibid.*, **35**: 129, 1938.
Hess, E.: Cultural characteristics of marine bacteria in relation to low temperatures and freezing, *Can. Biol. Fish Contr.*, N. S., **8**: 459, 1934.
—: A shell disease in lobsters *(Homarus americanus)* caused by chitinovorous bacteria, *J. Biol. Board Can.* **3**: 358, 1937.
Hock, C. W.: Decomposition of chitin by marine bacteria, *Biol. Bull.*, **79**: 199, 1940.
Hof, T.: Investigations concerning bacterial life in strong brines, *Rec. trav. botan. neerl.*, **32**: 92, 1935.
Hotchkiss, M. y S. A. Waksman: Correlative studies of microscopic and plate methods for evaluating the bacterial population of the sea, *J. Bact.*, **32**: 423, 1936.
Humm, H. J.: Marine agar-digesting bacteria of the South Atlantic coast, *Duke Univ. Marinæ Sta., Bull.* 3, p. 45, 1946.
Hunter, A. C. y C. W. Harrison: Bacteriology and chemistry of oysters, with special reference to regulatory control of production, handling, and shipment, *U. S. Dept. Agr., Tech. Bull.* 64, p. 1, 1928.
Knowlton, W. T.: *B. coli* surveys, Los Angeles ocean outfall, *Calif. Sewage Works J.*, **2**: 150, 1929.
Korinek, J.: Ein Beitrag zur Mikrobiologie des Meeres, *Centr. Bakt.*, II. Abt., **71**: 73, 1927.
Krassilnikov, N. A.: The bactericidal action of sea water, *Mikrobiologya*, **7**: 329, 1938.
Lloyd, Blodwen: Muds of the Clyde Sea Area. II. Bacterial content, *J. Biol. Assoc.*, **17**: 751, 1931.
MacGinitie, G. E.: Ecological aspects of a California marine estuary, *Am. Midland Naturalist*, **16**: 629, 1935.
Mackin, J. G.: Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum*, *Bull. Marine Sci.*, **1**: 72, 1951.
—, P. Korringa y S. H. Hopkins: Hexamitiasis of *Ostrea edulis* and *Crassostrea virginica*, *ibid.*, **1**: 266, 1952.
Mare, Molly: A study of a marine benthic community with special reference to the microorganisms, *J. Marine Biol. Assoc., United Kingdom*, **25**: 517, 1942.
Ostroff, Rose y B. S. Henry: The utilization of various nitrogen compounds by marine bacteria, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **13**: 353, 1939.
Perry, C. A.: A summary of studies on pollution in shellfish, *Food Research*, **4**: 381, 1939.
Prescott, S. C., C.-E. A. Winslow y M. H. McCrady: «Water Bacteriology: with Special Reference to Sanitary Water Analysis», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 6.ª ed., 1946.
Rakestraw, N. W.: The occurrence and significance of nitrate in the sea, *Biol. Bull.*, **71**: 133, 1936.
Renn, C. E.: Bacteria and the phosphorus cycle in the sea, *Biol. Bull.*, **72**: 190, 1937.
Reuszer, H. W.: Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. III. The distribution of bacteria in the ocean waters and muds about Cape Cod, *Biol. Bull.*, **65**: 480, 1933.

Rubentschik, L.: Über die Lebenstätigkeit der Urobakterien bei einer Temperatur unter 0° C, *Centr. Bakt., II Abt.*, **64**: 166, 1925.
Seiwell, H. R. y Gladys Seiwell: The sinking of decomposing plankton in sea water and its relationship to oxygen consumption and phosphorus liberation, *Proc. Am. Phil. Soc.*, **78**: 465, 1938.
Sisler, F. D. y C. E. ZoBell: Hydrogen utilizing sulfate reducing bacteria in marine sediments, *J. Bact.*, **60**: 747, 1950.
Smith, W. W. y C. E. ZoBell: Direct microscopic evidence of an autochthonous bacterial flora in Great Salt Lake, *Ecology*, **18**: 453, 1937
Stanier, R. Y.: Studies on marine agar-digesting bacteria, *J. Bact.*, **42**: 527, 1941.
Sverdrup, H. U., M. W. Johnson y R. H. Fleming: «The Oceans», Nueva York, Prentice-Hall, Inc., 1942.
Thiel, G. A.: Manganese precipitated by microorganisms, *Econ. Geol.*, **20**: 301, 1925.
Van Niel, C. B.: On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria, *Arch. Mikrobiol.*, **3**: 1, 1931.
—: On the metabolism of the *Thiorhodaceae*, *ibid.*, **7**: 323, 1936.
Waksman, S. A.: The role of bacteria in the cycle of life in the sea, *Sci. Monthly*, **38**: 35, 1934.
—, Cornelia Carey y H. W. Reuszer: Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. I. Decomposition of marine plant and animal residues by bacteria, *Biol. Bull.*, **65**: 57, 1933*a*.
—, Margaret Hotchkiss y Cornelia Carey: Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. II. Bacteria concerned in the cycle of nitrogen in the sea, *ibid.*, **65**: 137, 1933*b*.
—, —, — e Yvette Hardman: Decomposition of nitrogenous substances in sea water by bacteria, *J. Bact.*, **35**: 477, 1938.
— y C. E. Renn: Decomposition of organic matter in sea water by bacteria. III. Factors influencing the rate of decomposition., *Biol. Bull.*, **70**: 472, 1936.
—, H. W. Reuszer, Cornelia Carey, Margaret Hotchkiss y C. E. Renn: Studies on the biology and chemistry of the Gulf of Maine. III. Bacteriological investigations of the sea water and marine bottoms, *ibid.*, **64**: 183, 1933.
— y Unto Vartiovaara: The adsorption of bacteria by marine bottom, *ibid.*, **74**: 56, 1938.
Wilson, T. E. y C. S. McCleskey: Indices of pollution in oysters, *Food Research*, **16**: 313, 1951; ver también **16**: 377.
ZoBell, C. E.: Microorganisms in marine air, *Aerobiology, Am. Assoc. Advance. Sci.*, Publ. 17, p. 55, 1942*a*.
—: Changes produced by microorganisms in sediments after deposition, *J. Sediment. Petrol.*, **12**: 127, 1942*b*.
—: The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *J. Bact.*, **46**: 39, 1943.
—: «Marine Microbiology», Waltham, Mass., The Chronica Botanica Co. 1946*a*.
—: Studies on redox potential of marine sediments, *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol.*, **30**: 477, 1946*b*.
—: Action of microorganisms on hydrocarbons, *Bact. Rev.*, **10**: 1, 1946*c*.
—: Marine bacteriology, *Ann. Rev. Biochem.*, **16**: 565, 1947*a*.
—: Microbial transformation of molecular hydrogen in marine sediments, with particular reference to petroleum, *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol.*, **31**: 1709, 1947*b*.
—: Bacterial life at the bottom of the Philippine Trench, *Science*, **115**: 507, 1952*a*.
—: Part played by bacteria in petroleum formation, *J. Sediment. Petrol.*, **22**: 42, 1952*b*.
—, D. Q. Anderson y W. W. Smith: The bacteriostatic and bactericidal action of Great Salt Lake water, *J. Bact.*, **33**: 253, 1937.
— y Jean E. Conn: Studies on the thermal sensitivity of marine bacteria, *ibid.*, **40**: 223, 1940.
— y Catharine B. Feltham: Preliminary studies on the distribution and characteristics of marine bacteria, *Bull. Scripps Inst. Oceanogr., Univ. Calif., Tech. Ser.*, **3**: 279, 1934.

ZoBell, C. E., y F. H. Johnson: The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria, *J. Bact.*, **57**: 179, 1949.
— y C. H. Oppenheimer: Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria, *ibid.*, **60**: 771, 1950.
— y S. C. Rittenberg: The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea, *ibid.*, **35**: 275, 1938.
— y —: Sulfate reducing bacteria in marine sediments, *J. Marine Research*, **7**: 602, 1948.
— y H. C. Upham: A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species, *Bull. Scripps Inst. Oceanogr., Univ. Calif.*, **5**: 239, 1944.

CAPÍTULO XXI

BACTERIOLOGÍA DEL AGUA

El agua recibe su flora bacteriana del aire, del suelo, de las aguas sucias, de residuos orgánicos, de plantas y animales muertos, etc., lo que significa que en el agua se pueden encontrar microbios de casi todas clases. La mayoría de las bacterias encuentran condiciones desfavorables y mueren pronto; pero las especies que se encuentran en el agua constantemente constituyen su flora natural.

La inmensa mayoría de las bacterias naturales se desarrollan sobre materia viva o muerta; son saprófitas y pertenecen al llamado grupo metatrófico de microorganismos. Los saprófitos abundan sobre manera en el humus, substancia parda o negra que cubre la superficie del suelo y procede de la descomposición incompleta de materia vegetal o animal.

Las aguas naturales se suelen agrupar en cuatro clases bien caracterizadas: meteóricas, superficiales, embalsadas y subterráneas.

Aguas meteóricas. Se incluyen entre éstas las de lluvia y nieve, que a veces contienen gran número de bacterias, sobre todo por la gran proporción de polvo en el aire. Después de una fuerte nevada o de un aguacero, la atmósfera queda limpia casi totalmente de microorganismos, de modo que muchas placas inoculadas con 1 mm de agua resultan estériles.

Aguas superficiales. Tan pronto como las gotas de lluvia o los copos de nieve caen al suelo quedan contaminados por los gérmenes terrestres, y constituyen entonces las aguas superficiales. En ellas la intensidad de la contaminación depende del número de microbios, así como de las clases y cantidades de substancias nutritivas que el agua disuelva en su arrastre. Los recuentos bacterianos de aguas superficiales ofrecen grandes variaciones, como se observa sobre todo en otoño y primavera, estaciones de lluvias intensas o de fusión de nieves. El lavado del suelo puede alterar el equilibrio que existe en el agua superficial, y producir así una gran variación en la flora y el contenido bacterianos.

El efecto primero de un chaparrón es aumentar considerablemente la contaminación bacteriana de una masa de agua. Una lluvia prolongada produce el efecto contrario, pues, una vez arrastradas las principales impurezas de las capas superficiales del suelo, el agua que sigue cayendo actúa como simple diluente del agua acumulada. Los ríos suelen dar las cifras más altas de bacterias durante la época de lluvias.

Aguas embalsadas. Los embalses sirven en gran parte para disminuir notablemente el número de microorganismos en el agua, pues en estas condiciones entran en juego las fuerzas que tienden a autodepurar este líquido:

sedimentación, actividad de otros organismos, luz ultravioleta, temperatura, aportación de alimentos y acaso efectos osmóticos.

El peso específico de las bacterias es algo mayor que el del agua destilada, y por eso se depositan lentamente en una masa de agua en reposo. Sin embargo, el principal factor causal de la sedimentación de las bacterias es su adherencia a partículas suspendidas; éstas, al precipitar, eliminan mecánicamente los microbios de las capas superiores de agua.

Los protozoos voraces que existen en el agua intervienen ampliamente en la disminución del número de bacterias; se alimentan de bacterias vivas y muertas, que consumen en gran cantidad, siempre que el agua contenga suficiente oxígeno disuelto. Cuando faltan bacterias, o el agua no está bien aireada, los protozoos desaparecen gradualmente.

La luz solar directa es tóxica para las células vegetativas de bacterias, e incluso para las esporas, si se prolonga mucho su acción. La luz difusa es menos activa como agente de esterilización. En una instalación de abastecimiento de aguas, la toxicidad de los rayos ultravioleta es inversamente proporcional a la turbiedad del líquido; esto quiere decir que los rayos luminosos carecen prácticamente de efecto sobre el agua turbia, mientras que los rayos ultraviolados son eficaces hasta 1 a 3 metros de profundidad en el agua clara.

Los aumentos de temperatura son perniciosos para la vitalidad de algunos microorganismos del agua, especialmente para los patógenos. En cambio, pueden multiplicarse ciertas formas terrestres e intestinales cuando se eleva la temperatura del agua. Rector y Daube (1917), Savage y Wood (1917), Winslow y Cohen (1918) y Winslow y Falk (1923) comunicaron ligeros aumentos numéricos de *Escherichia coli* en distintas clases de aguas embalsadas. En fecha más reciente, Bigger (1937) señaló que la *E. coli* es capaz de reproducirse en agua de varias procedencias esterilizada en autoclave antes de inocularla e incubada después a 37° C. En algunos casos, el número de microorganismos hallados era 10 000 veces mayor que el primitivo. Los cultivos en agua esterilizada y mantenida a 22° C daban cifras mayores y resiembras positivas durante mucho más tiempo que los mantenidos a 37° C. El agua no esterilizada, conservada a 22° y 37° C, mostraba igualmente un aumento del número de bacterias, pero no tan grande como el agua tratada en autoclave.

El aumento de la provisión de substancias nutritivas suele elevar el número de bacterias. Por el contrario, ciertas substancias tóxicas, como ácidos y bases, producen señaladas reducciones del número de microorganismos viables, y también es tóxico el efecto de diversos gases disueltos, como dióxido de carbono e hidrógeno. Los factores de ambiente suelen producir grandes fluctuaciones en los recuentos de bacterias, aunque esto no parece depender de un solo factor, sino de un grupo de factores que actúan conjuntamente.

Es indudable que todos los factores que disminuyen el número de bacterias en el agua son más eficaces al persistir su acción; esto puede representarse matemáticamente así:

$$\log \frac{N_1}{N_2} = kt$$

donde N_1 designa el número de microorganismos al principio; N_2, el número de ellos al final; t. el tiempo, y k, una constante que varía con la temperatura y otros factores de ambiente.

Aguas subterráneas. Estas aguas suelen estar relativamente exentas de bacterias, en virtud de la acción filtrante de la tierra que atraviesan.

Esta filtración, no sólo elimina la mayoría de las bacterias, sino también las partículas orgánicas nutritivas en suspensión. El agua de pozos profundos contiene de ordinario menos microorganismos que la de los someros, por ser mayor el espesor de las capas de material filtrante. La distancia que las bacterias recorren a través del suelo depende de diversos factores, entre ellos la permeabilidad de éste, el gradiente hidráulico del agua subterránea, y las condiciones climáticas.

La mayoría de las bacterias encontradas en el suelo pertenecen a los siguientes grupos: 1.°, bacterias fluorescentes; 2.°, formas bacilares cromógenas; 3.°, bacterias coliformes; 4.°, microorganismos del género *Proteus*; 5.°, microbios esporíparos del tipo del *Bacillus subtilis*, y 6.°, micrococos cromógenos y no cromógenos.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO CUANTITATIVO DEL AGUA

La muestra del agua que se ha de analizar se recoge en un frasco de 100 ml, limpio y esterilizado, con tapón de vidrio o cápsula de rosca. El cuello y la embocadura del frasco se cubren con papel pergamino, y éste se ata con un trozo de bramante. Luego se esteriliza el frasco en una estufa de aire caliente, a 170° C, durante una hora, por lo menos. La cubierta de papel pergamino sirve para proteger el contenido del frasco contra cualquier contaminación.

Al tomar una muestra de una fuente o un grifo, debe dejarse correr el agua durante unos cinco minutos, lo menos, para que arrastre cualquier germen presente alrededor de la salida; además, en tuberías pequeñas pueden producirse cambios en el número de bacterias, pues unas especies tienden a morir y otras a multiplicarse. Se coge la botella con la mano derecha, y con la izquierda se quita el tapón, sujetándolo por el papel que lo cubre. Recogida la muestra, se vuelve a colocar el tapón con el papel, cuidando de evitar cualquier contaminación, y se ata el papel con bramante. Los dedos no han de tomar la embocadura ni el tapón, pues así podría infectarse el contenido, y el examen daría un resultado erróneo.

Cuando se toma una muestra de agua tranquila, se quita primero el tapón con la mano izquierda, se sumerge la botella boca abajo unos 30 cm, se invierte, y, una vez llena, se saca del agua y se tapa. Si hay alguna corriente, la boca de la botella debe dirigirse hacia ella, para evitar que se introduzcan bacterias procedentes de los dedos.

Recogida y conservada la muestra, se produce un rápido cambio en su contenido bacteriano. Generalmente, el número de microorganismos muestra un notable aumento, gradual unas veces y apresurado otras; esto obedece a la multiplicación de los bacilos típicamente acuáticos, pues los patógenos, y otros gérmenes que suelen albergarse en el intestino del hombre y de los animales, tienden a morir muy pronto.

Una subida de temperatura acelera mucho el aumento del número

de bacterias. Como en el agua embotellada, aunque se guarde a temperaturas no mayores de 10° C, pueden producirse rápidos cambios bacterianos, deben examinarse todas las muestras lo antes posible. Los métodos para el análisis de aguas (Standard Methods for the Examination of Water and Sewage, 1946), publicados por la American Public Health Association, recomiendan que el lapso para almacenar o transportar muestras de agua y comenzar el análisis no debe exceder de seis horas para aguas impuras, ni de doce horas para las relativamente puras. Durante su conservación, las aguas deben mantenerse a una temperatura de 6.° a 10° C.

Método. El método de recuento macroscópico bacteriano consiste en poner una cantidad medida de la muestra de agua en un platillo de Petri y mezclarla con agar fundido esterilizado. Cuando se ha solidificado el agar, la placa se incuba a 37° C durante 24 horas, se cuentan las colonias y se anota el número de las desarrolladas por mililitro de agua.

El número de bacterias contenido en una muestra no debe exceder de 300 por mililitro. Si hay más, deben prepararse diluciones, pues entonces no se desarrollan muchas de ellas, por el efecto inhibitorio de los detritos que segregan los microorganismos que se desarrollan primero.

Entre los diversos factores que influyen en el número de colonias desarrolladas en placas de agar se comprenden la composición y reacción del medio, la temperatura y el período de incubación y la presencia de abundante oxígeno y humedad. De no regularse estos factores, los recuentos obtenidos serán variables.

El método reseñado y sus muchas modificaciones proporcionan sólo una fracción del número total de gérmenes. Las bacterias nitrificantes y otras autotróficas se cultivan en medios sintéticos compuestos de sales inorgánicas, pues no pueden medrar en los medios corrientes no sintéticos. Las bacterias anaerobias estrictas no se desarrollan a falta de suculentos líquidos animales; las reductoras de sulfatos necesitan de estos cuerpos para desarrollarse, y las que disuelven celulosa no prosperan apenas sin esta substancia en el medio nutritivo. El resultado es que la mayoría de las bacterias del agua pasan inadvertidas. El método directo o microscópico ha permitido contar veinte a setenta veces más gérmenes que el corriente de la placa de agar.

No es error grave el resultante de no poder contar todas las bacterias del agua. Al bacteriólogo sanitario no le interesan microorganismos tales como los anaerobios esporíparos, las formas nitrificantes y los gérmenes patógenos, salvo los de un grupo de rápido desarrollo, muy codiciosos de alimentos ricos en substancia. La mayoría de ellos pertenecen a los géneros *Escherichia* y *Aerobacter*, o a los grupos intermedios del grupo cólico.

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR EL AGUA

La disentería, el cólera y la fiebre tifoidea son las enfermedades bacterianas más importantes que se transmiten por el agua, y entre nosotros predomina la fiebre tifoidea o tifus abdominal. Como se trata de afecciones del intestino, sus agentes causales se encuentran en el contenido intestinal; por tanto, la presencia de detritos en un suministro de aguas significa que éstas pueden contener uno o varios de estos gérmenes patógenos y ser en potencia peligrosas para el consumo humano.

Teóricamente, lo mejor sería examinar las aguas en busca de gérmenes patógenos, a fin de determinar su potabilidad desde el aspecto bacteriológico. Sin embargo, esto tropieza con varias dificultades, principalmente el tiempo que permanecen viables los microorganismos patógenos y el número de ellos encontrado en el agua examinada.

Los gérmenes patógenos mueren muy pronto en el agua. Es dudoso que los gérmenes productores de las enfermedades citadas puedan sobrevivir más de una o dos semanas; la mayoría de ellos sucumben probablemente a los pocos días, o algo más tarde si el agua contiene abundante materia orgánica, o si está fría. Las infecciones motivadas por la presencia de gérmenes patógenos intestinales en el agua aparecen generalmente con pocos días de intervalo, lo cual demuestra que las bacterias se han ingerido casi al mismo tiempo.

El número de microbios patógenos que suelen encontrarse en abastecimientos de aguas es sumamente pequeño. Si en una comunidad está atacada de fiebre tifoidea una sola persona, y sus excreciones se mezclan con las de todas, la dilución será tan grande que resultará prácticamente imposible aislar los gérmenes patógenos de una muestra apropiada de agua: pero si son varias las personas afectadas del mal, la concentración de bacilos en las aguas residuales puede ser bastante para aislar el microbio con relativa facilidad, si bien hay que emplear con este fin medios especiales de cultivo. Por ello no suele intentarse aislar directamente del agua canalizada los microorganismos patógenos.

Relación entre gérmenes tíficos y coliformes. Kehr y Butterfield (1943) han deducido de los descubrimientos de otros autores que no es probable la ingestión de más de un bacilo tífico, o de muy pocos, a lo sumo, por un solo individuo, y sostienen que un solo germen del tifus abdominal únicamente infecta a una pequeña proporción del vecindario. Suponen que un agua potable presenta una relación entre *Salmonella typhosa* y bacterias coliformes de 10 por millón, lo cual corresponde aproximadamente a la del Támesis y el alcantarillado de Londres. Si el agua potable contuviera 500 bacterias coliformes en 100 ml, la probabilidad de que un individuo ingiriese un bacilo tífico en una ración

diaria de 1 litro de agua sería de 1:20; sólo una persona de cada 400 ingeriría probablemente dos gérmenes de *S. typhosa*, y tres, únicamente una de cada 8.000, conforme a las leyes de probabilidad, y admitiendo una distribución uniforme de las bacterias. La presencia de 500 microorganismos coliformes por 100 ml de agua potable, no conociendo la concentración de *S. typhosa*, daría probablemente origen a epidemias de gastroenteritis, seguidas de algunos casos de fiebre tifoidea la mayoría de las veces.



Fig. 182. — *Escherichia coli*, teñida con violeta cristal al 1:1000.

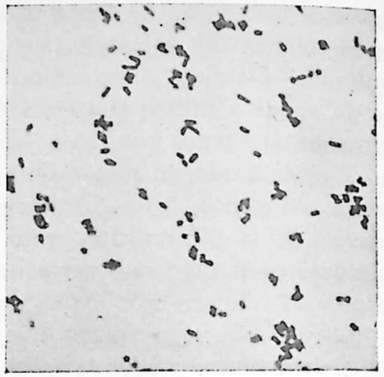


Fig. 183. — *Aerobacter aerogenes*, teñido con violeta cristal al 1:1000.

Estos estudios de Kehr y Butterfield, a base de los datos publicados, realzan el valor fundamental de la investigación de bacilos coliformes como indicadores de la posible presencia de gérmenes patógenos, e indican que existe en ocasiones un auténtico peligro cuando se encuentran bacterias coliformes en el agua, incluso a concentraciones moderadas.

La Escherichia coli en aguas residuales. La E. coli fué aislada primero por Escherich (1885) de las heces de un niño de poca edad. Más tarde se vió que reside normalmente en el conducto intestinal del hombre y de los animales. Como se encuentra en las evacuaciones de todos los individuos, con raras excepciones (Parr, 1938), las pruebas de potabilidad de un abastecimiento de aguas se basan generalmente en la presencia o ausencia de este germen. Encontrarlo en el agua no significa forzosamente que ésta contenga microorganismos patógenos, sino que puede haberlos; dicho de otro modo, todas las aguas contaminadas por las de cloaca son potencialmente peligrosas.

Los procedimientos empleados para el examen bacteriológico del agua no dan siempre resultado positivo respecto a la *E. coli* sola, sino que a veces permiten descubrir otros microorganismos afines, de escasa o nula importancia sanitaria, que suelen incluirse con la *E. coli* en el «grupo intestinal o cólico». Los dos miembros más importantes son la *E. coli* y el *Aerobacter aerogenes* (figs. 182 y 183), y los otros son bacilos cortos aerobios o anaerobios facultativos, gramnegativos, no esporíparos, que producen ácido y gases de lactosa y otros carbohidratos. De la división de este grupo en varios subgrupos se tratará en la página 576.

ENSAYO PRELIMINAR

La primera fase de los análisis de aguas es la prueba preliminar o de tanteo, que consiste en poner cantidades medidas de agua en una serie de tubos de fermentación de lactosa, con dos veces más medio nutritivo que agua, por lo menos. Es corriente emplear cinco tubos de fermentación, cada uno con 10 ml de agua, otro con 1 ml y otro con 0,1 ml de agua; los tubos se incuban 48 horas a 37° C.

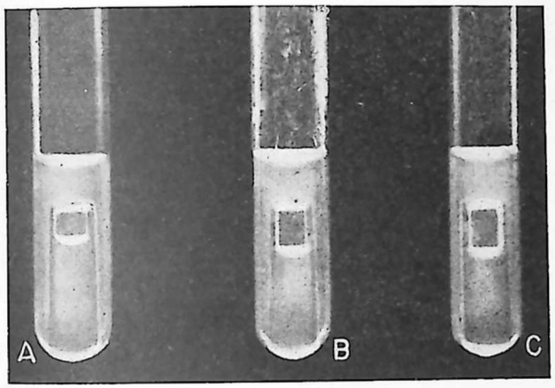


Fig. 184. — Tubos de fermentación con caldo lactosado. *A*, muestra de 1 ml de agua; *B*, muestra de 0,5 ml de agua; *C*, muestra de 0,1 ml de agua. Todos los tubos muestran fermentación de la lactosa, con producción de ácido y gases.

La formación de gases en la ampolleta invertida dentro del tubo de fermentación, al cabo de 24 horas a 37° C, constituye una prueba preliminar positiva (fig. 184), pues señala como posible la presencia de gérmenes coliformes.

Si no se desprenden gases en 24 horas, los tubos se incuban durante 48 horas. La formación de gases en la ampolleta invertida al final de las segundas 24 horas de incubación, y no de las primeras, constituye una prueba preliminar dudosa, y ha de confirmarse en cuanto a gérmenes del grupo coliforme. Cuando no se forman gases después de 48 horas de incubación, la prueba se considera negativa, y no hay que efectuar más ensayos; el agua se puede calificar de satisfactoria en el aspecto bacteriológico.

Condiciones necesarias para la producción de gases. Chambers (1950) ha señalado que se necesitan 40 a 390 millones de bacterias

coliformes por mililitro para producir gases visibles en el caldo lactosado. El promedio de todas las determinaciones es de 170 millones por mililitro. Diferentes cultivos de gérmenes coliformes dan distintas densidades productoras de gases; en la mayoría de los casos hacen falta 75 millones de estos microorganismos por mililitro para originar los primeros gases visibles. El número de bacterias coliformes inoculadas al principio en caldo de lactosa no influye mucho relativamente sobre la densidad necesaria de las mismas para producir gases, pero sí alteran notablemente el tiempo que esto requiere. Los resultados obtenidos con los cultivos en estudio indican que cuando es alta la relación entre microbios no coliformes y coliformes, no pueden producirse gases en absoluto, aunque hubiera numerosos coliformes en la muestra primitiva. Esto explica probablemente por qué se aíslan a veces estos últimos de tubos con caldo lactosado que muestran vegetación, pero no producción de gases.

Pruebas preliminares falsamente positivas. Un ensayo preliminar positivo no significa necesariamente que haya bacterias del grupo coliforme; ocurre así en la mayoría de los casos, pero no en todos. Estos errores provienen de la presencia de otros microorganismos capaces de fermentar lactosa y producir ácido y gases, o bien de una asociación o sinergia bacteriana.

Se han encontrado en el agua otros diversos gérmenes que fermentan lactosa y producen ácido y gases: *Clostridium perfringens, Bacillus aerosporus,* algunas especies de *Klebsiella,* el bacilo del cuero de Houston y varias especies de *Erwinia* y de *Serratia.*

El resultado positivo de ensayos preliminares previene con frecuencia de un tipo de asociación bacteriana conocido por sinergia, y que consiste en la acción conjunta de dos microorganismos sobre un carbohidrato, con producción de gases que no son capaces de formar ninguno de ellos por separado. De esto se trata más extensamente en la pág. 506.

Eliminación de pruebas preliminares falsas. Probablemente, el mejor medio empleado para eliminar estos errores es la adición de una cantidad muy pequeña de un colorante adecuado de trifenilmetano al caldo lactosado. En la mayoría de los casos, la sinergia es efecto del desarrollo conjunto de un germen grampositivo y otro gramnegativo; una concentración de colorante que basta para impedir la vegetación de microorganismos grampositivos, no influye a veces en la de bacterias gramnegativas, con lo que se elimina la reacción sinérgica. Los ensayos preliminares positivos falsos derivados de la presencia de gérmenes aerobios y anaerobios grampositivos y productores de gases se descartan asimismo por este procedimiento.

Véase más información en Folpmers (1948) y Wattie (1948).

ENSAYO DE CONFIRMACIÓN

Es costumbre utilizar en este ensayo todos los tubos de fermentación de caldo lactosado que presenten gases a las 24 horas, y los que no los presenten hasta las 48 horas de incubación a 37° C.

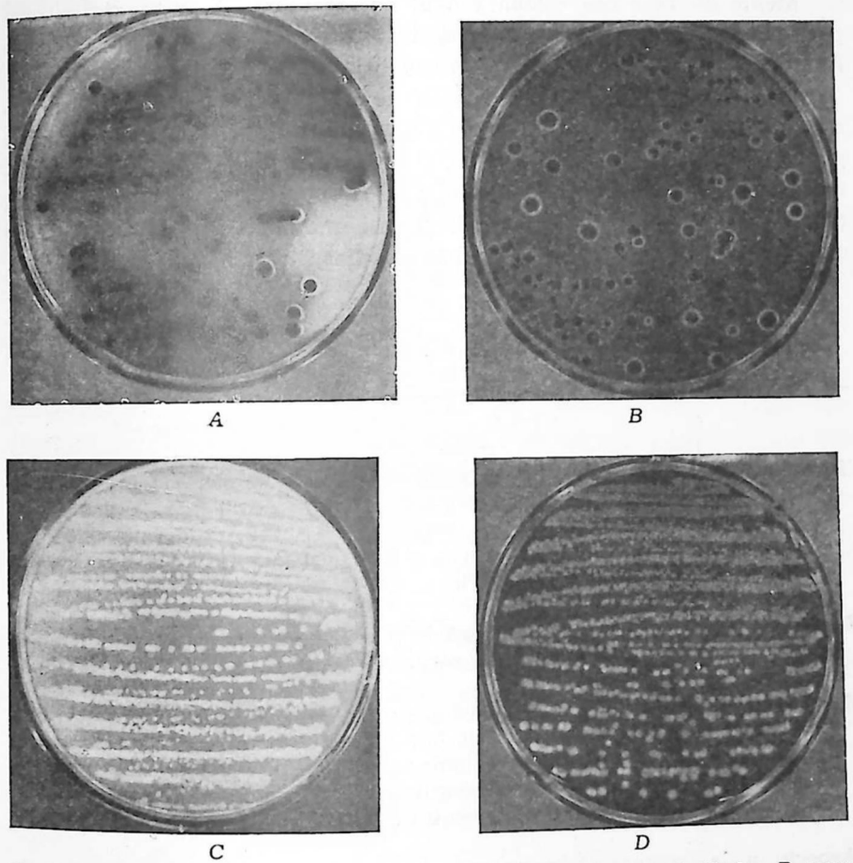


Fig. 185. — *Escherichia coli* sembrada en estrías sobre *A*, agar de Endo; *B*, agar con eosina y azul de metileno. Las colonias tienen oscuro el centro y brillo metálico. *Aerobacter aerogenes*, sembrado con estrías sobre C, agar de Endo; *D*, agar con eosina y azul de metileno. Las colonias no tienen centro oscuro ni brillo metálico.

En una placa de agar de Endo, o de agar con eosina y azul de metileno, se trazan estrías empleando una asa del cultivo de cada uno de los tubos. La placa se incuba luego a 37° C y se examina al cabo de veinticuatro horas.

Si entonces aparecen colonias típicas de *Escherichia coli,* la prueba de confirmación se puede considerar positiva (fig. 185). Cuando en la

placa aparecen sólo colonias atípicas, el ensayo no puede considerarse todavía negativo, pues algunos gérmenes coliformes no producen colonias típicas en placas de Endo o de agar teñidas de eosina y azul de metileno, o bien se desarrollan estas colonias despacio. Sean típicas o no las que aparezcan, hay que continuar la prueba como se describe al tratar de la prueba final, página 567.

Medio de agar con eosina y azul de metileno. Este medio se prepara añadiendo cantidades dadas de los dos colorantes al agar lactosado fundido y vertiendo unos 15 ml en cada platillo de Petri.

Cuando se trazan estrías típicas de *E. coli* sobre la superficie de este medio y se incuban las placas a 37° C durante 24 horas, las colonias presentan obscura la zona central, y un viso metálico verdoso característico. En cambio, las colonias típicas de *Aerobacter aerogenes* muestran pardo el centro y rara vez brillo o viso metálico. En la tabla 32 se exponen las características de ambas colonias, según Levine (1918, 1921).

TABLA 32

	*E. coli**	*A. aerogenes***
Tamaño	Colonias de 2-3 mm de diámetro, bien separadas.	Colonias bien separadas, mayores que las de *E. coli*: 416 mm de diámetro, o más.
Confluencia . .	Las colonias próximas muestran poca tendencia a confluir.	Las colonias próximas confluyen rápidamente.
Elevación . . .	Ligero relieve; superficie plana o algo cóncava, raramente convexa.	Gran relieve, convexidad pronunciada; a veces, el centro se hunde bruscamente.
Aspecto a la luz refractada.	Centros obscuros, casi negros, que cubren más de 3/4 del diámetro de la colonia; estructura interna confusa en la porción oscura central.	Centros pardoobscuros, no tanto como en las de *E. coli*, y más pequeñas en proporción al resto de la colonia. Estriación interna frecuente en las jóvenes.
Aspecto a la luz reflejada	Colonias obscuras, con aspecto de botón, a menudo con anillos concéntricos de viso metálico verdoso.	Mucho más claras que las de *E. coli*, sin viso metálico aparente, excepto a veces en el centro, si está hundido.

* Se han encontrado en ocasiones otros dos tipos de colonias de *E. Coli*; uno se parece al descrito, pero sin viso metálico y con color vinoso, y el otro es algo mayor (4 mm), se extiende en capa tenue, con bordes mellados o irregulares, y la parte central tiene un viso metálico bien apreciable. Estas variedades constituyen un 2 a 3 % de las colonias observadas.

** Se han visto algunas colonias pequeñas de *A. aerogenes*, del tamaño aproximado de las de *E. coli*, pero sin tendencia a confluir.

Wynne, Rode y Hayward (1942) han estudiado el mecanismo de la acción selectiva del medio de agar con eosina y azul de metileno y comprobado que el color de las formas cólicas en este medio depende de dos factores: 1.°, reacción de la eosina (colorante ácido) con el azul de metileno (colorante básico), para formar un colorante compuesto de carácter ácido o neutro, y 2.°, producción, por parte de colonias que fermentan lactosa, de un pH suficientemente bajo para que tomen tal compuesto células sueltas de una colonia. Los microorganismos incapaces de fermentar lactosa no se tiñen, por no tomar el colorante en solución alcalina.

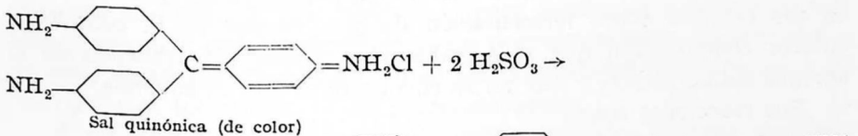
El medio es relativamente estable. Las placas preparadas y conservadas en la nevera durante una semana o más tiempo antes de usarlas han resultado satisfactorias. No deben exponerse sin necesidad a la luz, pues esto puede dar origen a substancias tóxicas en el medio nutritivo (página 189).

Medio de agar de Endo. Este medio se prepara agregando al agar lactosado fundido fucsina básica previamente decolorada con sulfito sódico, y vertiendo en sendas placas de Petri unos 15 ml de la mezcla.

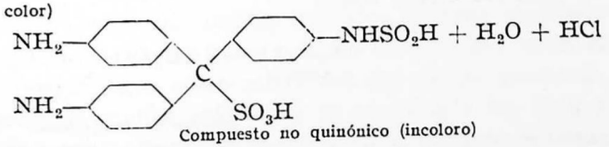
Cuando se siembra en estrías sobre la superficie de este medio la auténtica *E. coli*, se regenera el color rojo del colorante y aparecen colonias de aspecto dorado. Si la solución de fucsina y sulfito se añade a las 24, 48 y 72 horas de incubación, no hay reacción alguna; la substancia que la origina se manifiesta sólo cuando las bacterias se cultivan en presencia del sulfito. Se supone que el agar de Endo actúa como fijador de acetaldehido, que es el compuesto promotor de la reacción característica, y ocupa un lugar intermedio en la fermentación de lactosa.

La fucsina básica comercial es una mezcla de pararrosanilina (magenta O), rosanilina (magenta I) y magenta II, cuerpos que se decoloran al añadir un sulfito, con el cual reaccionan como sigue:

Pararrosanilina:

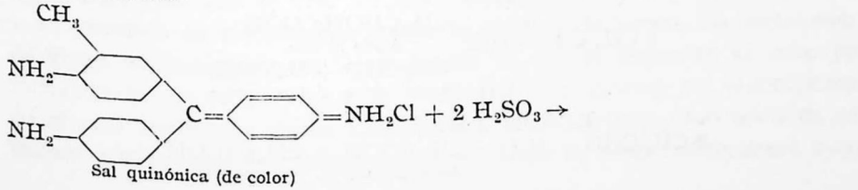


Sal quinónica (de color)

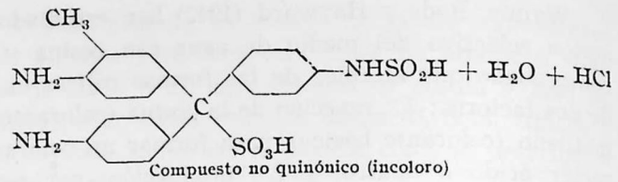


Compuesto no quinónico (incoloro)

Rosanilina:

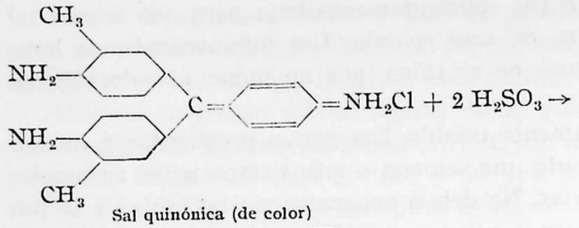


Sal quinónica (de color)

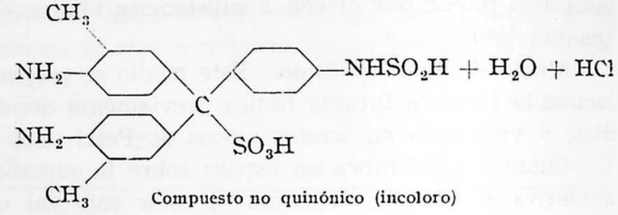


Compuesto no quinónico (incoloro)

Magenta II:



Sal quinónica (de color)

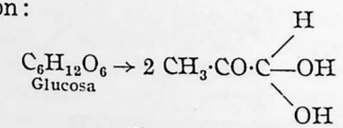


Compuesto no quinónico (incoloro)

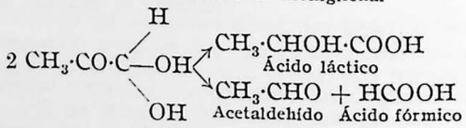
Cuando un aldehido, como el formaldehido, se agrega al compuesto decolorado, reacciona con el sulfito o el ácido sulfuroso para formar un compuesto de adición; el colorante se separa entonces de la combinación y reaparece el color rojo. Según Margolena y Hansen (1933), el colorante regenerado se diferencia en el aspecto químico del compuesto primitivo, y presenta una tonalidad más purpurina. El proceso parece ser esencialmente más complicado que una simple eliminación de sulfito con separación de fucsina básica.

En apoyo de esta hipótesis del aldehido pueden ofrecerse como datos adicionales los resultados obtenidos por Neuberg y Nord (1919) en sus estudios sobre fermentación de glucosa por la *E. coli*. Estos autores comprobaron que el acetaldehido se acumula francamente al agregar sulfito sódico, y que no se encuentra si éste se suprime.

Sus reacciones son:



Hidrato de metilglioxal



$$HCOOH \rightarrow H_2 + CO_2$$

$$2\ CH_3{\cdot}CHO + H_2O \rightarrow \underset{\text{Ácido acético}}{CH_3{\cdot}COOH} + \underset{\text{Alcohol}}{CH_3{\cdot}CH_2OH}$$

En resumen, puede decirse que la regeneración del color rojo obedece a la formación de acetaldehido, el cual puede formar un compuesto de adición con sulfitos. El viso dorado metálico que toman las colonias proviene de la precipitación de colorante libre por los ácidos orgánicos (como el láctico). El colorante regenerado no es igual a la fucsina primitiva, sino de un matiz más purpurino.

Medios líquidos para la prueba de confirmación. En lugar del agar de Endo o del agar con eosina y azul de metileno, se puede emplear caldo lactosado con bilis y verde brillante, o bien caldo con violeta cristal, cuando su empleo proporcione un número máximo de gérmenes coliformes, a juzgar por los resultados de una serie de pruebas finales.

Los dos medios líquidos contienen lactosa y se disponen en tubos de ensayo con ampolleta invertida. Su composición es tal, que excluye o reduce a un mínimo el posible desarrollo de microorganismos no pertenecientes al grupo intestinal o cólico.

De los tubos de fermentación de caldo lactosado que hayan dado un resultado positivo o dudoso en el ensayo preliminar se llevan asas de cultivo a uno de los medios líquidos prevenidos para el ensayo de confirmación. El desprendimiento de gases en cantidad apreciable dentro de las 48 horas, a 37° C, constituye una prueba positiva de confirmación.

PRUEBA FINAL

La prueba final se puede efectuar con colonias desarrolladas en placas de Endo o de agar con eosina y azul de metileno, o en los tubos de caldo biliar lactosado con verde brillante que dan gases en el ensayo de confirmación. Si en este ensayo se utiliza el último medio, de los tubos en que se observe gas se harán siembras en estrías sobre una o varias placas de Endo o de agar con eosina y azul de metileno.

El objeto de la prueba final es determinar si las colonias que aparecen en las placas resembradas pueden fermentar nuevamente lactosa y producir ácido y gases, y si los microorganismos transferidos a un tubo de agar inclinado presentan las propiedades morfológicas y de coloración de los miembros del grupo coliforme.

A un tubo de fermentación con lactosa y a otro de agar inclinado se pasan, cuando menos, una colonia típica o, si no las hay, dos colonias atípicas que puedan considerarse como miembros del grupo intestinal. El tubo de fermentación se incuba a 37° C y se examina a las 24 y a las 48 horas. El tubo de agar inclinado se incuba a 37° C durante 24 horas y se examina al microscopio según la técnica de Gram. La formación de gases en cualquier cantidad dentro de las 48 horas en el tubo de fermentación, y la presencia de bacilos gramnegativos no esporógenos en el agar inclinado, deben interpretarse como prueba final positiva en cuanto a gérmenes del grupo coliforme. Si no se desprenden gases o no

se descubren bacilos de los descritos en un cultivo productor de gases, la prueba final se tendrá por negativa.

Los procedimientos expuestos no distinguen entre tipos fecales y no fecales. La American Public Health Association entiende que cualquier intento de analizar un agua potable a base de una discriminación entre ambos tipos carece de garantía. Sin embargo, los métodos que siguen tienden a distinguir entre el *E. coli* fecal y el *A. aerogenes*, que no lo es; aunque se emplean en muchos laboratorios, no deben considerarse como oficiales en ningún sentido.

DIFERENCIACIÓN ENTRE GÉRMENES FECALES Y NO FECALES DEL GRUPO COLIFORME

Existe una estrecha relación entre los ambientes normales de los subgrupos *Escherichia* y *Aerobacter* del grupo de bacterias intestinales y sus actividades bioquímicas. Las *Escherichia* son parásitos típicos del intestino del hombre y de los animales, en tanto que los *Aerobacter* sólo en ocasiones se encuentran en el contenido intestinal, y casi nunca faltan en el suelo y los granos. Teniendo en cuenta el ambiente natural del *Aerobacter*, no debe extrañar que estos microorganismos se hallen a veces presentes en las deposiciones por breves períodos, pasados los cuales no pueden aislarse de los individuos. Por su presencia ocasional en las heces se introdujeron los términos «fecal» y «no fecal» aplicados al *Aerobacter*, por suponerse que ciertas cepas eran parásitos intestinales. Hasta ahora no se ha informado acerca de tales cepas parásitas, de modo que han fallado todas las tentativas de distinguir entre cepas fecales y no fecales de *Aerobacter* (Stuart, 1941).

Cuando se siembran gérmenes del grupo cólico en tubos de fermentación con caldo lactosado, puede observarse que algunos cultivos producen más gases que otros. Una diferenciación de los microorganismos revela que las cepas típicas de *E. coli* rara vez desarrollan más de 25 % de gases en la ampolleta invertida, mientras que cepas típicas de *A. aerogenes* producen 75 % de gases; esto es indicio de diferencias patentes en el metabolismo de carbohidratos de los dos subgrupos.

Rogers, Clark y Davis (1914); Rogers, Clark y Evans (1914, 1915), y Rogers, Clark y Lubs (1918) demostraron que las cepas típicas de *E. coli* producen dióxido de carbono e hidrógeno en volúmenes aproximadamente iguales, y que miembros típicos del subgrupo *A. aerogenes* dan origen a dos veces más dióxido de carbono que hidrógeno. Los primeros se conocen por gérmenes fermentativos débiles o de baja proporción ($CO_2/H_2 = 1$), y los segundos, por gérmenes fermentativos fuertes o de proporción elevada ($CO_2/H_2 = 2$).

Los microorganismos de proporción elevada *(A. aerogenes)* se encuentran sólo a veces en el contenido intestinal del hombre y de los animales (un 6 %), y normalmente existen en el suelo y en granos; por eso se les atribuye escasa importancia cuando existen en un abastecimiento de aguas. Por el contrario, los microorganismos de baja proporción *(E. coli)* se encuentran pocas veces en los granos y en el suelo, pero constituyen una de las especies predominantes en el contenido intestinal del hombre y de los animales. Algunas veces los hay en localidades donde no se han registrado contaminaciones recientes.

Se dice generalmente que los gérmenes del subgrupo *A. aerogenes* son mucho más viables en una canalización de aguas que los del subgrupo *E. coli*; es cierto que existe alguna diferencia, pero no es tan grande como antes se suponía. Parr (1937) sembró *E. coli* auténtica en agua de fuente esterilizada que contenía pedazos de fibra, y comprobó que los microbios continuaban viables al cabo de dos años, cuatro meses y cuatro días. Otros varios experimentos han dado esencialmente resultados análogos. A juicio de este autor, «la *Escherichia coli* y el *Aerobacter aerogenes* permanecen viables en diversos ambientes durante largos períodos de tiempo. La diferencia de vitalidad entre ambos gérmenes, estudiada fuera del cuerpo, no es tan grande como se pensaba; cuando los dos coexisten en un ambiente, como seguramente ocurre en las heces fecales, el *A. aerogenes* sobrevive más».

Reacción de Voges-Proskauer. Esta reacción fué observada primero por Voges y Proskauer (1898) con ocasión de estudiar los gérmenes del grupo de la septicemia hemorrágica. Descubrieron que la adición de hidróxido potásico a un cultivo de los microorganismos en observación se traduce en la aparición de color rosado, si se deja reposar el tubo a la temperatura ambiente durante veinticuatro horas o más.

El quimismo de la reacción fué desarrollado por Harden y Walpole (1906), Harden (1906) y Harden y Norris (1912 *a*, *b*), quienes descubrieron que existen diferencias apreciables en el metabolismo de carbohidratos entre la *E. coli* típica y el *A. aerogenes*. La fermentación de glucosa por los dos microbios produce las substancias que se indican en la tabla 33.

TABLA 33

Productos	Glucosa fermentada (% en peso)	
	A. aerogenes	*E. coli*
Alcohol	17,10	12,85
Ácido acético	5,10	18,84
Ácido succínico	2,40	5,20
Ácido fórmico	1,00	0,00
Ácido láctico	5,50	31,90
Dióxido de carbono	38,00	18,10
Total	69,10	86,89
Razón CO_2/H_2	2,40	0,83

Las cifras de la tabla indican que 87 % del carbono procede de cultivos de *E. coli*, y sólo 69 % de los de *A. aerogenes*. Según Harden y Walpole, la diferencia se debe a que el segundo origina 2 : 3-butilenglicol, $CH_3 \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CH_3$, y acetilmetilcarbinol, $CH_3 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$, y no lo hace la *E. coli*. El acetilmetilcarbinol, en presencia de hidróxido potásico y aire, se convierte por oxidación en diacetilo, $CH_3 \cdot CO \cdot OC \cdot CH_3$, que con peptona da una coloración semejante a la eosina. El componente de la peptona que produce este color es el núcleo de guanidina, $NH:C(NH_2)NH \cdot R$, del aminoácido arginina.

La reacción de Voges-Proskauer parece tener una importancia sanitaria considerable, ya que permite distinguir bien entre los gérmenes fecales típicos (de baja proporción) y los no fecales (de elevada proporción) del grupo de bacterias intestinales.

La presencia de acetilmetilcarbinol (acetoína) en cultivos bacterianos se puede descubrir fácilmente por el método de Coblentz (1943), que es una combinación de los procedimientos empleados por Barritt (1936) y O'Meara (1931). El organismo en estudio se siembra en cantidad en un tubo con caldo glucosado, y se incuba a 30° C durante seis horas; luego se añade 0,6 ml de naftol α (5 g de naftol α en 100 ml de alcohol etílico al 95 %), y a continuación, 0,2 ml de KOH al 40 % con creatina al 0,3 %. El tubo se agita vigorosamente por espacio de un minuto, poco más o menos. La aparición de un color rosado intenso a rosa indica que la reacción es positiva.

Más información sobre la prueba de Voges-Proskauer se encontrará en Olson y Johnson (1948), Salmoiraghi (1947), y Vaughn, Wedding y Tabachnick (1948).

Reacción del rojo de metilo. Michaelis y Marcora (1912) observaron que cultivos de *E. coli* fermentaban lactosa, con producción de ácidos hasta alcanzar un pH aproximado de 5; esta acidez era suficiente para detener el desarrollo de los gérmenes. De ello dedujeron que la concentración de hidrogeniones en cultivos de *E. coli* es una constante fisiológica. Este mismo principio es válido para cualquier microorganismo fermentativo.

Confirman estas conclusiones Clark (1915) y Clark y Lubs (1915), quienes afirman que el metabolismo de los gérmenes del grupo intestinal se puede regular de manera que la concentración de hidrogeniones de un subgrupo discrepe ampliamente de la del otro. Para una cantidad determinada de azúcar, la *E. coli* produce más ácido que el *A. aerogenes*; esto obedece a que la primera no da 2 : 3-butilenglicol ni acetilmetilcarbinol, y sí lo hace el segundo. La cantidad de carbohidrato fermentable suficiente para que la *E. coli* alcance su máxima acidez no basta para que el *A. aerogenes* llegue a su concentración límite de hidrogeniones. Así, los gérmenes de *E. coli* se detienen en su desarrollo, mientras que

el *A. aerogenes* agota el azúcar, y, al ser éste insuficiente para llegar a su concentración límite de hidrogeniones, ataca y consume los componentes nitrogenados del medio, como alimento plástico y energético. La reacción del medio se va haciendo progresivamente más alcalina.

La cantidad de atemperante o tope influye mucho sobre la concentración final de hidrogeniones que alcanza un microorganismo al desarrollarse en presencia de una substancia fermentable. A una proporción mayor de compensador corresponde una concentración final menor de hidrogeniones (pH más elevado); esto significa que al prolongarse la fermentación se acumulan, aparte los ácidos, otros productos metabólicos que ejercen un efecto tóxico más fuerte sobre los microbios.

El medio empleado en la reacción contiene 0,5 % de glucosa, debidamente atemperada con fosfato dipotásico y peptona para que, al inocularla con *E. coli* típica, dé una concentración límite de hidrogeniones correspondiente a un pH aproximado de 5. En los cultivos de *A. aerogenes* típico, esta concentración final de hidrogeniones corresponde a un pH mucho más alto. El indicador de rojo de metilo utilizado en la prueba vira a rojo en los cultivos de *E. coli*, y toma color anaranjado o amarillo en los de *A. aerogenes*.

Reacción del ácido úrico. Los ensayos de Voges-Proskauer y del rojo de metileno se basan en una diferencia del metabolismo de carbohidratos de las bacterias del grupo intestinal, sin tener en cuenta los cambios que la acción de los microorganismos acarrean en los componentes nitrogenados del medio.

Koser (1918) observó que los cultivos de *A. aerogenes* típico pueden consumir ácido úrico cuando esta substancia se añade a un medio artificial como única fuente de nitrógeno, lo cual son incapaces de hacer los ultivos de *E. coli* típica. En consecuencia, en los primeros hay reproducción y desarrollo exuberante, y no en los segundos. Los resultados coinciden casi totalmente con los de las pruebas de Voges-Proskauer y del rojo de metilo.

Posteriormente, Chen y Rettger (1920) comprobaron que la xantina puede substituir al ácido úrico con igual resultado y la misma coincidencia casi total con los de las reacciones del rojo de metilo y de Voges-Proskauer. La xantina, por oxidación, da ácido úrico; las fórmulas se exponen en la página 329.

Reacción del citrato sódico. Koser (1923, 1924), al estudiar el consumo de sales de ácidos orgánicos por miembros del grupo coliforme, descubrió que estos gérmenes podían separarse en dos subgrupos a base de su acción sobre el citrato sódico o potásico.

La *E. coli* fecal típica no puede utilizar el citrato sódico o potásico cuando esta substancia se añade a un medio artificial como única provisión de carbono; por el contrario, el *A. aerogenes*, o los tipos estrictamente terrícolas, consumen con facilidad citrato sódico. En la prueba

se emplea un medio que contiene citrato como única fuente de carbono.

Según Koser, la prueba del consumo de citrato guarda relación más estrecha que ninguna otra reacción diferencial con el origen de los microorganismos. Parr (1938) aisló una bacteria coliforme que al principio no se desarrollaba en agar citratado, pero que al cabo de tres o cuatro días desarrollaba unas pocas colonias. En un ensayo de comprobación con 5000 razas aisladas de muestras fecales recientes y conservadas, este mismo resultado se obtuvo sólo en 29 casos, lo que demuestra que el fenómeno no es corriente.

LeGare (1944) ha señalado que la adición de riboflavina al medio citratado de Koser estimula el desarrollo de *E. coli*, pero no el de *A. aerogenes*. La vegetación más amplia se produce en tubos con 2 microgramos de riboflavina por mililitro de medio. Al parecer, el *A. aerogenes* es capaz de sintetizar esta vitamina y desarrollarse así, y la *E. coli* no, por lo que no puede desarrollarse, a menos que se añada al medio la substancia accesoria.

Vaughn y otros (1950) comunican que la *E. coli* consume citrato al añadir al medio de Koser cualquiera de varios compuestos complementarios. Hay oxidación de citratos cuando se agregan compuestos tales como acetatos, lactatos, propionatos, glucosa, fructosa, peptona, etc., a concentraciones entre 0,1 y 0,5 %, pero no a otras más bajas. No explican la función de esos compuestos en el consumo de citratos.

Lara y Stokes (1952) han observado que las células vivas de *E. coli* típica no pueden oxidar citratos, mientras que lo hacen las secas. Los resultados parecen indicar que la diferencia entre estos dos géneros no es tan alta como se supuso al principio. La necesidad de desecar la *E. coli* para conseguir que oxide citratos indica probablemente que la impermeabilidad de este germen a los citratos le impide desarrollarse en el medio de Koser.

Para más información, véase Christensen (1949).

Reacción de Eijkman. Eijkman (1904) comprobó que cultivos de *E. coli* producían ácido y gases de caldo glucosado a 46° C, y no lo hacían los de *Aerobacter*.

Perfeccionamientos recientes han renovado el interés por esta reacción. Stuart, Zimmerman, Baker y Rustigian (1942) han observado que el *Aerobacter* y los gérmenes intermedios rara vez producen gas de lactosa a 45,5° C, mientras que la *Escherichia* casi nunca deja de hacerlo. En sus características señaladas por Eijkman, los intermedios eran mucho más afines al *Aerobacter* que a la *Escherichia*.

Taylor (1945), basándose en los resultados obtenidos, deduce que el 97 % de los cultivos de *E. coli* típica o tipo I (pág. 576) examinados fermentan lactosa y producen ácido y gases entre 40° y 44° C. El número no se reduce apreciablemente a 45° C, pero sí a 46° C. En cambio, el 15 % de los cultivos de *A. aerogenes* típico o tipo I resultaron positivos a 44° C, y sólo el 2 % a 45° C. Estos resultados se resumen en la tabla 34.

TABLA 34. — PRODUCCIÓN DE ÁCIDO Y GASES EN CALDO LACTOSO POR VARIOS TIPOS DE BACTERIAS COLIFORMES, A DIFERENTES TEMPERATURAS

Tipo	Número de cultivos ensayados	Tantos por 100 de cultivos productores de ácido y gases a						
		37°C	40°C	42°C	43°C	44°C	45°C	46°C
E. coli, tipo I . . .	96	100	97	97	97	97	93	52
E. coli, tipo II . . .	50	100	64	36	32	28		
Intermedio, tipo I . .	78	100	78	56	23	0		
Intermedio, tipo II .	53	100	55	4	2	0		
A. aerogenes, tipo I (o	80	100	83	53	35	15	2	
A. cloacae) . . .	52	100	. .	. .	. .	15		
A. aerogenes, tipo II.	25	100	80	12	0	0		

La producción de gases a partir de carbohidratos a la temperatura óptima por los diferentes géneros de la familia *Enterobacteriáceas* (1, *Escherichia*; 2, *Aerobacter*; 3, *Klebsiella*; 4, *Paracolobactrum*; 5, *Erwinia*; 6, *Serratia*; 7, *Proteus*; 8, *Salmonella*; 9, *Shigella*) tiende a aumentar de la *Serratia*, pasando por *Erwinia*, al *Aerobacter*, y luego a descender a través de *Escherichia*, *Proteus* y *Salmonella* hasta el género *Shigella*. Lo mismo parece suceder con las relaciones señaladas por Eijkman para estos géneros.

TABLA 35. — NÚMEROS MÁS PROBABLES DE GÉRMENES COLIFORMES EXISTENTES EN 100 ML DE UNA MUESTRA DE AGUA

Número de tubos de caldo lactosado positivos			Número de gérmenes coliformes	Número de tubos de caldo lactosado positivos			Número de gérmenes coliformes
10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml	
0	0	0	0	3	0	0	7,8
0	0	1	1,8	3	0	1	11
0	1	0	1,8	3	1	0	11
0	1	1	3,6	3	1	1	14
1	0	0	2	4	0	0	13
1	0	1	4	4	0	1	17
1	1	0	4	4	1	0	17
1	1	1	6,1	4	1	1	21
2	0	0	4,5	5	0	0	23
2	0	1	6,8	5	0	1	31
2	1	0	6,8	5	1	0	33
2	1	1	9,2	5	1	1	46

CÓMPUTO DE LAS CIFRAS MÁS PROBABLES DE MICROORGANISMOS COLIFORMES

La tabla 35 se basa en la fórmula general de Hoskins (1934) para calcular el número de gérmenes coliformes presentes en 100 ml de una muestra de agua. Los números derivan del empleo de cinco tubos, cada uno de los cuales contienen 10 ml de muestra de agua, un tubo con 1 ml de la misma muestra y otro tubo con 0,1 ml de ella.

Véase en Hoskins (1934) información sobre la fórmula general para obtener tales resultados.

TÉCNICA DEL FILTRO MOLECULAR

Goetz y Tsuneishi (1951) han descrito un nuevo método para contar microorganismos coliformes en el agua, y lo denominan técnica del filtro molecular.

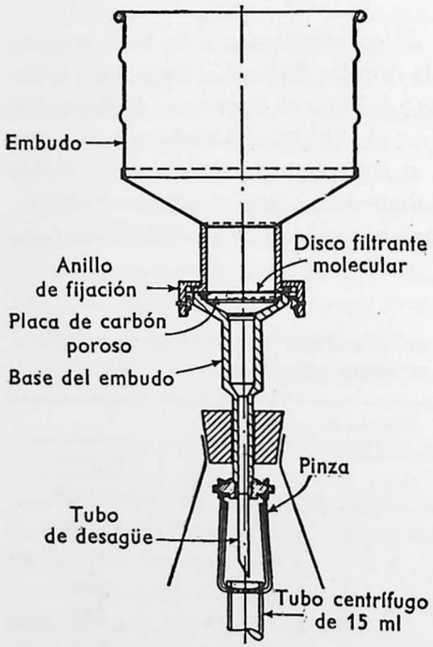


Fig. 186. — Portafiltros. El aparato consiste en un embudo de acero inoxidable fijado sobre una base que contiene un filtro molecular. El vástago de la base se inserta en un frasco de filtro, a través de un tapón de goma. (Según Goetz y Tsuneishi.)

Este filtro molecular es un aparato eficaz para eliminar bacterias del agua y de otros líquidos. Las bacterias son eliminadas y producen colonias sobre la superficie de la membrana en su lugar de fijación.

Según Kabler y Clark (1952),

Las bacterias se separan de líquidos colocando una membrana en el aparato portafiltros (fig. 186) e impulsando el menstruo a través de la membrana por medio de un vacío parcial en el recipiente del filtro. El embudo y la membrana se enjuagan con unos 50 ml de líquido diluído estéril. La membrana se lleva entonces a un disco de papel absorbente que contiene las substancias nutritivas requeridas en solución, con el reverso de la membrana asentado en el disco. Como el material nutritivo tiene que atravesar la membrana para llegar a las bacterias, no ha de haber burbujas de aire entre la almohadilla y la membrana.

Cada microorganismo, si dispone de substancias nutritivas adecuadas, producirá una colonia visible tras suficiente incubación (fig. 187). El tiempo y la temperatura de incubación dependen de la especie de bacterias que

interesa cultivar y del medio utilizado. Las condiciones óptimas se determinarán para cada género, y, a ser posible, para algunas de las especies de bacterias estudiadas.

En opinión de Goetz y Tsuneishi, el filtro molecular ofrece varias ventajas evidentes para el análisis de aguas:

Permite concentrar un pequeño número de gérmenes de grandes cantidades de agua, con lo que aumenta la exactitud y seguridad de tales determinaciones.

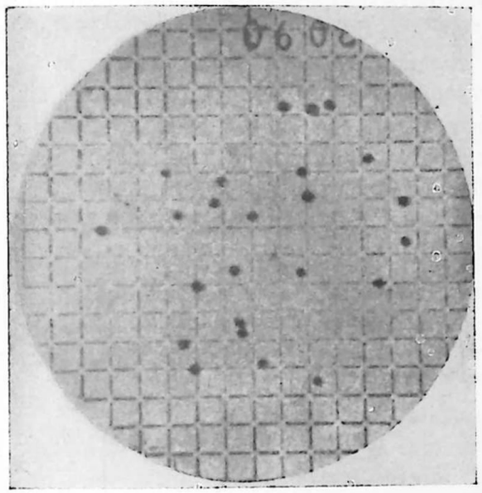


Fig. 187. — Cultivo de *Escherichia coli* en un filtro molecular. (Según Goetz y Tsuneishi.)

Reduce al mínimo la dispersión de colonias y permite combinar cualquier número de bacterias, desde escasas hasta 5000 a la vez. Esto tiene la ventaja de disminuir las diluciones de laboratorio y las incubaciones duplicadas.

Hace posible separar los gérmenes de su medio nutritivo en cualquier momento, a fin de cambiar el medio o de detener parcial o totalmente el desarrollo ulterior.

Da un recuerdo directo, en vez de una determinación del número más probable a partir de tubos de fermentación positivos (tabla 35).

Ahorra tiempo, en comparación con los procedimientos corrientemente admitidos.

Permite diferenciar mejor y más rápidamente las bacterias.

Proporciona datos permanentes acerca de la forma de los discos filtrantes conservados.

Véase más información, en Clark, Geldreich, Jeter y Kabler (1951).

RELACIONES ENTRE LOS GÉRMENES COLIFORMES

Los estudios de estos últimos años subrayan la complejidad del grupo de bacterias intestinales o coliformes. En la práctica generalmente seguida para clasificar estas bacterias se designan por *Escherichia* todas las razas que dan reacción positiva con indol y rojo de metilo, no producen acetilmetilcarbinol y no son capaces de utilizar citrato sódico como una provisión de carbono. Parr (1936) introdujo la abreviatura mnemónica IMViC para designar estas cuatro reacciones; este término es convencional, y con él denotan I, indol; M, rojo de metilo; V, Voges-Proskauer, y C, citrato; la letra *i*, entre la V y la C, se ha insertado solamente por razones de eufonía. Conforme a este sistema, el símbolo de la *E. coli* típica es + + — —, y el del *A. aerogenes* típico, — — + +. Empleando estos cuatro signos para la clasificación, Parr (1938 *a*) demostró que son posibles 16 microorganismos diferentes (tabla 36). Los tipos más frecuentes son — + — —, + + — —, — + — + y — — + +.

TABLA 36. — SIGNOS IMViC DE GÉRMENES COLIFORMES RETIRADOS DE HECES RECIENTES

Indol	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Citrato sódico	Tipo
+	+	—	—	*E. coli* típica
—	+	—	—	*E. coli* atípica
+	—	—	—	*E. coli* atípica
+	+	+	—	Intermedio
+	+	—	+	Intermedio
—	+	—	+	Intermedio
+	—	+	—	Intermedio
+	—	—	+	Intermedio
—	+	+	—	Intermedio
+	+	+	+	Intermedio
+	—	+	+	Intermedio
—	+	+	+	Intermedio
—	—	—	+	*A. aerogenes* atípico
—	—	+	—	*A. aerogenes* atípico
—	—	+	+	*A. aerogenes* típico
—	—	—	—	

Según Parr (1938 *a*), los coliformes intermedios se pueden definir como los microorganismos del grupo con una o más características de *coli* y una o varias de *aerogenes*, a la vez que algunos, principalmente la forma fecal típica, producen sulfuro de hidrógeno. Características esenciales de *E. coli* son las reacciones positivas con indol y rojo de metilo, y del *A. aerogenes*, sobre todo, las reacciones positivas de Voges-Proskauer y de consumo de citratos.

Los cambios en las características IMViC producen otros en el aspecto de las colonias de microorganismos. Se han identificado muchos tipos de colonias, desde planas, redondas, lisas y brillantes, típicas de *E. coli*, hasta realzadas, señaladamente convexas, confluentes y mucoides, típicas de *A. aerogenes*.

Parr concluye lo siguiente:

> Existe una gran variabilidad en la flora coliforme normal y en la del mismo individuo de un día a otro. Las muestras de deyecciones pueden no contener gérmenes coliformes en absoluto, o presentar todas las formas que consumen citrato, con exclusión del colibacilo. No ofrecen confianza las abreviaciones o simplificaciones en la bacteriología del agua y los alimentos por el hecho de dominar una forma intestinal típica. Es tal la complejidad del grupo coliforme, que parece imposible aprovechar la labor del pasado en términos de la actual, lo cual obliga a rehacer gran parte de ella. Resulta dudosa la etiología primaria de los gérmenes coliformes atípicos, y se aconseja conceder más importancia al punto de vista etiológico en bacteriologia intestinal.

Stuart, Griffin y Baker (1938), y Vaughn y Levine (1942), reconocen asimismo la complejidad del grupo coliforme, y sugieren su división en tres subgrupos: *Aerobacter*, intermedios y *Escherichia*, a base de sus reacciones bioquímicas.

Bacterias coliformes pigmentadas. A propósito de la conservación de una colección de cultivos coliformes en una nevera entre 0 y 5° C, Gililland y Vaughn (1943) observaron que 12 de ellos tomaban color amarillento. Se obtuvieron otros tres cultivos pigmentados de otras procedencias, lo que da un total de 15; de ellos, 12 resultaron ser *Escherichia* y 3 *Aerobacter*. Se necesitó incubar a temperaturas relativamente bajas para producir pigmentos en 12 de los cultivos; éstos los presentaron a 19° C, pero no entre 30 y 37° C, y 3 tomaron color a 37° C. El metabolismo anaeróbico de glucosa de cepas típicas no pigmentadas no discrepó apreciablemente del de las formas pigmentadas.

Gérmenes del grupo intestinal que fermentan lentamente lactosa. Según Parr (1938 *c*), las muestras de heces recientes pueden estar constituidas por bacterias coliformes (*Escherichia*, intermedias, *Aerobacter*), enterococos (*Streptococos*), anaerobios estrictos esporógenos (*Clostridium*), anaerobios no esporógenos (*Bacteroides*), *Micrococcus*, *Lactobacillus*, microbios termófilos (*Streptococcus*), aerobios esporógenos (*Bacillus*), *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, miembros del grupo de Friedländer (*Klebsiella*), mohos, levaduras, algas y espiroquetas.

Manifiesta el mismo autor que la flora de un individuo varía de una vez a otra, aunque esté sano y observe un régimen relativamente estable. A veces no se encuentran bacterias coliformes; otras, se han observado algunos (*Aerobacter*, intermedios), pero no *E. coli*. Se ve, pues, que ciertas muestras de heces recientes pueden impurificar el agua sin que los descubran los métodos bacteriológicos hoy en uso. Por for-

tuna, tales excepciones son insólitas, y apenas dificultan la interpretación médica de los resultados bacteriológicos.

La flora bacteriana de heces conservadas de tiempo es distinta de la de heces recientes. Jordan (1926) comprobó que en heces recién evacuadas aumenta el número de bacterias, y disminuye luego; esto ocurre a cualquier temperatura, pero con máxima rapidez a 37° C. Descubrió que el aumento de número no es obra de la *E. coli*, sino de otros microorganismos, pues aquélla termina por ser eliminada en las heces conservadas. Según Parr, un 14 % de todas las muestras de deposiciones recientes contienen sólo *E. coli*, y opina que en este caso, por mucho que se conserven, no aparece ningún otro tipo de bacteria coliforme. Cuando la muestra primitiva de heces contiene microbios coliformes que consumen citrato, además de *E. coli*, los primeros (*A. aerogenes*, intermedios, etc.), se reproducen con más rapidez que el colibacilo, y terminan por suplantarlo; al mismo tiempo, aumentan las razas que fermentan lactosa despacio o no producen más que ácido.

Varios investigadores mencionan la transformación de microorganismos coliformes que fermentan lentamente lactosa en cepas que lo hacen con rapidez, mediante subcultivos frecuentes en caldo lactosado o nutritivo. Las características IMViC demuestran que tales microorganismos pertenecen a los subgrupos *Escherichia* o *Aerobacter*. Los que fermentan poco a poco lactosa se han aislado de abastecimientos de agua y de deposiciones de individuos sanos o aquejados de diarrea.

Hershey y Bronfenbrenner (1936) han descubierto que es posible transformar un germen que fermente con rapidez lactosa en otro que no la fermente, por inoculación en un medio de succinato sódico. Sugieren que los microbios que fermentan despacio lactosa pueden no ser iguales a otros del grupo intestinal que la fermenten. Stokes, Weaver y Scherago (1938) comunicaron haber logrado convertir los primeros en fermentadores rápidos, y luego nuevamente en fermentadores lentos; en su opinión, las cepas estudiadas pertenecían a los subgrupos *Escherichia* y *Aerobacter* del grupo coliforme.

Dulaney y Smith (1939) examinaron 400 muestras de heces, y comprobaron que 20 % de ellas contenían gérmenes que fermentaban lentamente lactosa. Según estos autores, en la mayoría de los casos, estos gérmenes necesitaban dos a cinco días para producir ácidos y gases en tubos de fermentación. Los traslados diarios a caldo lactosado aceleran la rapidez de fermentación del azúcar. También han aislado gérmenes fermentadores lentos de lactosa de orina, de cultivos en sangre y de evacuaciones de diarreicos.

McCrady (1939) ha informado que una mayoría entre 30 investigadores de laboratorio interrogados eran partidarios de incluir en el grupo intestinal los gérmenes que fermentan despacio lactosa al dictaminar la calidad sanitaria de un agua potable.

En suma, puede decirse que en otro tiempo se tendía generalmente a considerar los fermentadores lentos de lactosa como formas atenuadas de microorganismos coliformes, que indicaban una contaminación antigua y carecían de importancia sanitaria. Hoy existen pruebas de que tales fermentadores lentos son formas que se han apartado de los tipos normales, pero que deben estimarse como dotadas de considerable importancia sanitaria.

Paracolibacilos. Las bacterias paracólicas ocupan una posición intermedia entre los microorganismos coliformes (*Escherichia*, intermedios, *Aerobacter*) y la *Salmonella*. Borman, Stuart y Wheeler (1944) propusieron asignar el nombre genérico de *Paracolobactrum* a este grupo de microorganismos (pág. 573). Los *Paracolobactrum* presentan algunas de las características de cultivo de los microbios coliformes, y cierta patogenicidad al estilo de la *Salmonella*.

Los *Paracolobactrum* son bacilos cortos, caracterizados por la fermentación consecuente retardada de lactosa (a veces negativa). Fermentan glucosa, con producción de gases visibles, y ciertas formas atacan de modo característico carbohidratos entre 20 y 30° C, pero no a 37° C. Algunas de las especies son patógenas para el hombre, y ocasionan gastroenteritis. Kraft (1951) ha aislado *P. coliforme* de un enfermo de neumonía fibrinosa.

Los paracolibacilos, como las bacterias coliformes, pueden dividirse en tres subgrupos: *Aerobacter* paracólico, intermedios paracólicos y *Escherichia* paracólica, de acuerdo con sus reacciones IMViC. Una propiedad frecuente en estos gérmenes consiste en que no fermentan lactosa, o la atacan muy despacio; por eso, a menudo se confunden colonias en placas de medios diferenciales con gérmenes patógenos que no fermentan lactosa. Estos microorganismos son causa frecuente de intoxicación alimenticia, y se han tomado por miembros del género *Salmonella*.

Para más información véanse Boniece y Mallmann (1950), Edwards, West y Bruner (1947, 1948), Gainey y Lord (1952), Levine (1943), Moran y Bruner (1949), Mushin (1949, 1950), Parr (1937, 1938 b, 1939), Prescott, Winslow y McCrady (1946), Schwabacher (1949), Sears y Brownlee (1952), Stahly y Werkman (1942), Stuart, Galton y McGann (1948), Wheeler, Stuart, Rustigian y Borman (1943).

REFERENCIAS

American Public Health Association: «Standard Methods for the Examination of Water and Sewage», Nueva York, 1946.

Barritt, M. M.: The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α-naphthol, *J. Path. Bact.*, 42: 441, 1936.

Bigger, J. W.: The growth of coliform bacilli in water, *J. Path. Bact.*, 44: 167, 1937.

Boniece, J. R. y W. Mallmann: The optimum incubation temperature for the primary isolation of coliform organisms, *J. Am. Water Works Assoc.*, 42: 155, 1950.

Borman, E. K., C. A. Stuart y K. M. Wheeler: Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*, *J. Bact.*, **48**: 351, 1944.

Chambers, C. W.: Relationships of coliform bacteria to gas production in media containing lactose, *Pub. Health Reports*, **65**: 619, 1950.

Chen, C. C. y L. F. Rettger: A correlation study of the colon-aerogenes group of bacteria with special reference to the organisms occurring in the soil, *J. Bact.*, **5**: 253, 1920.

Christensen, W. B.: Hydrogen sulfide production and citrate utilization in the differentiation of the enteric pathogens and the coliform bacteria, *Research Bull.* **1**, *Lab. Division, Weld County Health Dept., Greeley, Colo.*, 1949.

Clark, H. F., E. E. Geldreich, H. L. Jeter y P. W. Kabler: The membrane filter in sanitary bacteriology, *Pub. Health Reports*, **66**: 951, 1951.

Clark, W. M.: The final hydrogen ion concentrations of cultures of *Bacillus coli*, *J. Biol. Chem.*, **22**: 87, 1915.

— y H. A. Lubs: The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators, *J. Infectious Diseases*, **17**: 160, 1915.

Coblentz, J. M.: Rapid detection of the production of acety-methyl-carbinol, *Am. J. Pub. Health*, **33**: 815, 1943.

Dulaney, A. D. y E. F. Smith: Slow lactose fermenters in water analysis, *Am. J. Pub. Health*, **29**: 266, 1939.

Edwards, P. R., M. G. West y D. W. Bruner: Arizona group of paracolon bacteria, *Kentucky Agric. Exp. Sta. Bull.* **499**: 1947.

—, — y —: Antigenic studies of a group of paracolon bacteria (Bethesda group), *J. Bact.*, **55**: 711, 1948.

Eijkman, C.: Die Gärungsprobe bei 46° C als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung, *Centr. Bakt., I Orig.*, **37**: 742, 1904.

Escherich, T.: Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings, *Fortsch. Med.*, **3**: 515, 547, 1885.

Folpmers, T.: Is it justified to use lactose broth for the detection of *B. coli in* the Presumptive Test of routine water analysis?, *Antonie van Leeuwenhoek*, **14**: 58, 1948.

Gainey, P. L., T. H. Lord: «Microbiology of Water and Sewage», Nueva York, Prentice-Hall, Inc., 1952.

Gililland, J. R. y R. H. Vaughn: Biochemical characteristics of pigmented coliform bacteria, *J. Bact.*, **45**: 499, 1943.

Goetz, A. y N. Tsuneishi: Application of molecular filter membranes to the bacteriological analysis of water, *J. Am. Water Works Assoc.*, **43**: 943, 1951.

Harden, A.: On Voges and Proskauer's reaction for certain bacteria, *Proc. Roy. Soc. (London), Series B*, **77**: 424, 1906.

— y D. Norris: The bacterial production of acetylmethylcarbinol and 2:3-butylene glycol from various substances, *ibid.*, **84**: 492, 1912*a*; III. *ibid.*, **85**: 73, 1912*b*.

— y G. S. Walpole: Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* (Escherich) on glucose and mannitol: Production of 2:3-butylene glycol and acetylmethylcarbinol, *ibid.*, **77**: 399, 1906.

Hershey, A. D. y J. Bronfenbrenner: Dissociation and lactase activity in slow lactose-fermenting bacteria of intestinal origin, *J. Bact.*, **31**: 453, 1936.

Hoskins, J. K.: Most probable numbers for evaluation of coli-aerogenes tests by fermentation tube method, *Pub. Health Reports*, **49**: 393, 1934.

Jordan, E. O.: The changes in the bacterial content of stored normal and typhoid feces, *J. Infectious Diseases*, **38**: 306, 1926.

Kabler, P. W., y H. F. Clark: The use of differential media with the membrane filter, *Am. J. Pub. Health*, **42**: 390, 1952.

Kehr, R. W., y C. T. Butterfield: Notes on the relation between coliforms and enteric pathogens, *Pub. Health Reports*, **58**: 589, 1943.

Koser, S. A.: The employement of uric acid synthetic medium for the differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes*, *J. Infectious Diseases*, **23**: 377, 1918.

—: Utilization of the salts of organic acids by the colonaerogenes group, *J. Bact.*, **8**: 493, 1923.

Koser, S. A.: Correlation of citrate utilization by members of the colonaerogenes group with other differential characteristics and with habitat, *ibid.*, **9**: 59, 1924.

Kraft, J. R.: Paracolon pneumonia, *Am. J. Clin. Path.*, **21**: 666, 1951.

Lara, F. J. S., y J. L. Stokes: Oxidation of citrate by *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **63**: 415, 1952.

LeGare, Sister Mary Jude: The effect of B vitamins on the utilization of citrate by coliform organism, *Wasmann Collector*, **6**: 21, 1944.

Levine, M.: Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar, *J. Infectious Diseases*, **23**: 43, 1918.

—: Bacteria fermenting and their significance in water analysis, *Iowa State Eng. Exp. Sta. Bull.*, 62, 1921.

—: The effect of concentration of dyes on differentiation of enteric bacteria on eosin-methylene blue agar, *J. Bact.*, **45**: 471, 1943.

McCrady, MacH: Slow lactose fermenters in water analysis, *Am. J. Pub. Health*, **27**: 1243, 1937.

Margolena, L. A., y P. A. Hansen: The nature of the reaction of the colon organism on Endo's medium, *Stain Technol.*, **8**: 131, 1933.

Michaelis, L., y F. Marcora: Die Säureproduktivität des *Bakterium coli*, *Z. Immunitätsforsch.*, Abt. I, Orig., **14**: 170, 1912.

Moran, A. B., y D. W. Bruner: Further studies on the Bethesda group of paracolon bacteria, *J. Bact.*, **58**: 695, 1949.

Mushin, R.: Studies on paracolon bacilli, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **27**: 543, 1949.

—: Bacteriological aspects of gastro-enteritis in infants, *ibid.*, **28**: 493, 1950.

Neuberg, C., y F. F. Nord: Anwendungen der Abfangmethode auf die Bakteriengärungen. I. Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker Mannit und Glycerin durch *Bacterium coli*, durch Erreger der Ruhr und des Gasbrandes, *Biochem, Z.*, **96**: 133, 1919.

Olson, B. H., y M. J. Johnson: The production of 2, 3-butylene glycol by *Aerobacter aerogenes* **199**, *J. Bact.*, **55**: 209, 1948.

O'Meara, R. A. Q: A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetylmethylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrates, *J. Path. Bact.*, **34**: 401, 1931.

Parr, L. W.: Sanitary significance of the succession of coli-aerogenes organisms in fresh and in stored feces, *Am. J. Pub. Health*, **26**: 39, 1936.

—: Viability of coli-aerogenes organisms in culture and in various environments, *J. Infectious Diseases*, **60**: 291, 1937.

—: A new «mutation» in the coliform group of bacteria, *J. Heredity*, **29**: 381, 1938.

—: The occurrence and succession of coliform organisms in human feces, *Am. J. Hyg.*, **27**: 67, 1938*a*.

—: Coliform intermediates in human feces, *J. Bact.*, **36**: 1, 1938b.

—: Organisms involved in the pollution of water from long stored feces, *Am. J. Pub. Health*, **28**: 445, 1938c.

—: Coliform bacteria, *Bact. Rev.*, **3**: 1, 1939.

Prescott, S. C., C.-E. A. Winslow, y MacH. McCrady: «Water Bacteriology», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1946.

Rector, F. L., y H. J. Daube: Longevity of *Bacillus coli* in water, *Abstr. Bacteriol.*, **1**: 57, 1917.

Rogers, L. A., W. M. Clark, y B. J. Davis: The colon group of bacteria, *J. Infectious Diseases*, **14**: 411, 1914.

—, —, y A. C. Evans: The characteristics of bacteria of the colon type found in bovine feces, *ibid.*, **15**: 99, 1914.

—, —, y —: The characteristics of bacteria of the colon type occurring on grains, *ibid.*, **17**: 137, 1915.

—, —, y H. A. Lubs: The characteristics of bacteria of the colon type occurring in human feces, *J. Bact.*, **3**: 231, 1918.

Salmoiraghi, G. C.: Un procedimiento semplice per dimostrare la produzione di acetilmetilcarbonilo da parte dei microbi, *Rev. ist. sieroterapico italiano*, 23: 121, 1947.

Savage, W. G., y D. R. Wood: The vitality and viability of streptococci in water, *J. Hyg.*, **16**: 227, 1917.
Schwabacher, H.: A serological investigation of the paracolon group of organisms, *J. Path. Bact.*, **61**: 63, 1949.
Sears, H. J., e I. Brownlee: Further observations on the persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man, *J. Bact.*, **63**: 47, 1952.
Stahly, G. L., y C. H. Werkman: Origin and relationship of acetylmethyl-carbinol to 2:3-butylene glycol in bacterial fermentations, *Biochem. J.*, **36**: 575, 1942.
Stokes, J. L., R. H. Weaver, y M. Scherago: A study of the paracoli group, *J. Bact.*, **35**: 20, 1938.
Stuart, C. A.: Sanitary significance of the coliform bacteria in water, *J. New Engl. Water Works Assoc.*, **55**: 355, 1941.
—, M. M. Galton, y V. McGann: Antigenic relationships of 765 *Paracolobactrum intermedium* cultures, *J. Bact.*, **56**: 411, 1948.
—, A. M. Griffin, y M. E. Baker: Relationships of coliform organisms, *ibíd.*, **36**: 391, 1938.
—, A. Zimmermann, M. Baker, y R. Rustigian: Eijkman relationships of the coliform and related bacteria, *ibíd.*, **43**: 557, 1942.
Taylor, C. B.: The effect of temperature of incubation on the results of tests for differentiating species of coliform bacteria, *J. Hyg.*, **44**: 109, 1945.
Vaughn, R. H., y M. Levine: Differentiation of the «intermediate» coli-like bacteria, *J. Bact.*, **44**: 487, 1942.
—, J. T. Osborne, G. T. Wedding, J. Tabachnick, C. G. Beisel, y T. Braxton: The utilization of citrate by *Escherichia coli, ibíd.*, **60**: 119, 1950.
—, G. T. Wedding, y J. Tabachnick: The Voges-Proskauer reaction and differentiation of the coliform bacteria, *Hilgardia*, **18**: 357, 1948.
Watie, E.: Relative productivity of newer coliform media, *Pub. Health Reports*, **63**: 269, 1948.
Wheeler, K. M., C. A. Stuart, R. Rustigian, y E. K. Borman: *Salmonella* antigens of coliform bacteria, *J. Immunol.*, **47**: 59, 1943.
Winslow, C.-E. A., y B. Cohen: Relative viability of *B. coli* and *B. aerogenes* types in water, *J. Infectious Diseases*, **23**: 82, 1918.
— e I. S. Falk: Studies on salt action. VIII. The influence of calcium and sodium salts at various hydrogen-ion concentrations upon the viability of *Bacterium coli, J. Bact.*, **8**: 215, 1923.
Wynne, E. S., L. J. Rode, y A. E. Hayward: Mechanism of the selective action of eosin-methylene-blue agar on the enteric group, *Stain Technol.*, **17**: 11, 1942.

CAPÍTULO XXII

BACTERIOLOGÍA DE LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS

LECHE

La leche se considera como uno de los alimentos simples más satisfactorios que la Naturaleza proporciona. Contiene proteínas, grasas, carbohidratos, sales inorgánicas y vitaminas.

Según el U. S. Public Health Service (1939),

> La leche es la secreción láctea obtenida por ordeño completo de una o varias vacas sanas, con exclusión de la obtenida durante quince días antes y cinco días después de parir, o un período mayor necesario para que la leche quede prácticamente libre de calostros; ha de contener no menos de 8 % de substancias sólidas no grasas, ni menos de 3,75 % de grasa de leche.

Los componentes de la leche se pueden clasificar en tres grupos, a base de su solubilidad: 1.º, algunos constituyen una verdadera solución; 2.º, otros están parcialmente en solución y parcialmente en suspensión o solución coloidal, y 3.º, otros forman por entero una solución coloidal (pág. 415).

Color de la leche. El color de la leche obedece en gran parte a la presencia de caroteno, que existe en ella al menos en tres formas isoméricas, α, β y γ. Otro pigmento muy afín al caroteno es la criptoxantina, que se encuentra en el maíz seco. Todos estos pigmentos son precursores o fases previas de la vitamina A; una molécula de caroteno β puede dar dos de esa vitamina, y una molécula de cualquiera de los otros pigmentos da solamente una.

El caroteno se encuentra en el heno, la hierba, las hojas verdes y en algunas frutas, zanahorias, etc.; el que contiene la leche de vaca depende del que haya en el pienso. No todo el caroteno de la ración se convierte en vitamina A; cuando las vacas consumen substancias con caroteno, parte del pigmento se transforma en vitamina A, y algo pasa a la leche sin alterarse. La vitamina A es incolora, y amarillo el caroteno.

La leche contiene asimismo ácido ascórbico y riboflavina. Holmes y Jones (1945) expusieron leche embotellada a la luz solar, y comprobaron que el ácido ascórbico contenido en ella se destruye en treinta minutos, igual que casi toda la riboflavina en dos horas. Estos resultados indican que no se debe dejar expuesta la leche por largo rato a una luz solar intensa.

ACIDIFICACIÓN NATURAL DE LA LECHE

Reacción de la leche fresca. La leche recién ordeñada puede reaccionar de muy diversos modos. Por lo general, el pH es ligeramente ácido, entre 6,3 y 7,2, con un promedio aproximado de 6,75, y fluctúa en las distintas fases del ordeño; la primera leche que sale suele ser la menos ácida; la siguiente, la más ácida, y la última tiene una acidez intermedia.

Cambios en la reacción de la leche. La leche no esterilizada en reposo fermenta con rapidez, y produce principalmente ácido láctico a expensas de la lactosa que contiene. Se supone que ésta se hidroliza primero, y da una molécula de glucosa y una de galactosa; en una segunda fase, las hexosas se transforman por fermentación en ácido láctico.

Generalmente se admite que la acidez de la leche se nota por el sabor cuando el pH desciende aproximadamente a 6. Al seguir aumentando la concentración del ácido, termina por precipitar la caseína; esto parece suceder cuando el pH alcanza 4,78 a 4,64. La ebullición coagula la leche a un pH mucho más alto (menor acidez). La acidificación continúa subiendo hasta una concentración suficiente para impedir el desarrollo de los microorganismos que hacen fermentar la leche; y el ácido láctico producido en ella detiene el desarrollo de la mayoría de los gérmenes que pudiera contener, actuando así como agente conservador.

En la leche agriada pueden desarrollarse mohos y levaduras, que consumen parte del ácido y reducen así la acidez. En estas condiciones se favorece la rápida descomposición de las proteínas de la leche, por desarrollarse bacterias putrefactivas. Por lo regular, las alteraciones por putrefacción requieren varias semanas. El consumo del ácido se hace más rápido disponiendo la leche en capas poco profundas y bien aireadas. Éste es el ciclo general de los cambios que experimenta la leche cruda cuando se deja en reposo a la temperatura ambiente.

Grupo del Streptococcus lactis. El microorganismo causante de la acidificación normal de la leche es el *Streptococcus lactis*, del cual se han identificado algunas variedades que se distinguen por el sabor que originan, por el carácter de la leche fermentada, la rapidez de producción de ácido y reducción del tornasol, etc. Hammer y Baker (1926), Stark y Sherman (1935), y otros autores, han mencionado diversas variedades de este germen: *S. lactis* var. *maltigenes*, *S. lactis* var. *anoxyphilus*, *S. lactis* var. *tardus*; otras son *S. amylolactis*, *S. raffinolactis* y *S. saccharolactis* (Orla-Jensen y Hansen 1932). Han aportado nuevos testimonios de la semejanza de diferentes variedades o cepas de *S. lactis* los investigadores Sherman, Smiley y Niven (1940), quienes, al preparar sueros específicos de especie, obtuvieron buenas reacciones de precipitación con los extractos de todas las razas de *S. lactis* ensayadas.

El *S. lactis* apenas se encuentra en las ubres de vacas. Stark y Sherman (1935) consiguieron aislarlo repetidas veces de ciertas plantas, y sugieren que acaso los vegetales constituyan el medio natural del microbio y se encuentren a veces razas supervivientes en excrementos de animales. El germen se puede obtener del pelaje de la vaca; y como existe normalmente en el estiércol, se supone que éste es el foco de contaminación de la leche.



Fig. 188. — *Streptococcus lactis*, agente de la acidificación normal de la leche.

El *S. lactis* puede presentarse en parejas o en cadenas cortas o largas (fig. 188); es esférico, pero en ocasiones se alarga un poco en la dirección de las cadenas. Las células miden 0,5 a 1 μ de diámetro, y son grampositivas.

Es homofermentativo, pues ataca a varios carbohidratos para producir principalmente ácido dextroláctico, sin formar gases; algunas cepas poco frecuentes no fermentan lactosa. En cultivos en caldo, el pH final oscila entre 4,5 y 4; el microorganismo cesa de desarrollarse a un pH de 9,6, pero crece a 9,2. Vegeta a 10° C, o menos, y a 40° C, pero no a 45° C; la temperatura óptima se acerca a los 30° C. Antes de que la leche se coagule, el tornasol se reduce (decolora) por completo.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA LECHE

Es probable que las ubres de la vaca no estén nunca normalmente estériles, pues en la leche recién ordeñada abundan los microorganismos. La que sale primero da la cifra más alta, y ésta disminuye luego, para hacerse mínima al final; este proviene de que la primera leche arrastra mecánicamente los gérmenes, fácilmente eliminables, situados en los conductos galactóforos, y cada vez menos numerosos a medida que

prosigue el ordeño. Por eso es práctica general desechar las primeras porciones de leche, más cargadas de bacterias. Se ha comprobado que así se reduce la cifra de gérmenes en un 4 % por término medio. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos hallados en la leche llegan a ella durante el ordeño y la manipulación; por tanto, parece evitable en gran parte la contaminación bacteriana de la leche.

Para el análisis cuantitativo de la leche se siguen generalmente dos métodos: el de la placa de agar y el microscópico directo. También se emplean otros cuatro: el del tubo rodado, el del recuento de colonias al microscopio, el del azul de metileno y la reacción de la resazurina.

Método de la placa de agar. Consiste en preparar una serie de diluciones de leche, verter con pipeta porciones de 1 ml en una serie de platillos de Petri, mezclarlas con agar previamente fundido y enfriado a 45° C e incubar las placas a 37° C durante cuarenta y ocho horas. En el recuento de las placas influyen la temperatura y el período de incubación y el medio usado en las placas. A menos de seguir un procedimiento normalizado, no es posible comparar los resultados con los obtenidos por otros laboratorios; los que comunican Abele (1939) y varios autores más indican que una temperatura de incubación de 32° C proporciona recuentos de placas más altos que la de 37° C.

Objeciones al método de la placa. Son numerosos los reparos que se oponen a este sistema. No se comprueba la presencia de gérmenes patógenos; si éstos se desarrollan, no se pueden distinguir por su aspecto de las especies no patógenas.

El número de colonias que aparecen en las placas de agar no representa todos los microorganismos que existen en la leche, pues muchos de ellos no se desarrollan en un medio nutritivo de agar; los anaerobios no encuentran condiciones favorables para vegetar. Esto significa que ningún medio sirve para que se desarrollen todos los gérmenes viables que puede contener la leche. Una temperatura de 37° C no es la mejor para todos los microorganismos. Al agitar las muestras, no se deshacen todos los grumos o agregados de bacterias; las cadenas de estreptococos suelen quedar intactas, y se registran como una colonia única. Los recuentos de colonias representan sólo una fracción del número total de bacterias contenidas en la leche; es decir, que los recuentos en placas de agar no pasan de ser aproximados.

A causa del largo período de incubación, la leche suele consumirse antes de haberse adquirido datos sobre el número de bacterias presentes. Por otra parte, la calidad de una leche no puede determinarse a base de un recuento bacteriano, sino de una serie de ellos.

Método microscópico directo. El método oficial consiste en esparcir 0,01 ml de leche sobre una superficie de 1 cm² en un portaobjetos, dejar secar la película, eliminar la grasa, teñir la capa de leche y examinarla al microscopio.

Mallmann, Bryan y Baten (1944) simplificaron el método empleando un asa de 4 mm de diámetro exterior en vez de pipeta. El contenido del asa, extendido sobre una superficie de 4 × 8 mm, daba aproximadamente la misma densidad de leche que 0,01 ml esparcido sobre 1 cm² de superficie. El porta se sumergía luego en xilol, para eliminar la grasa, y se teñía con una solución alcohólica especial de azul de metileno acidulada con clorhídrico (Mallmann y Churchill, 1942). El empleo de un filtro Wratten M núm. E-22 entre el foco luminoso y el objeto hacía resaltar mejor el germen sobre el fondo, y revelaba microorganismos poco teñidos, no visibles con un filtro azul, ni siquiera a la luz natural.

Ventajas del método microscópico. Este método presenta varias ventajas sobre el de la placa. Los resultados se obtienen con rapidez, generalmente en quince o veinte minutos, y, como es menos laborioso, permite analizar más muestras en un tiempo igual; además, no necesita tantos elementos de trabajo. Los portaobjetos se pueden conservar de modo permanente y revisar cuando convenga, mientras que las placas tienen que examinarse y dejarse luego. De las preparaciones en portaobjetos se deducen algunos datos sobre tipos morfológicos, lo cual interesa mucho para determinar la causa del número de bacterias. El examen microscópico revela la presencia de leucocitos y otras células orgánicas en la leche; si hay exceso de los primeros, ello indica enfermedad de la glándula mamaria de la vaca. El método del porta permite una determinación cuantitativa más exacta que el de la placa.

Objeciones al método microscópico. Un serio reparo a este método es el de que no se puede aplicar a la leche pasteurizada. Los microorganismos no viables pueden retener el colorante en grado variable, según las especies contenidas en la muestra de leche, lo cual significa que las células muertas no se distinguen fácilmente de las vivas. A pesar de ello, este método proporciona importantes datos sobre el número de gérmenes presentes antes de pasteurizar.

Otro inconveniente consiste en que, si la muestra de leche no contiene muchas bacterias, el método microscópico puede ser origen de un error considerable. Como para reducir el número de bacterias por campo al de bacterias por mililitro de leche se emplea un factor grande, pequeños errores en el promedio de gérmenes por campo no suelen ser de gran importancia cuando hay numerosas bacterias en la leche; pero si contiene pocas, el error así introducido puede ser considerable, sobre todo cuando hay muchos campos sin bacterias, y algunos con un agregado o una cadena de gérmenes, es decir, cuando es grande la diferencia entre los campos.

Comparación de recuentos por los dos métodos. Los recuentos obtenidos por el método microscópico son mucho más altos que los del método de placa. Las diferencias entre las cifras de uno y otro son considerablemente mayores en muestras de número escaso que en las

de número crecido; los microorganismos en leches con cifra baja representan contaminantes externos que no se desarrollan en el agar, mientras que en las de cifra elevada son formas que se han desarrollado en ellas. Además, la leche con pocas bacterias contiene relativamente más gérmenes apelotonados que la de muchas bacterias. En general se afirma que la relación entre los recuentos microscópicos y los de placa viene a ser de 4 : 1, por término medio; esta relación suele emplearse para comparar los resultados de un método con los del otro, aunque no sea rigurosamente exacta.

Se encontrará más información sobre el método microscópico directo en Levine y Black (1948 *a*, *b*, 1949 *a*, *b*), y Watrous y Doan (1947).

Método de la plaquita de Frost. Este autor (1921) ideó un método microscópico para contar las bacterias en la leche. El método consiste en mezclar 0,05 ml de leche con agar fundido, sobre un porta esterilizado, y extender la mezcla sobre una superficie rayada de 4 cm^2. Una vez endurecido el agar, el portaobjetos se lleva a una cámara húmeda calentada a 37° C, para que los gérmenes formen colonias (generalmente en unas dos horas). Luego se seca rápidamente el porta, se tiñe con azul de metileno u otro colorante adecuado, se cuentan las colonias contenidas en varios campos bajo un microscopio contrastado y se calcula el número de microorganismos por mililitro de leche.

En opinión de Frost, su método ofrece las siguientes ventajas:

1.ª Es rápido y seguro.
2.ª Es sencillo.
3.ª Se necesitan pocos utensilios y materiales.
4.ª Los portaobjetos pueden conservarse de modo permanente.

Véase más información sobre el método de Frost en Ibamphriss.

Método del tubo giratorio. En este procedimiento se mezcla una cantidad conocida de leche con agar fundido, en un tubo de ensayo esterilizado y tapado con algodón, y se hace girar el tubo hasta que el agar se congele en las paredes. Este tubo ocupa el lugar de un platillo de Petri.

Prouty, Bendixen y Swenson (1944) han comparado los métodos del tubo rodado y de la placa, y opinan que el primero presenta indudables ventajas sobre el segundo, a saber:

Los tubos miden 153 mm de longitud por 19 mm de diámetro interno. Un estrechamiento a 2 ó 3 cm de la embocadura impide que el medio moje el algodón cuando el tubo se hace rodar rápidamente en posición horizontal. Para efectuar recuentos, los tubos se cargan con 7 ml de un medio de agar que contenga éste al 2 %, con preferencia, para darle la consistencia apropiada. Los tubos se tapan y se esterilizan, y, al ir a usarlos, se templan en un baño de agua a 45° C, se inoculan con la leche y, después de mezclar

cuidadosamente el contenido, se ruedan a una velocidad de unas 2000 r.p.m., suficiente para depositar el agar en una capa de espesor uniforme sobre la pared interior, donde se congela al poco tiempo. Los tubos se incuban luego en posición casi horizontal, con el fondo ligeramente inclinado hacia abajo, a fin de escurrir la escasa humedad que puede acumularse y originar diseminaciones en la superficie del agar. Después de incubar, el recuento de colonias se facilita empleando una lente montada en un cilindro de metal que se desliza por fuera del tubo de agar.

Ventajas del método:

1.ª Los tubos no están tan expuestos a romperse, ocupan menos espacio y se manejan más fácilmente que las placas de Petri.
2.ª Los tubos pueden llenarse con agar y tenerse prevenidos en la nevera para uso inmediato.
3.ª Se necesita menos espacio en la estufa.
4.ª El peligro de contaminación es menor que con las placas.

Inconvenientes del método:

1.ª Se requiere un aparato especial de motor para hacer girar los tubos.
2.ª La frecuencia de diseminación de colonias tiende a ser mayor que con cultivos en platillos de Petri.
3.ª El recuento de colonias es más difícil que en las placas.

Galesloot (1947 *a*) realizó ensayos comparativos por los métodos del tubo giratorio y de placa de agar corriente con leche pasteurizada, y deduce: 1.º, que aquél da siempre cifras más bajas que el de placa, y 2.º, que algunas especies presentes en la leche no se desarrollan por el método del tubo giratorio. Por eso encuentra preferible la técnica de la placa de agar a la del tubo.

Reducción de azul de metileno (reacción de la reductasa). El azul de metileno actúa como un pigmento respiratorio cuando se introduce en cultivos de bacterias. Funciona con las deshidrogenasas para producir una oxidación intracelular por eliminación de hidrógeno, que retiene, reduciéndose al compuesto incoloro o leucobase. La velocidad de decoloración del colorante indica la rapidez de la oxidación. La reacción debe efectuarse en un ambiente anaeróbico, pues la presencia de aire reoxida pronto el azul de metileno a su forma de color (pág. 353).

Este colorante es útil para adquirir una idea rápida acerca de la calidad de la leche. La velocidad de decoloración depende del número de microorganismos presentes. La prueba se puede emplear para determinar por aproximación el número de bacterias contenidas en una muestra de leche; el método es rápido, y se realiza fácilmente con un mínimo de gastos. Sirve sobre todo para examinar con rapidez series grandes de muestras a fin de determinar si la leche recibida por empresas abastecedoras reúnen los requisitos que prescribe la ley.

El resultado de la prueba se expresa por el tiempo necesario para que desaparezca el color del azul de metileno al incubar a 37° C. En

ciertas condiciones, el color azul no desaparece por igual, y entonces se toma el punto final como tiempo requerido para que la leche no muestre color azul después de mezclarla.

No siempre hay acuerdo entre el tiempo de reducción del azul de metileno y el recuento en placa de agar, por los siguientes motivos: 1.º, algunos microorganismos no vegetan en agar nutritivo; 2.º, a veces se cuenta un agregado de gérmenes como una sola colonia, y la rapidez de decoloración es efecto de la acción combinada de todos los miembros de la masa; 3.º, no todos los microorganismos decoloran el azul de metileno con la misma velocidad, y 4.º, la prueba se hace menos exacta al aumentar el tiempo de reducción, y la leche recién ordeñada requiere al menos diez horas para decolorar el azul de metileno.

Morris (1943) informó que las muestras de leche contenían con frecuencia gérmenes coliformes que reducían azul de metileno muy despacio a 37° C. Esta reducción lenta resultó ser obra de dos factores presentes en la leche cruda, y que se destruyen calentando a 70° C durante una hora; una substancia bactericida específica y un factor auxostático.

A base del tiempo de reducción del azul de metileno, la leche se clasifica como sigue:

Clase 1.ª Leche excelente; no se decolora en ocho horas.
Clase 2.ª Leche buena; se decolora en menos de ocho horas, pero no en menos de seis horas.
Clase 3.ª Leche regular; se decolora en menos de seis horas, pero no en menos de dos horas.
Clase 4.ª Leche mala; se decolora en menos de dos horas.

Reacción de la resazurina. Introdujeron esta prueba Pesch y Simmert (1929). Posteriormente ha sido modificada y adoptada por el Ministerio de Agricultura (Inglaterra), como método rápido para determinar la calidad de la leche.

La resazurina (diazoresorcinol) es un indicador con pH comprendido entre 3,8 y 6,5. Con pH de 6,5 y más, su color es púrpura, y con el de 3,8 o menos, anaranjado. El colorante puede ser reducido por bacterias, y esto permite utilizarlo para calcular el número de ellas en la leche; cuanto mayor sea este número, tanto más rápida será la reducción. La reacción tarda muy poco, y resulta económica; sirve particularmente para descubrir infecciones en las ubres (mastitis).

La prueba se realiza como sigue: Se mezcla bien la muestra de leche y se ponen 10 ml en un tubo de ensayo de 1,6 × 15 cm. Se añade a la leche 1 ml de solución de resazurina al 0,005 % (1:20.000), y el tubo se invierte dos veces despacio, para mezclar bien; luego se lleva a un baño de agua a 37,5° C y se examina, cada quince minutos, por espacio de una hora. El color de la leche debe compararse con una serie de

discos patrón preparados con tal objeto; si se mantiene azul o lila (disco 6 ó 5) durante una hora, el índice bacteriano de la leche es normal; si vira a malva o malvarrosa (discos inferiores al 5), la leche contiene muchas bacterias, y debe considerarse anormal, y muy anormal si el color corresponde a un disco menor de 3 en media hora. Cuando la resazurina se reduce por completo (disco 0) en una hora o menos, la leche contiene muchas células de pus, y probablemente abunda en gérmenes de mastitis.

Para más información, consúltese Abele (1945), Davis (1943), Davis, Newland y Knuckey (1943), Davis y Watson (1943, 1946), Erskine, Fischer, Smith y Davis (1943), Galesloot (1948, 1949), Watson, Bessell, Goldschmidt y Davis (1946).

CLASIFICACIÓN DE LA LECHE

El número de microorganismos tolerable en las distintas clases o calidades de leche varía considerablemente; pues depende de normas fijadas por las autoridades locales de Sanidad.

La mejor calidad de leche se conoce por leche «certificada», cuya producción, recogida y distribución se vigila continuamente, y que se obtiene conforme a normas y disposiciones formuladas por Comisiones médicas especiales constituídas en diversas localidades de los Estados Unidos. Tales normas y preceptos se refieren a la limpieza de establos y lecherías, calidad del agua de abrevar, esterilización de los utensilios empleados al manipular la leche, examen periódico de las vacas para descartar la tuberculosis u otras enfermedades y reconocimiento de ordeñadores y otras personas que intervengan en el manejo de la leche. En las lecherías «certificadas» no se permite que trabajen personas aquejadas de afecciones contagiosas o portadoras de los gérmenes respectivos.

La leche recogida en condiciones no vigiladas con tanto rigor se clasifica en categorías o calidades A, B y C, basadas en el recuento bacteriano de la leche y en las condiciones higiénicas de su obtención. Las normas a que se ajustan las diversas clases aquí mencionadas son las establecidas por la U. S. Public Health Service Milk Ordinance (1939), como sigue:

Leche cruda «certificada». Es leche cruda ajustada a los requisitos de la American Association of Medical Milk Commission vigentes en la época de producción. Estos requisitos varían según las localidades, pero lo normal es que la cifra de gérmenes no exceda de 10 000 por mililitro; si la leche contiene más de este número, se incluye en una de las calidades siguientes.

Leche cruda, clase A. El recuento bacteriano medio en placa no debe rebasar 50 000 por mililitro, y el microscópico directo no pasará de 50 000, si se cuentan los agregados, o de 200 000, si se cuentan los gérmenes individuales; o bien dará un tiempo medio de reducción no inferior a ocho horas.

Si no está pasteurizada, los límites correspondientes son 200 000, 200 000 y 800 000 por mililitro y seis horas, respectivamente. Ha de producirse en granjas lecheras ajustadas a un mínimo de requisitos sanitarios. (Véanse detalles en U. S. Public Health Service Milk Ordinance.)

Leche cruda, clase B. Es la que no se ajusta a las normas bacterianas y/o a las de la prueba del aborto fijadas para la leche cruda de clase A, pero sí a las restantes, y da un recuento bacteriano medio en placa no mayor de 1 000 000 por mililitro, o un recuento microscópico directo medio no mayor de 1 000 000 si se cuentan agregados, o de 4 000 000, si se cuentan los gérmenes individuales, o un tiempo medio de reducción no inferior a tres horas y media.

Leche cruda, clase C. Esta es la leche cruda que no se ajusta a ninguno de los requisitos establecidos para la leche de clase B.

Leche pasteurizada «certificada». Es la leche cruda «certificada» que ha sido pasteurizada, refrigerada y embotellada en una instalación conforme a los requisitos formulados para la leche pasteurizada de clase A.

Leche pasteurizada, clase A. Es la leche cruda de igual clase, pasteurizada, refrigerada y embotellada en un establecimiento, conforme a los preceptos de los Milk Ordinance and Code (1939), y cuyo recuento bacteriano medio en placa no exceda de 30 000 por mililitro en ningún momento después de la pasteurización y hasta su entrega al consumidor.

Leche pasteurizada, clase B. Es la leche pasteurizada que no se ajusta a las normas bacterianas fijadas para la pasteurizada de clase A, o a las de empleo de cápsulas de reborde o al requisito de utilizar leche cruda de clase A, pero sí a las demás condiciones señaladas para la pasteurizada de clase A; que se haya obtenido de leche cruda no inferior a la de clase B, y dé, entre la pasteurización y la expendición, un recuento bacteriano medio en placa no mayor de 50 000 por mililitro.

Leche pasteurizada, clase C. Es leche pasteurizada que no se ajusta a ninguno de los requisitos señalados para la pasteurizada de clase B.

La toma de muestras para análisis bacteriológicos está confiada a inspectores u otros funcionarios o personas autorizadas. Se recogen, por lo menos, 10 ml de leche o nata bien agitadas, y se ponen en un frasco de muestras esterilizado, de dimensiones apropiadas para que la muestra ocupe sólo alrededor de 2/3; así queda suficiente cámara de aire para poder agitar bien y conseguir una suspensión de gérmenes con enturbiamiento uniforme antes de preparar las placas. Hasta entonces, la muestra se conservará a menos de 50° F (10° C). El recuento medio de bacterias en placas se expresa por el promedio logarítmico de los de las últimas cuatro placas consecutivas tomadas en días distintos.

Por qué se clasifica la leche. Según el U. S. Public Health Service, es opinión muy difundida la de que el recuento de bacterias de la leche constituye un índice de su calidad sanitaria. Una cifra elevada de gérmenes no significa necesariamente que haya microorganismos patógenos, y una cifra baja tampoco garantiza que no los haya; pero la abundancia de bacterias quiere decir que la leche procede de ubres enfermas, o se ha ordeñado o manipulado en condiciones impropias, o se ha conservado a temperatura bastante alta para que se desarrollen bacterias. En los dos primeros casos, esto aumenta las probabilidades de infección, y en el último, cualquier infección que haya llegado a la

leche se ha dejado desarrollar en proporciones peligrosas. Por consiguiente, un recuento elevado expresa una mayor probabilidad de transmisión de enfermedades.

Por otra parte, debe evitarse toda interpretación equivocada de la importancia de una cifra baja de bacterias, porque puede obtenerse leche en estas condiciones de vacas tuberculosas, o bien pasa por manos de portadores de bacilos tíficos, o se manipula en condiciones de limpieza algo dudosa.

Éste es el fundamento de la práctica sanitaria de clasificar la leche a base del recuento de bacterias o de la prueba de la reductasa.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE

El número de microorganismos que la leche contiene al principio depende del cuidado puesto en su obtención y recogida. En la leche almacenada, de no hacerlo a bajas temperaturas, el número de microbios aumenta con rapidez. De la temperatura a que se conserve dependen en gran parte la cifra de bacterias y la microflora de la leche.

TABLA 37. — EFECTO DEL CALOR SOBRE EL PODER GERMICIDA DE LA LECHE

Temperatura a que se calentó la leche durante 30 minutos antes de inocularla	Recuento inmediato por ml	Recuento por ml después de cuatro horas a 37°C
Cultivo núm. 1: 52° C	1 328 000	1 000
53° C	848 000	40 000 000
Cultivo núm. 2: 52° C	316 000	31 000
53° C	640 000	28 000 000

Propiedad germicida de la leche. La leche recién ordeñada contiene substancias dotadas de actividad bactericida; el calor las destruye, pero las temperaturas necesarias varían según los gérmenes.

Morris (1945) ha calentado leche cruda a temperaturas de 52 y 53° C durante treinta minutos y sembrado luego en las muestras un cultivo joven de microorganismos coliformes. Efectuados recuentos en placa inmediatamente después de inocular y después de conservar la leche a 37° C durante cuatro horas, se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla 37, de los cuales parece desprenderse que las substancias bactericidas se destruyen por completo calentando la leche a 53° C durante treinta minutos, y que tal destrucción se produce con precisión de 1° C.

Para muchos microorganismos, por lo menos, la pasteurización a baja temperatura apenas contrarresta la propiedad bactericida de la leche. En el método de fulguración o de alta temperatura, esa propiedad puede quedar anulada considerablemente.

En resumen, esto significa que las bacterias aumentan más aprisa en leche muy caliente que en leche cruda o calentada a bajas temperaturas.

Leche congelada. Si se conserva leche por debajo de su punto de congelación (—55° C), no se reproducen los microorganismos, ya que la congelación es general y no disponen de substancias nutritivas. La leche así tratada contiene menos bacterias que al principio; si se congela poco a poco, precipita gradualmente la caseína, y se destruye en el acto la emulsión grasa. Al restituirla a la temperatura ambiente, sobre todo después de permanecer congelada por algún tiempo, no recupera su consistencia normal.

Leche fría. Si la leche cruda, o la pasteurizada a temperaturas inferiores a 70° C, se conserva entre 0 y 5° C durante veinticuatro horas, disminuye la cifra de recuento en placa. Después de un lapso aproximado de una semana, esa cifra rebasa la inicial, y a la vez aumenta el número de los gérmenes capaces de licuar gelatina, hasta hacerse enorme. Algunos de estos gérmenes son acidógenos, otros neutros, y los hay enérgicamente proteolíticos.

Esto va seguido de descomposición proteínica y putrefacción de la caseína. En tal estado, la leche puede contener catabolitos tóxicos que la hacen no sólo inaprovechable para el consumo humano, sino también peligrosa. La leche y la nata se conservan generalmente a 0° C, pero no debe exceder de diez días el plazo de conservación a tal temperatura, por las razones mencionadas.

La flora bacteriana de la leche conservada a distintas temperaturas es la siguiente:

De 0 a 5° C. Predominan las bacterias fluorescentes, entre ellas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus fluorescens.*

De 5 a 10° C. Bacterias fluorescentes, *Proteus vulgaris,* especies de *Micrococcus,* microorganismos alcalígenos, como *Alcaligenes viscosus, A. marshalli* y *A. albus.*

De 10 a 15° C. *Streptococcus agalectiae. S. cremoris, S. faecalis, S. lactis, S. acidominimus, S. liquefaciens* y *Aerobacter aerogenes.*

De 15 a 30° C. Estreptococos, especialmente *S. lactis.*

De 30 a 40° C. *Escherichia coli, Aerobacter aerogenes,* bacilos productores de ácido láctico, como *Lactobacillus caucasicus, L. lactis, L. helveticus, L. bulgaricus, L. thermophilus, L. casei, L. plantarum, L. leichmannii, L. brevis, L. fermenti* y algunos estreptococos.

De 40 a 50° C. Bacilos productores de ácido láctico, entre ellos *Lactobacillus caucasicus, L. lactis, L. helveticus, L. bulgaricus, L. thermophilus, L. fermenti, Streptococcus faecalis, S. thermophilus,* y levaduras.

A un recuento inicial menor en placa corresponde un tiempo mayor para que la leche se agrie. Como ya hemos indicado, las bacterias fluorescentes del suelo se pueden multiplicar a temperaturas del orden de 0° C. Si la leche se ha de conservar por algún tiempo, tiene que congelarse; a temperaturas algo más altas se desarrollan gérmenes del grupo *Proteus,* y en la leche se acumulan entonces substancias putrefactivas.

Rara vez se coagula la leche conservada a menos de 10° C. Por encima de esta temperatura se forma un coágulo a los pocos días, por la acción combinada de la renina y de microbios acidógenos. A 20° C, la flora bacteriana se compone de un 90 % de estreptococos, lo cual se traduce en una coagulación rápida de la leche; la acidez producida basta para detener el desarrollo de la mayoría de los demás microorganismos que pueda contener. A más de 30° C, predominan los bacilos capaces de originar concentraciones aún mayores de ácido láctico; esta zona de temperatura es también la más favorable para la vegetación de anaerobios productores de ácido butírico.

Los microorganismos aerobios crecen mejor cerca de la superficie de la leche, donde abunda el oxígeno disuelto. Cerca del fondo predominan los anaerobios y el *S. lactis,* lo cual indica que la coagulación espontánea de la leche se inicia en el fondo.

Para información adicional, véase Abd-el-Malek y Gibson (1948 *a,* b).

MICROORGANISMOS COLIFORMES EN LA LECHE

Se conocen algunos casos de aislamiento de microorganismos coliformes de la leche tomada directamente de la ubre. Sin embargo, esto no es lo corriente; para todos los fines prácticos, la leche normal que sale de las ubres de la vaca se halla totalmente libre de tales bacterias.

La presencia de *Escherichia coli* en la leche suele ser efecto de contaminación fecal. En cuanto al *Aerobacter aerogenes,* dado que se encuentra en el agua, el suelo, el heno, los granos y otros forrajes que consume el ganado vacuno, su presencia en la leche no indica forzosamente contaminación fecal. Cuando la leche sale de la granja, casi siempre contiene gérmenes del grupo coliforme, por mucho cuidado que se ponga en su obtención. En condiciones de razonable esmero, la leche cruda lleva menos de 100 microorganismos coliformes por mililitro; si hay negligencia, este número puede elevarse hasta 2000. Se ve, pues, que no hay medio de impedir la existencia de un número variable de estos gérmenes en la leche y la nata.

Según hemos visto ya (cap. XXI), la investigación del *E. coli* en el agua es un procedimiento normal para determinar la salubridad de una

canalización. En cambio, es discutible que deba hacerse otro tanto para dar por buenos los productos lácteos, pues se han encontrado capas de *E. coli* resistentes a la pasteurización. Los microbios se desarrollan rápidamente después de pasteurizar, de no conservarse la leche a una temperatura muy baja. Por tanto, el hecho de encontrar algunas bacterias coliformes en las condiciones corrientes del mercado no indica necesariamente que la leche no se haya pasteurizado bien. De todos modos, la presencia de un número elevado de estos gérmenes inmediatamente después de pasteurizar revela que la leche no se calentó a 63° C durante treinta minutos, o que se ha contaminado por el personal o los utensilios empleados. En tales condiciones, la investigación de la *E. coli* es conveniente como medida de comprobación.

Los métodos seguidos para identificar en la leche los microorganismos productores de gases son análogos a los que sirven para el análisis bacteriológico del agua (pág. 561).

Sackett y Gralak (1950) no han encontrado correlación entre el recuento corriente en placa y el de bacterias coliformes en la leche cruda. Una cifra baja en placa no significa siempre que la leche cruda contenga pocos gérmenes coliformes, y un recuento elevado en placa denota lo contrario; en otras palabras, tal recuento nada dice respecto a la cifra de bacterias coliformes. Como la leche pasteurizada puede contener, a pesar de ello, un número excesivo de esos gérmenes, los citados autores creen que un recuento de los mismos es una indicación más consecuente de las condiciones sanitarias de la leche, y que debe practicarse habitualmente con todas las muestras de la pasteurizada.

LECHE FILAMENTOSA O MUCILAGINOSA

Son varios los microorganismos capaces de producir en la leche una alteración conocida por viscosidad. La leche se vuelve filante o espesa, y puede estirarse en largas hebras; unas veces, la modificación es muy ligera, y otras, la consistencia filamentosa puede ser tan pronunciada, que se puede estirar la leche en hilos de un metro o más de longitud.

Esta anomalía no se manifiesta inmediatamente cuando la leche se obtiene o manipula a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas de la incubación. Un abastecedor de leche no se entera de que se ha vuelto filamentosa hasta después de haberla suministrado a los clientes.

Entre los diversos microorganismos que alteran la leche de este modo, la especie más importante es acaso el *Alcaligenes viscosus*, que alcanza su máxima actividad en este sentido a una temperatura de 18 a 20° C, en virtud de la formación de material capsular. El mucilago es un carbohidrato gomoso, aunque parece entrar también en su composición algo de proteína. Un estudio microscópico de la leche revela la presencia de células dispersas incluidas en una masa de material capsular.

El *Alcaligenes viscosus* es un bacilo pequeño, corto, casi esférico, que aparece aislado, en parejas o en cadenas de escasa longitud; las células son gramnegativas, rara vez grampositivas. El microorganismo produce viscosidad y una película, consecuencia de su carácter aeróbico; esto explica por qué la viscosidad se observa a menudo sólo en la capa cremosa. Da reacción básica, sin coagular la caseína.

Algunos gérmenes del grupo *Escherichia-Aerobacter* son causa del estado filamentoso de la leche; la mayoría de las cepas son incapaces de producirlo, pero en ocasiones se encuentra alguna que forma cápsulas intensamente. El *A. aerogenes* se encuentra probablemente con más frecuencia que la *Escherichia coli.*

Otro microorganismo aislado a veces de leche filamentosa es el *Micrococcus cremoris-viscosi,* que provoca una coagulación ácida seguida de peptonización y gelatinización aparente, y se desarrolla mejor a 30° C.

Se encuentran comúnmente gérmenes que hacen viscosa la leche en charcas, pozos y aguas corrientes. El agua de tales procedencias introduce los gérmenes en los utensilios y el material de las lecherías. Una vez producida la contaminación, es de suma importancia eliminar las bacterias lo antes posible, si se quieren evitar pérdidas de consideración. Hay que esterilizar todos los utensilios y aparatos que entran en contacto con la leche. Los establos se limpiarán y desinfectarán escrupulosamente, y los flancos de las vacas se frotarán con un trapo impregnado de un desinfectante adecuado. Los microorganismos que producen viscosidad se destruyen de ordinario en uno de los procesos de pasteurización, pero a veces surgen brotes en la leche pasteurizada, por haberse contaminado del material de la instalación después de tal proceso.

En la fabricación de quesos se han empleado microorganismos productores de ácido láctico, pero esta práctica se ha abandonado hace ya tiempo, por ser difícil separarlos del queso. La presencia de los microorganismos en la nata se traduce también en un rendimiento escaso de manteca. La propiedad de formar mucilago parece extinguirse cuando se cultivan los gérmenes a elevadas temperaturas; y a la inversa, algunas bacterias que ordinariamente no hacen viscosa la leche, adquieren tal aptitud si se cultivan a temperaturas más bajas.

EL «CLOSTRIDIUM PERFRINGENS» EN LA LECHE

El *Clostridium perfringens (welchii)* es un microorganismo anaerobio esporíparo muy difundido en la Naturaleza. Se encuentra en el conducto intestinal del hombre y de los animales, en el suelo, en peces y moluscos, en la leche, el queso, el agua, etc. En el suelo es muy

abundante. Se considera como el factor etiológico más inportante de la gangrena gaseosa.

Se presenta en forma de bacilos cortos y gruesos, sueltos, apareados, y menos veces en cadenas cortas; son inmóviles, encapsulados y gramnegativos, y tienen esporas grandes, ovales, con localización central o subterminal.

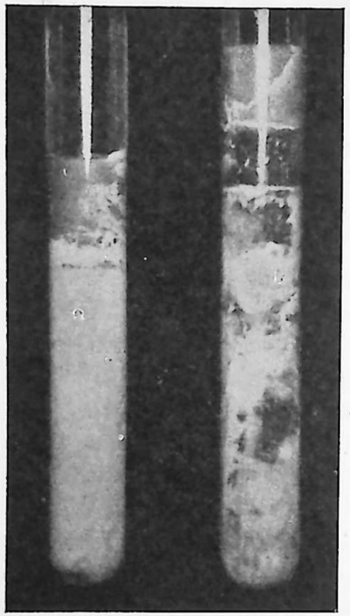


Fig. 189. — Fermentación tumultuosa de la leche. Izquierda, fermentación de una muestra de leche exenta de *Clostridium perfringens*; derecha, fermentación de una muestra de leche con *Cl. perfringens*. El cierre de vaspar es rechazado hacia arriba por la presión de los gases, y el coágulo está acribillado de burbujas.

Es un germen intensamente sacarolítico, capaz de fermentar todos los azúcares corrientes y de producir ácidos y abundantes gases; en la leche provoca una fermentación tumultuosa característica (figura 189). El coágulo se desgarra por efecto de la vigorosa fermentación y el desprendimiento de gases; en tal estado no resultan atacadas las proteínas de la leche.

Como estos microorganismos se hallan en el contenido intestinal de las vacas, la presencia del *Cl perfringens* en la leche suele ser indicio de contaminación por los excrementos

LECHE COLORADA

Se han aislado varios microorganismos capaces de alterar el color de la leche. Estos cambios se presentan sólo a veces, y no tienen gran importancia económica.

Muchos microbios aislados de la leche dan origen a colonias de color, pero éstas no deben confundirse con las de gérmenes capaces de elaborar en la leche brillantes colores. Los microorganismos cromógenos suelen ser señaladamente aerobios, por lo que la formación de pigmentos en la leche se observa primero en su capa superficial.

Leche azul. La leche toma color azul a causa del desarrollo de un microorganismo pigmentado, el *Pseudomonas syncyanea,* microbio fluorescente, capaz de dar coloración gris a la leche neutra o alcalina. En presencia de ácido, el color gris vira a azul; por consiguiente, para que esto ocurra, han de existir a la vez gérmenes acidógenos, como el *Streptococcus lactis*. El mencionado microbio se desarrolla sobre todo a unos 25° C.

Leche roja. La vegetación de *Serratia marcescens* produce en la leche una coloración roja. Éste es un pequeño cocobacilo que se presenta suelto, y a veces en cadenas cortas; sus células son móviles y gramnegativas, y en la leche producen una reacción ácida, a la vez que forman un coágulo blando. Como la producción de pigmento es mayor en presencia de abundante oxígeno, el color rojo aparece primero en la superficie. La temperatura óptima de desarrollo de este germen es de unos 25° C.

Leche amarilla. El *Pseudomonas synxantha,* cuando se desarrolla en la leche, origina un pigmento amarillo canario, y fermenta despacio lactosa, con lo que se coagula la caseína. Como la fermentación lenta no se traduce en ahorro de proteínas, la caseína resulta atacada y peptonizada. Los productos alcalinos de la peptonización son suficientes para neutralizar la primitiva acidez y hacer la leche alcalina y filante. El microorganismo se desarrolla mejor a unos 30° C.

Bacterias psicrófilas en la leche. A veces se encuentran en la leche y los productos lácteos bacterias psicrófilas o amantes del frío. Estos microorganismos crecen a temperaturas de refrigeración (alrededor de 5° C), y pueden ocasionar defectos en la leche y la nata, con las consiguientes pérdidas para los granjeros.

Los gérmenes que se desarrollan a temperaturas de refrigeración han resultado ser miembros de los géneros *Achromobacter, Alcaligenes, Flavobacterium* y *Pseudomonas*. Estos microorganismos se han aislado del suelo, las camas, el agua, los utensilios de granja y el pienso, lo cual explica su presencia en la leche; raras veces resisten a la pasteurización, pero pueden introducirse en productos pasteurizados por intermedio del material no estéril. La refrigeración subsiguiente, entre 4,5 y 10° C, de los lotes así contaminados, produce amargor y diversos otros defectos que hacen desagradable la leche.

Véase más información en Erdman y Thornton (1951 *a*, *b*).

INFECCIÓN POR LA LECHE

La leche es un excelente medio de cultivo para una gran variedad de microorganismos. Tanto los patógenos como los saprófitos, no sólo permanecen viables largo tiempo, sino que hasta se pueden reproducir en ella. Por eso es difícil obtener leche pura y conservarla en tal estado. La prevención de infecciones transmitidas por la leche constituye uno de los problemas sanitarios más importantes.

De la leche se han aislado gérmenes patógenos de origen bovino y humano. Antes de conocerse bien el problema, eran muchas las epidemias graves ocasionadas por el consumo de productos lácteos infectados,

lo cual no es de extrañar, teniendo en cuenta su enorme volumen diario. Aun hoy se propagan epidemias por medio de la leche, pero son contadas, en comparación con las registradas en los primeros años de la Sanidad oficial.

Los cambios anormales que ocurren en la leche se perciben fácilmente por su aspecto, sabor y olor, aunque ello no basta para comprobar la presencia de bacterias patógenas. La leche que las contiene presenta aspecto normal, y no despierta sospechas en el consumidor. Estos microorganismos patógenos pueden proceder de vacas enfermas o de las personas que recogen y manipulan la leche.

Enfermedades de origen bovino. Entre los gérmenes patógenos de origen bovino que se encuentran en la leche se cuentan el *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, el *Streptococcus agalactiae*, la *Brucella abortus* y el virus de la glosopeda.

Tuberculosis. La tuberculosis bovina se ha eliminado prácticamente en Norteamérica, pero sigue siendo común en Europa y en otras partes del mundo. El microorganismo de esta enfermedad es muy similar por su aspecto a la variedad más frecuente en lesiones humanas. Las personas adultas no son muy sensibles a la infección por el referido germen, pero los niños, en particular los menores de cinco años, se pueden contagiar bebiendo leche cruda de vacas tuberculosas. Si las ubres están infectadas, no es posible evitar que contamine la leche.

Cuando las vacas sufren de tuberculosis pulmonar, degluten los esputos, en vez de expectorarlos, con lo que aparecen los microbios en los excrementos. Como la mayor parte de la leche contiene algo de materia fecal, es probable que albergue tales microorganismos; no es seguro que se multipliquen en ella, pero lo cierto es que sobreviven y conservan su virulencia durante largo tiempo.

El germen de la tuberculosis no se encuentra regularmente en el sistema circulatorio, pero puede tener acceso al mismo en ciertas condiciones. En tales casos, a veces se observa en la leche, sin haber originado lesiones apreciables en las ubres.

Mastitis. Esta enfermedad consiste en una inflamación de las ubres, y la producen diversos microorganismos. Sin embargo, el que con más frecuencia la produce es el *Streptococcus agalactiae*, que se encuentra en las ubres de casi todas las vacas lecheras. Suele permanecer latente, sin originar flogosis; tarde o temprano puede iniciarse una infección activa, que se traduce en inflamación (Breed, 1943). Si la mastitis es grave, la leche contiene a veces pus y sangre; cuando hay en ella un número apreciable de gérmenes y corpúsculos sanguíneos, debe considerarse inadecuada para el consumo humano. Todos los gérmenes relacionados con la mastitis sucumben a la pasteurización.

Fiebre ondulante. Otro microorganismo patógeno que a menudo se halla en la leche de vaca es la *Brucella abortus*, causa de aborto

contagioso en este animal. El microbio puede producir el mismo efecto en yeguas, ovejas, conejas y cobayas; de carácter similar son la *B. melitensis* de las cabras y la *B. suis* de las marranas. La *B. melitensis* puede infectar a las vacas y ser excretada con la leche; la *B. suis* produce aborto en la cerda, y con frecuencia ataca a las especies caballar y canina, a vacas, monas y animales de experimentación.

Estos tres microorganismos son patógenos para el hombre, y producen la enfermedad conocida por fiebre de Malta, así denominada por su carácter endémico secular en la isla mediterránea de ese nombre, donde la padecen las personas que beben leche contaminada de cabra. Actualmente se suele llamar fiebre ondulante o brucelosis, por haber sido Bruce quien primero aisló los gérmenes en un caso mortal de la dolencia.

La fiebre ondulante se puede contraer al beber leche cruda, y, con menos frecuencia, leche certificada. La leche pasteurizada debe ser inofensiva, puesto que el calor destruye los microbios; por eso, muchas autoridades sanitarias propugnan la pasteurización de toda la leche antes de entregarla a los consumidores.

Glosopeda. La glosopeda es una enfermedad vírica de los animales domésticos, muy contagiosa. Produce fiebre, trastornos digestivos y una erupción vesicular en las mucosas bucales y en la piel entre los pesuños, así como en las ubres y pezones de la vaca; desde las vesículas, el virus puede llegar a la saliva, la orina, las heces y la leche.

En el ganado, este virus ocasiona una mortalidad muy elevada. La infección se puede transmitir al comer y beber en abrevaderos, pesebres, y en los vagones de transporte, etc. En el hombre, el índice de mortalidad es bajo, pues la afección sigue un curso benigno.

Enfermedades de origen humano. Algunas de las dolencias procedentes del hombre y propagadas por la leche son: fiebre tifoidea, escarlatina, difteria, amigdalitis, diarrea infantil y parálisis infantil. Los microbios pueden llegar a la leche procedentes de las manos contaminadas del personal, o por gotitas expelidas al toser, estornudar o hablar; al humedecerse las manos con saliva durante el ordeño, y de otros distintos modos.

Fiebre tifoidea. Muchas epidemias de fiebre tifoidea ocurridas en años recientes han tenido su origen en el consumo de leche contaminada. Las investigaciones consecutivas han revelado generalmente que sólo un establecimiento había propagado la infección; los gérmenes se introdujeron en la leche por intermedio de un portador de bacilos tíficos, o bien había habido un caso ignorado de tifus abdominal entre el personal de la lechería. El aislamiento del individuo causante basta para que cesen de presentarse nuevos casos de fiebre tifoidea. Estas epidemias no sólo se propagan por la leche, sino también, aunque en menor grado, por helados, quesos y mantequilla.

Escarlatina y amigdalitis infecciosa. Ambas enfermedades son probablemente efecto del *Streptococcus pyogenes*, germen productor de pus. El consumo de leche que contenga este microbio puede desencadenar epidemias; a veces, la contaminación es obra del hombre, o deriva de las ubres infectadas de las vacas. Por lo general, un ordeñador escarlatinoso o aquejado de anginas transporta los gérmenes a las ubres con las manos sucias, y aquéllos se reproducen con rapidez en la leche; también es posible una contaminación desde abscesos que se formen en las ubres. La leche infectada ocasiona a veces amigdalitis o escarlatina en personas que la beban cruda.

Difteria. La difteria se difunde sobre todo por contacto directo con focos humanos, ya mediante casos activos de la enfermedad, ya con el concurso de portadores de gérmenes.

El personal de lecherías puede asimismo diseminar los microorganismos en la leche. Aunque los brotes de difteria transmitida por la leche son relativamente insólitos, se han comprobado algunos como originados por personal enfermo de lecherías.

Véase más información en Smith (1950).

PASTEURIZACIÓN DE LA LECHE

La destrucción de todos los microorganismos contenidos en la leche se llama «esterilización». La temperatura relativamente alta que ésta requiere comunica a la leche sabor de cocida, no tan agradable como el de la cruda; y además, el calentamiento a elevada temperatura puede ocasionar una reducción del contenido en vitaminas. Estos dos inconvenientes se soslayan en gran parte calentando la leche a temperaturas inferiores a las requeridas para esterilizarla por completo, pero suficientes para destruir todos los gérmenes patógenos.

Esta destrucción de microorganismos patógenos y de la mayoría de los otros en la leche, sin recurrir a la esterilización completa, se conoce por «pasteurización». Según el U. S. Public Health Service.

> Los términos «pasteurización», «pasteurizado» y otros similares se han de entender referidos al procedimiento de calentar cada partícula de leche o productos lácteos por lo menos a 143° F (62° C), y mantener tal temperatura no menos de treinta minutos, o por lo menos a 160° F (71° C), por espacio de quince segundos o más, en vasijas y aparatos autorizados y debidamente manejados. No obstante, nada en esta definición se ha de estimar contrario a cualquier otro procedimiento que haya resultado ser asimismo eficaz y esté autorizado por las autoridades sanitarias.

Durante la pasteurización, la leche deberá agitarse constantemente para impedir que levante espuma, pues ésta forma una capa protectora

alrededor de muchas bacterias, al impedir la penetración de calor. La reacción de la leche debe ser neutra en lo posible; si es ácida, puede coagularse la caseína en el curso del calentamiento.

Gibson y Abd-el-Malek (1940, 1941), y Abd-el-Malek (1943), han comprobado que la microflora de la leche certificada consiste casi por entero en *Streptococcus (S. lactis, S. agalactiae), Micrococcus* y *Microbacterium*, aparte *Pseudomonas fluorescens* en alguna muestra eventual. Después de pasteurizar, queda reducida a *Microbacterium* y a un corto

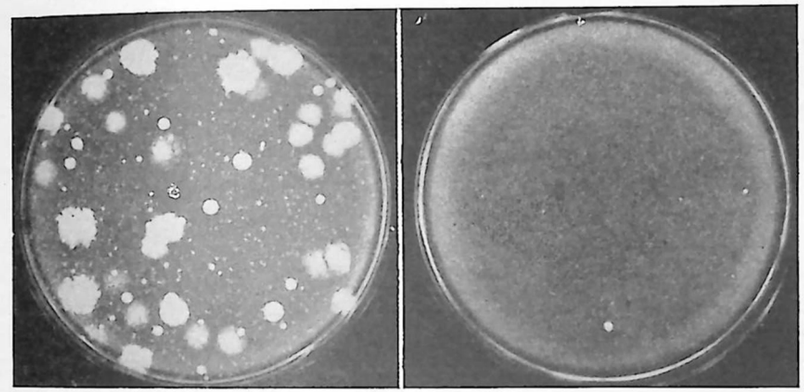


Fig. 190. — Pasteurización de la leche. Izquierda, 1 ml de una dilución 1: 10 de leche, antes de calentar; derecha, 1 ml de una dilución 1:10, después de calentar.

número de *Micrococcus* en ciertas muestras; los estreptococos desaparecen. En la leche obtenida sin el necesario cuidado, los principales gérmenes que sobreviven al tratamiento son *Streptococcus, Microbacterium* y *Micrococcus*, por este orden. Los gérmenes de otros grupos son poco importantes en la leche pasteurizada, a menos que se introduzcan en la instalación; la presencia en ella de numerosos *Microbacterium* pasaba antes inadvertida porque estos gérmenes no se desarrollaban en placas de agar incubadas a 37° C.

La pasteurización reduce la cifra de bacterias en un 90 a 100 % (figura 190), según las clases y números de las presentes al aplicar calor.

Bacterias termodúricas en la leche. Las bacterias que vegetan mejor a temperaturas entre 25 y 40° C se califican de mesófilas. Algunas de estas formas son capaces de sobrevivir a la pasteurización, tanto a temperatura alta como baja, y se conocen por termodúricas o termorresistentes.

Las más comunes se encuentran en los géneros *Micrococcus, Streptococcus, Sarcina* y *Bacillus*. Algunas del género *Microbacterium* contenidas a veces en la leche cruda se cuentan entre las bacterias asporógenas más termorresistentes que se conocen.

En ocasiones hay bacterias termodúricas en ubres infectadas, y

pasan a los cubos, latas, máquinas de ordeñar y otros utensilios utilizados en lecherías. A menos de esterilizar bien estos elementos cada vez que se manejen, continuarán contaminando cada nuevo lote de leche. Deben adoptarse rigurosas precauciones sanitarias en la granja y en la lechería para evitar que se introduzcan en la leche microorganismos termodúricos.

Bacterias termófilas en la leche. Otro grupo de bacterias termorresistentes se caracterizan por desarrollarse con preferencia entre 50 y 55° C. Estas formas se califican de termófilas o amantes del calor.

Medran bien a las temperaturas propias de la pasteurización, especialmente si se aplica el método de menos calor. La mayoría de las formas termófilas encontradas en la leche son esporógenas, y pertenecen a dos géneros, *Bacillus* (aerobios) y *Clostridium* (anaerobios); algunas especies termófilas no producen esporas.

Las bacterias termófilas se hallan en el suelo, el aire, el estiércol, los granos, en máquinas de ordeñar poco limpias y en utensilios o aparatos de pasteurizar, de donde seguramente pasan a la leche. Si tales utensilios y aparatos no se friegan esmeradamente a diario, los microorganismos se acumulan en la película de leche y sirven de foco para su reproducción.

Importancia de las bacterias termodúricas y termófilas. Estas bacterias no son patógenas, ni tienen significación sanitaria; sólo indican descuido en la limpieza de utensilios de ordeño y aparatos de pasteurizar, con el consiguiente riesgo de multiplicación de los microbios.

Razones sanitarias de la pasteurización. Las autoridades de Sanidad convienen en la utilidad de la pasteurización, probada por una larga experiencia en la prevención de enfermedades que pueden transmitirse por la leche. La pasteurización es la única medida conocida que, si se aplica bien a toda la leche, puede evitar que sirva de vehículo a enfermedades. Conviene y es muy ventajoso examinar a vacas y al personal de lecherías; pero sólo es posible hacerlo a intervalos, y por eso no basta para impedir que la leche se contamine durante largos períodos antes de ponerse de manifiesto la dolencia. También pueden llegar accidentalmente a la leche bacterias patógenas de otras procedencias (moscas, agua impura, utensilios contaminados, etc.). Se ha demostrado que las combinaciones de 62° C por 30 minutos y 71° C por 15 segundos, aplicados efectivamente a cada partícula de leche, desvitalizan a todos los gérmenes patógenos contenidos en este alimento.

Numerosos estudios y observaciones atestiguan que el valor nutritivo de la leche no mengua apreciablemente por la pasteurización.

Para más información, véanse Doetsch (1949), Fabian (1946 *a*, 1948), y Olson (1947).

Reacción de la fosfatasa. Esta prueba se emplea para determinar la eficacia de la pasteurización. Se basa en que la enzima termolábil fosfatasa tiene la propiedad de liberar fenol del éster fenilfosfórico, y el fenol, a su vez, se valora cuantitativamente con 2,6-dibromoquinonacloroimida, con la que forma un azul de indofenol. Todo el colorante azul desarrollado en el tubo de ensayo se extrae con alcohol butílico y se compara con una serie de patrones permanentes.

La enzima se halla siempre en la leche cruda. Cuando ésta se calienta a 62° C durante treinta minutos, se destruye 96 % de la fosfatasa; y a 63° C por igual tiempo, queda totalmente inactivada.

La presencia de la enzima revela pasteurización defectuosa o adición subsiguiente de leche cruda. La cantidad de fosfatasa presente se valora fácil y rápidamente por colorimetría. Los microorganismos patógenos probables en la leche quedan muertos a una temperatura inferior a la requerida para destruir la enzima; por consiguiente, la aplicación de calor suficiente debe proporcionar leche exenta de las bacterias patógenas corrientes.

Buck (1942) ha aislado de leche pasteurizada un microorganismo termófilo capaz de elaborar una fosfatasa, y le dió el nombre de *Lactobacillus enzymothermophilus*. Esta observación puede explicar muchas reacciones positivas de fosfatasa atribuidas a defectos manuales y mecánicos en la lechería, y que en realidad se deben a una fosfatasa procedente de una bacteria termófila.

Más información se encontrará en Aschaffenburg y Mullen (1949), Hetric y Tracy (1948), Kosikowsky (1949), Kosikowsky y Dahlberg (1948), y Sanders y Sager (1948).

MANTEQUILLA

La mantequilla se compone de grasa de leche, agua, caseína, lactosa o azúcar de leche y sal. El contenido en agua varía entre 10 y 16 % en peso; el de caseína y lactosa depende de la intensidad con que se lave la mantequilla en el curso de su elaboración. Generalmente se añade 1 a 3 % de sal, que se disuelve por completo en el agua; y como no se disuelve en la grasa, la porción líquida de la mantequilla constituye una solución salina al 10 hasta el 30 %.

La mantequilla se preparaba antes batiendo nata fresca, cruda o pasteurizada, a fin de separar los glóbulos de grasa de los demás componentes. Este método no se practica ya mucho, pues requiere batir a diario mientras la leche o la nata continúe fresca; hoy se deja agriar primero la leche o la nata, y así resulta más fácil separar la grasa o manteca de la caseína.

La nata puede agriarse naturalmente o por adición de un cultivo de microorganismos lácticos y otros, conocido por «acidificador». Esta

acidificación preliminar de la nata ofrece como ventajas un aumento de la producción de mantequilla, por separarse mejor la caseína y la grasa, y una mejora notable del olor y el sabor.

Cultivos para mantequilla (acidificadores). Estos cultivos consisten en una mezcla de dos tipos de microorganismos: unos destinados a producir una intensa acidez (ácido láctico), y otros para mejorar el olor y el sabor característicos de la mantequilla.

Tipo láctico. El tipo de germen láctico suele ser *Streptococcus lactis,* que normalmente agría la leche, o bien *S. cremoris.* Estas bacterias originan en cantidad relativamente grande ácido láctico a expensas de la lactosa, además de pequeñas porciones de productos secundarios. La vegetación de microbios en la leche no da una substancia con sabor a cultivo acidificante; sin embargo, los compuestos formados por los gérmenes lácticos influyen mucho en la acción de las bacterias sazonadoras, y dan por resultado un producto con olor y sabor más pronunciados.

Los microorganismos lácticos producen 0,7 a 1 % de ácido láctico en la leche, con un máximo de 1,2 %; estas proporciones corresponden a una escala de pH entre 4,3 y 5.

Las células de *S. cremoris* son esferas de 0,6 a 0,7 μ de diámetro, a menudo mayores que las de *S. lactis,* y se presentan en parejas o en cadenas largas. Toman el gram; su temperatura óptima de desarrollo se aproxima a 30° C. Se desarrollan en una solución salina al 2 %, pero no al 4 %. El *S. cremoris* no prospera en medios artificiales; se ha aislado de leche cruda y productos lácteos, y se emplea comúnmente en acidificadores comerciales para la fabricación de mantequilla y queso. Las características del *S. lactis* se han expuesto en la página 584.

Tipo sazonador. Los microorganismos que determinan el olor y el sabor de la mantequilla consisten en una mezcla de *Leuconostoc dextranicum* y *L. citrovorum.* Producen muy poco ácido, pero son capaces de atacar el ácido cítrico de la leche y formar ácido acético, acaso algo de ácidos fórmico y propiónico, dióxido de carbono, acetilmetilcarbinol, $CH_3 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$, y diacetilo, $CH_3 \cdot CO \cdot OC \cdot CH_3$. El diacetilo muy diluido sugiere el olor de mantequilla; el acetilmetilcarbinol puro carece de olor, pero cuando está impurificado huele de modo no muy distinto al acetilo. Los cultivos de aroma y sabor satisfactorios contienen cantidades relativamente grandes de ambos compuestos, mientras que, si éstos escasean, tales propiedades dejan que desear.

El olor y el sabor de la mantequilla dependen de la proporción de ácido cítrico en la leche. Ésta suele contener un 0,18 % de ácido cítrico; si se añade más, aumenta notablemente la concentración de acetilmetilcarbinol y de acetilo, y el gusto se intensifica en proporción.

Las células de *L. dextranicum* son esferas de 0,6 a 1 μ de diámetro, apareadas o en cadenas cortas, grampositivas, con desarrollo óptimo

entre 21 y 25° C. Se encuentra en materiales de instalación y productos lácteos, y con frecuencia se utiliza en «acidificadores» de leche.

El *L. citrovorum* es similar al *L. dextranicum,* y crece mejor entre 20 y 25° C. El primer compuesto sazonador resultante parece ser acetilmetilcarbinol, que por oxidación se convierte en acetilo. En condiciones de intensa acidez, en la leche se acumulan ambas substancias; cuando la acidez es baja, y adecuada la temperatura, parte del acetilmetilcarbinol se reduce a 2:3-butilenglicol, $CH_3 \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CH_3$. La fermentación del ácido cítrico, según Van Beynum y Pette, se puede representar como muestra la figura 191.

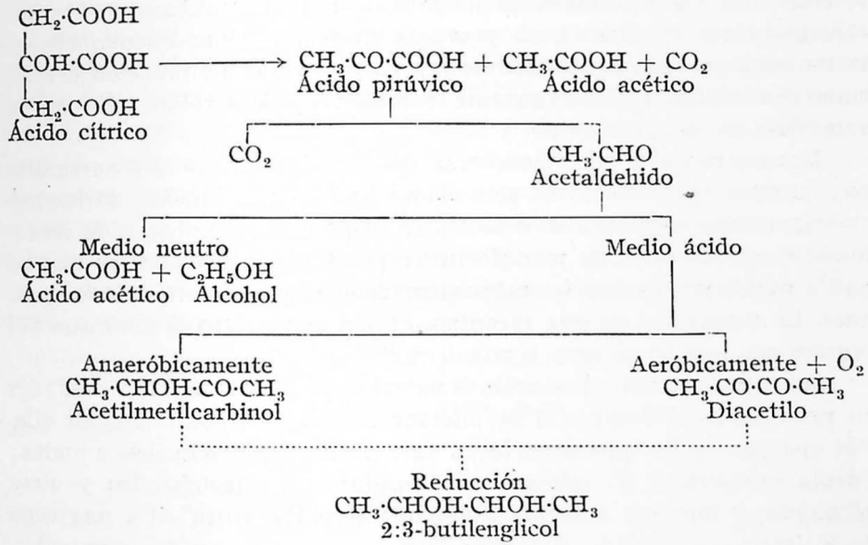


Fig. 191. — Fermentación del ácido cítrico.

Elliker (1945) expone que la pérdida de olor y sabor en la mantequilla, sus sucedáneos y otros alimentos obedece a la acción de microorganismos sobre su contenido en diacetilo. Miembros del género *Pseudomonas* han resultado destructores de diacetilo, con la consiguiente atenuación del sabor. Se subraya en estos estudios la importancia de conservar a salvo de gérmenes contaminantes la mantequilla y otros productos que contengan diacetilo.

Preparación y empleo de un acidificador. Los cultivos para mantequilla se preparan pasteurizando leche a una temperatura de 70 a 85° C durante treinta minutos, a fin de disminuir el número de bacterias extrañas, y sembrando en ella los gérmenes apropiados. Una vez preparado el acidificador, debe manipularse con gran cuidado, a fin de

evitar la infiltración de microbios que originen cambios contraproducentes. Los acidificadores se suelen madurar entre 21,1 y 22,2° C, para que desarrollen el máximo olor y sabor; los sazonadores no se obtienen en cantidad apreciable hasta que el acidificador presenta una acidez aproximada de 0,8 %. Por lo regular se añade 0,25 a 1 % de acidificador a la crema que ha de incubarse para preparar mantequilla.

Alteraciones de la mantequilla. La mantequilla preparada con nata dulce (sin sal) no pasteurizada contiene la microflora de su materia prima; y las transformaciones bacterianas que ocurren durante su conservación son las mismas que experimenta la leche en iguales condiciones. La mantequilla preparada con crema previamente pasteurizada a temperatura alta e inoculada luego suele contener únicamente los microorganismos añadidos para provocar su maduración. Pueden encontrarse algunos mohos y levaduras procedentes de contaminación aérea; como los mohos son fuertemente aerobios, se desarrollan sólo en la superficie de la mantequilla.

Las alteraciones que se observan después de fabricar la mantequilla son en gran parte efecto de actividades bacterianas. Muchos de los microorganismos que originan defectos en el producto provienen de contaminación posterior a su manufactura; por tanto, al manipular mantequilla deben observarse las mismas precauciones que con la leche y la nata. La intensidad de esta recontaminación es un dato aproximado del esmero con que se elabora la mantequilla.

Sabores extraños. Los sabores extraños de la mantequilla obedecen en gran parte al desarrollo de microorganismos no habituales en ella. Por ejemplo, el *Streptococcus lactis* var. *maltigenes* le da sabor a malta; *Torula cremoris* y *T. sphaerica*, a levadura; los lactobacilos y otros gérmenes, a queso, y a metal, diversos microbios, entre ellos una cepa de *S. lactis*.

Enranciamiento. La fase primera de este proceso consiste en hidrólisis de los glicéridos, con descomposición de la grasa en glicerina y ácidos grasos. El sabor de la mantequilla rancia recuerda el olor de los ácidos butírico y caproico. Pueden enranciar la mantequilla diversas bacterias aerobias y anaerobias, levaduras y mohos, entre ellas especies de *Pseudomonas, Micrococcus, Penicillium, Cladosporium, Oidium* y *Serratia*.

Olor a pescado. La mantequilla toma olor a pescado por acidez intensa y por descomposición de lecitina, que da origen a trimetilamina. La lecitina se compone de ácidos grasos, glicerina, ácido fosfórico y colina (pág. 311); de la base colina deriva la trimetilamina. El microorganismo *Proteus ichthyosmius,* aislado por vez primera de una lata de leche concentrada con olor a pescado, puede producir igual efecto cuando se siembra en leche fresca; es un bacilo móvil gramnegativo, que se presenta en células sueltas y no fermenta lactosa. Su temperatura óptima de desarrollo es 20° C. Es indudable que también otros gérmenes pueden comunicar a la mantequilla olor a pescado.

Olor a sebo. Este olor de la mantequilla es efecto principalmente de oxidación, por obra de los rayos ultravioleta de la luz solar o de las oxidasas que normalmente hay en la nata. Se ha dicho que ciertas enzimas de mohos son capaces de producir un efecto análogo. Estas alteraciones se pueden prevenir pasteurizando a elevada temperatura, con lo que se destruyen las enzimas oxidantes.

Análisis bacteriológico cuantitativo de la mantequilla. Este producto no constituye medio favorable para el desarrollo de la mayoría de las bacterias. Su multiplicación suele ocurrir únicamente en las gotitas de agua que contienen la sal disuelta, y acaso algo de lactosa y caseína. Como la mucha sal hace adverso este medio, la mantequilla nunca da recuentos tan altos como la leche, y menos a medida que envejece.

La flora bacteriana superficial de la mantequilla difiere de la del interior, a causa de contaminación aérea y de diferencias en las tensiones de oxígeno; por ello es difícil obtener una muestra representativa para examen. Habitualmente se prepara recortando un cilindro de una torta de mantequilla con un catador esterilizado. La mantequilla se funde en baño de maría a no más de 40°, y se preparan diluciones con porciones de agua esterilizada que se calientan previamente a la misma temperatura.

Para más información, véanse Babel y Hammer (1944), Bang (1949), Grant, Gibbons, Marshall y Lips (1948), Hales (1945), Hammer y Babel (1943), Hedrick y Hammer (1942), Hoecker y Hammer (1944, 1945), Nikkilä, Richards y El-Sadek (1949).

HELADOS

Los helados son productos lácteos congelados, compuestos de nata, azúcar, gelatina y sazonadores. A veces se les agrega leche condensada. A diferencia de lo que ocurre con la mantequilla y el queso, las bacterias no participan en la elaboración de los helados.

El contenido bacteriano de un helado depende ampliamente del número de gérmenes que contenga la crema en el momento de prepararlo, y del que haya en los diversos ingredientes empleados. Se ha comprobado que ciertas bacterias se reproducen en el helado conservado en frío; un número disminuye al principio, y, al cabo de un mes, poco más o menos, aumenta gradualmente.

Los microorganismos lácticos, es decir, los que hacen agriarse la nata, no se multiplican a temperaturas bajas; si aumenta su número, ello indica la presencia de otras especies, como las de tipos putrefactivos, que pueden originar catabolitos molestos. La presencia de microorganismos patógenos en los helados suele provenir del empleo de nata contaminada para prepararlos.

QUESO

Según las normas de la Administración de Productos alimenticios y químicos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, puede definirse el queso como

...el producto hecho con la cuajada obtenida por coagulación de la caseína de leche natural, desnatada o enriquecida. Para coagular se emplea cuajo u otra enzima adecuada, o la fermentación láctica, o una combinación de ambos medios. La cuajada se puede modificar mediante calor, presión, fermentos maduradores, mohos especiales o aliño conveniente.

La cuajada sólida se moldea en diversas formas, según la clase de queso que se fabrique; esta cuajada, reciente y prensada, es lo que se conoce por queso fresco. Para que adquiera cualidades apetecibles, es necesario dejarlo madurar, en condiciones cuidadosamente reguladas de temperatura y humedad, sobre todo; durante esta fase, el queso experimenta notables variaciones: la caseína insoluble se hace soluble, y con ello mejora mucho su digestibilidad; su consistencia se modifica y hace más blanda, y a la vez se desarrollan el sabor y el aroma del producto terminado.

Para la preparación de la cuajada se siguen dos procedimientos generales, uno de ellos basado en la adición de enzimas, y el otro en las actividades de microorganismos; como éstas dependen de la presencia de enzimas, también se trata en este caso de un proceso enzimático. Los quesos del primer grupo son los de cuajo, y los otros, los de coágulo ácido.

Como ya se ha dicho, las transformaciones del lapso de maduración son obra de enzimas en su mayor parte; pero esto no explica todos los cambios que ocurren durante el largo proceso de envejecimiento. Los sabores especiales que aparecen durante la última fase de la maduración no son resultado de la acción enzimática, sino de la actividad asociada de bacterias, levaduras y mohos. Las enzimas mejoran la consistencia y digestibilidad de los quesos, pero no intervienen en la mejora del sabor, que depende, con otras características, de las clases y el número de los microorganismos presentes.

Calbert y Price (1949, *a b*) comprobaron que durante la elaboración del queso de Cheddar se producía diacetilo, que en pequeña cantidad contribuye probablemente a comunicarle su especial sabor.

Dahlberg y Kositowsky (1949) informaron sobre la presencia de tiramina en el queso de Cheddar madurado con *Streptococcus faecalis*. En su opinión, el sabor de este queso obedece al contenido en tiramina.

Véase más información en Cherrington y Hammer (1948), Peterson, Johnson y Price (1949).

Quesos duros. Los quesos de esta clase se preparan con cuajadas sometidas a fuerte compresión para eliminar todo el suero posible. Así se obtiene un coágulo muy duro y resistente, que no se ablanda en absoluto durante la maduración. Ejemplos de esta clase son el americano (Cheddar), los suizos, el de Cheshire y el de Edam. Como el coágulo es muy duro y compacto, la fase de maduración ha de ser larga para obtener un producto satisfactorio. Las modificaciones enzimáticas y bacterianas son simultáneas.

Son varias las fases que se distinguen en el período de envejecimiento. En la primera, las bacterias lácticas se multiplican más rápidamente que las demás, de lo cual resulta un predominio de las primeras; esto dura varios días, y después disminuye gradualmente su número, con lo que, al final de la maduración, puede ser inferior al del comienzo del proceso.

Gérmenes adecuados. Los diversos aromas, sabores y características de los distintos tipos de queso dependen de muchos microorganismos; al parecer, cada tipo responde a una flora característica propia. Entre los gérmenes aislados de quesos se cuentan el *Streptococcus lactis* (página 584); el *S. cremoris* (pág. 606); el *S. thermophilus*, esferas grampositivas, sueltas o en cadenas cortas, con temperatura óptima a 50° C, que fermentan lactosa y producen sobre todo ácido láctico; el *S. faecalis*, células esféricas u ovales de tamaño variable, en parejas y cadenas cortas, grampositivas, y que se desarrollan mejor a 37° C; el *Leuconostoc citrovorum* (pág. 607); el *L. dextranicum* (pág. 606); el *Lactobacillus casei*, bacilos inmóviles, grampositivos, que fermentan lactosa y forman principalmente ácido láctico, con temperatura óptima a 30° C; el *L. lactis*, bacilos grampositivos, sueltos, apareados y en cadenas, que producen ácido láctico y se desarrollan mejor a 40° C; el *L. bulgaricus*, bacilos inmóviles grandes, grampositivos, sueltos y en cadenas, que fermentan enérgicamente lactosa, se desarrollan sobre todo entre 45 y 50° C, y se emplean comúnmente como acidificador en la fabricación de mantequilla y queso; el *L. helveticus*, bacilos inmóviles grandes, grampositivos, sueltos y en cadenas, que producen en cantidad ácido láctico, medran con preferencia entre 40 y 42° C, y se emplean habitualmente como acidificador en la fabricación de mantequilla y queso; el *L. plantarum*, bacilos inmóviles grandes, grampositivos, sueltos y en cadenas cortas, que producen ácido láctico de lactosa y se desarrollan mejor a 30° C, y el *propionibacterium shermanii*, esférulas inmóviles anaerobias, grampositivas, que se presentan principalmente en parejas y cadenas cortas, y dan ácido láctico por fermentación de lactosa.

Microorganismos contraproducentes. La presencia de microbios inoportunos es la causa de numerosos tipos de quesos defectuosos. Algunos defectos del queso afectan al sabor, y otros perjudican el aspecto del producto terminado. La leche se contamina si se recoge y manipula

sin cuidado, y de ello derivan pérdidas considerables para la industria quesera. Por eso suele recomendarse emplear leche previamente pasteurizada y sembrar en ella los gérmenes que interesan, mejor que empezar con leche cruda o sin pasteurizar.

Una de las alteraciones más comunes es la del queso hinchado o «soplado», resultante de la fermentación de lactosa con formación de ácido y gases. Las burbujas gaseosas hinchan el queso de tal forma, que a veces revienta. Los sabores desagradables son originados por microbios, generalmente bacterias coliformes y levaduras. Galesloot (1947 *b*) comprobó que los gérmenes del género *Aerobacter* suelen dar origen a queso hinchado, y no lo hacen los del género *Escherichia*; y el mismo autor (1947 *c*) aisló ciertas levaduras que fermentan lactosa e hinchan asimismo el queso.

Véase más información en Hood y Smith (1951).

La presencia de gérmenes putrefactivos ocasiona a veces olor y sabor a podrido; tales gérmenes proliferan y entran en actividad cuando se reduce la acidez del queso durante la maduración. Los microorganismos cromógenos pueden alterar el color del queso; esto tiene otras veces por causa diversas reacciones químicas con metales, como cobre y hierro, de los utensilios empleados en la manipulación de las primeras materias. Las motas azules del queso de Edam se atribuyen al *Bacillus cyaneofuscus*, que muere antes de terminar la maduración. Las bacterias propiónicas cromógenas ocasionan manchas pardas y rojas en el queso de Emmental, y el *Lactobacillus brevis* var. *rudensis* es causa de las coloraciones parduscas del queso Cheddar; como el fenómeno ocurre con más frecuencia en primavera, se cree que este microorganismo procede de la hierba fresca. Producen cambios de color superficiales muchos mohos, como *Penicillium casei, Cladosporium herbarum, Monilia niger* y *Oospora crustacea*; en el proceso intervienen asimismo tórulas (falsas levaduras) rojas y amarillas.

Quesos blandos. Para preparar quesos blandos se deja que escurra el suero de la cuajada, sin prensarla. Los quesos así elaborados contienen más humedad que los obtenidos con cuajada dura, y constituyen un producto acabado mucho más blando. La primera fase de la fabricación de estos quesos es una fermentación de la lactosa por medio de bacterias lácticas, que forman una cuajada ácida. Las modificaciones subsiguientes dependen de la observancia de ciertos requisitos bien definidos.

En los quesos de Camembert, la corteza se mantiene seca, lo cual ofrece una excelente ocasión para el desarrollo de ciertos mohos, como el *Penicillium camemberti* y el *Oidium lactis*. Las enzimas segregadas por el primero producen desde la superficie del queso una licuación lenta de la caseína; las enzimas penetran gradualmente en la masa,

hasta afectar a toda la cuajada. Al final del período de maduración se forma así una masa blanda, cremosa, cuyo sabor característico se debe probablemente al desarrollo del *O. lactis*.

En los quesos de Roquefort y otros de igual tipo se siembran en la cuajada el moho verde azulado *P. roqueforti* y especies afines. Como estos microorganismos son aerobios, se pinchan las cuajadas para facilitar el desarrollo de aquéllos en toda la masa; las enzimas elaboradas por los hongos ablandan la caseína, y ciertos metabolitos producen los característicos aromas y sabores de estos quesos.

Los del tipo del Limburger se producen manteniendo húmeda la superficie, para impedir el desarrollo de mohos y estimular el de bacterias. La maduración comprende la descomposición de la caseína por acción enzimática y bacteriana.

El queso y las enfermedades. Muchas epidemias se han atribuido al consumo de quesos contaminados por microorganismos patógenos. Según Fabian (1946 *b*, 1947), los gérmenes que con más frecuencia provocan infecciones transmitidas por el queso son *Salmonella aertrycke, S. schottmuelleri, S. typhosa, S. typhimurium, S. choleraesuis, Micrococcus pyogenes* var. *albus* y *aureus, Brucella melitensis* y *Clostridium botulinum*.

Gilman y Marquardt (1951) aislaron *Brucella abortus* de cinco entre cuatro cuajadas de quesos italianos obtenidas de leche cruda. Después de pasteurizar ya no pudieron obtener el germen de la leche o la cuajada hecha de la misma muestra. Al parecer, el microbio sobrevivió al proceso de fabricación a base de leche cruda contaminada.

A juzgar por observaciones disponibles, si se deja madurar queso durante no menos de noventa días, mueren prácticamente o se atenúan todas las bacterias patógenas. Es mejor y más seguro un período de ciento veinte días para quesos obtenidos de leche sin pasteurizar. La pasteurización es el único procedimiento seguro que se recomienda o necesita; el queso elaborado con leche o nata pasteurizada puede madurarse en la mitad del tiempo, empleando una temperatura de 16° C en vez de 4,5° C. Además, si hay bacterias patógenas, mueren antes a la temperatura más alta que a la más baja. Combinando la pasteurización con un período de noventa días, se consigue condiciones poco menos que ideales, y también económicas, pues de este modo el queso es más consistente y maduro.

Para más información, véanse Gilman, Dahlberg y Marquardt (1946).

LECHE FERMENTADA

La leche es probablemente el producto alimenticio más importante entre muchos pueblos de Europa y Asia dedicados al pastoreo. Por las condiciones higiénicas primitivas en que tales pueblos viven, la leche se deja fermentar habitualmente antes de consumirla, sobre todo durante la estación calurosa.

El consumo de productos de leche agriada se ha extendido mucho, por atribuírsele valor terapéutico. El hecho de que se expendan con distintos nombres no significa necesariamente que se fermenten cada uno con un microorganismo distinto; más bien se designa con ellos el país o la región en que se producen. Muchos de estos preparados resultan de la acción combinada de dos o más gérmenes, y proporcionan excelentes ejemplos de asociaciones bacterianas.

Yogurt. Se conoce con este nombre un preparado de leche agria de Bulgaria y Turquía, obtenido generalmente de leche de camella o de yegua, por fermentación con microbios acidógenos del tipo del *Lactobacillus bulgaricus*. A veces contiene también levaduras que dan una pequeña cantidad de alcohol y dióxido de carbono. Los microorganismos proporcionan 1,5 a 2,5 % de ácido, calculado como ácido láctico.

Mazun. Preparación de leche ácida de Armenia, similar al yogurt en sabor y microflora.

Giodu. Es la preparación de leche fermentada que se elabora en la isla de Cerdeña. Contiene los mismos gérmenes que el yogurt de Bulgaria y el mazun de Armenia.

Leben. La bebida egipcia conocida por este nombre se prepara con bacterias lácticas y levaduras a base de leche de vaca, de cabra o de búfala. Las bacterias transforman por hidrólisis lactosa en glucosa y galactosa, y las levaduras fermentan estos azúcares para producir alcohol y dióxido de carbono; también los atacan en parte las bacterias, con formación de ácido láctico.

Cumis. El cumis es un producto ruso preparado mediante fermentación de leche de vaca con levaduras, lactobacilos y estreptococos lácticos. Las primeras dan alcohol y dióxido de carbono, y las bacterias forman ácido láctico.

Kefir. Se prepara el kefir sembrando en la leche granos de este producto, parecidos a coliflores diminutas y compuestos de *Saccharomyces kefir, Lactobacillus casei* y estreptococos; la levadura produce alcohol y dióxido de carbono, y las bacterias ácido láctico.

Leche cuajada (curds). Es una preparación de leche fermentada de Ceilán, a base de leche de vaca o de búfala, que se hierve y se inocula, algo caliente aún, con un trozo de cuajada de un lote precedente. Se deja fermentar no menos de treinta y seis horas antes de comerla. En la reacción intervienen levaduras, *Streptococcus lactis* y un *Lactobacillus*; en la mayoría de las muestras predominan la levadura y el *S. lactis*. Se elabora aproximadamente como el cumis y el kefir.

Leche ácida o búlgara. El yogurt se consume en grandes cantidades por la población de Bulgaria en la dieta normal. Mechnikov (1908) observó que en aquel país abundaban los centenarios más que en ningún otro, y supuso que tal longevidad era fruto del consumo de grandes cantidades de leche ácida, obtenida por la acción del bacilo grampositivo *Lactobacillus bulgaricus* (pág. 611). En consecuencia, propuso que se consumiera leche agria para prolongar la vida humana.

Según Mechnikov, al desarrollarse el *L. bulgaricus* en el conducto intestinal producía una elevada proporción de ácido láctico, capaz de estorbar el desarrollo de bacterias putrefactivas; ello parece impedir los trastornos que se presumen asociados a una autointoxicación o absorción de catabolitos putrefactivos desde el mencionado conducto.

Posteriormente, Hull y Rettger (1915) hallaron incorrectas las conclusiones de Mechnikov, e informaron que el *L. bulgaricus* no reside normalmente en el tubo intestinal del hombre, y por ello no se aclimata a su nuevo ambiente. A su juicio, el consumo de leche búlgara estimulaba el desarrollo del *L. acidophilus*, microorganismo normalmente alojado en el conducto intestinal de personas adultas.

Moro (1900) aisló primeramente el *L. acidophilus* de las heces de niños criados al pecho. Se halla en el contenido intestinal de los adultos, en número escaso con dieta mixta, y muy crecido si el régimen se completa con grandes cantidades de leche o de carbohidratos, tales como lactosa o dextrina. Los gérmenes fermentan el carbohidrato y producen una elevada concentración de ácido láctico (un 3 %), suficiente para detener el desarrollo de las bacterias putrefactivas (*Escherichia coli*, etc.). Sin dieta rica en carbohidratos, la flora vuelve a hacerse más bien putrefactiva. También aumenta el número de gérmenes tomando leche fermentada por *L. acidophilus*, especialmente acompañada de lactosa o dextrina, para aumentar los componentes fermentables en el conducto intestinal.

Véase más información en Johansson y Sarles (1949), Nilsson (1949), y Olsen (1949).

REFERENCIAS

Abd-el-Malek, Y.: Further studies on the bacterial flora of pasteurized milk, *Proc. Soc. Agr. Bact. (Abstracts)*, 1943.

— y T. Gibson: Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk, *J. Dairy Research*, **15**: 233, 1948*a*; II. The staphylococci and micrococci of milk, *ibid.*, **15**: 249, 1948*b*.

Abele, C. A.: Results of bacterial plate counts of milk on three media and at two temperatures of incubation. *Am. J. Pub. Health*, **29**: 821, 1939.

Abele, C. A.: The methylene-blue reduction test as a means of estimating the bacterial content of milk, to determine its suitability for pasteurization or as a basis for grading, *J. Milk Technol.*, 8: 67, 1945.
American Public Health Association: «Standard Methods for the Examination of Dairy Products», Nueva York, 1948.
Aschaffenburg, R., y J. E. C. Mullen: A rapid and simple phosphatase test for milk, *J. Dairy Research*, 16: 58, 1949.
Babel, F. J., y B. W. Hammer: Action of butter cultures in butter: A review *J. Dairy Sci.*, 27: 79, 1944.
Bang, Von F.: Über den Stoffwechsel von *Streptococcus citrovorus*, *Arkiv Kemi*, 1: 27, 1949.
Buck, T. C., Jr.: False positive phosphatase test from a thermophil in pasteurized milk, *Am. J. Pub. Health*, 32: 1224, 1942.
Calbert, H. E., y W. V. Price: A study of the diacetyl in cheese. I. Diacetyl content and flavor of cheddar cheese, *J. Dairy Sci.*, 32: 515, 1949*a*; II. The changes in diacetyl content of cheddar chese during manufacturing and curing, *ibid.*, 32: 521, 1949*b*.
Cherrington, V. A., y B. W. Hammer: Relationship of microorganisms to the disappearance of rancidity in cheddar cheese, *Univ. Idaho Agri. Exp. Sta. Bull.*, 14, 1948.
Dahlberg, A. C., y F. V. Kosikowsky: The influence of temperature of ripening on the tyramine content and flavor of American cheddar cheese, *J. Dairy Sci.*, 32: 316, 1949.
Davis, J. G.: The technique for the resazurin tests, *Dairy Ind.*, 8: 167, 1943.
—, L. G. Newland, y P. B. Knuckey: The resazurin and rapid resazurin tests, *ibid.*, 8: 23, 71, 115, 1943.
— y D. W. Watson: The resazurin test for sterility of milk churns, *ibid.*, 8: 415, 1943.
— y —: Observations on the new statutory methylene blue test for heat treated milk, *Proc. Soc. Appl. Bact.*, pág. 81, n.º 2, 1946.
Doetsch, R. N.: The problem of thermophilic and thermoduric bacteria in milk, *Milk Plant Monthly*, diciembre 1949.
Elliker, P. R.: Effect of various bacteria on diacetyl content and flavor of butter, *J. Dairy Sci.*, 28: 93, 1945.
—: «Practical Dairy Bacteriology», Nueva York, McGraw-Hill Book Company Inc., 1949.
Erdman, I. E., y H. R. Thornton: Psychriphilic bacteria in Edmonton milk and cream. I. Numbers, *Can. J. Technol.*, 29: 232, 1951*a*; II. Kinds, *ibid.*, 29: 238, 1951*b*.
Erskine, E. W., B. M. Fischer, S. M. L. Smith, y J. G. Davis: The relative keeping qualities of evening, morning and mixed milk, *Dairy Ind.*, noviembre 1943.
Fabian, F. W.: Significance of thermoduric and thermophilic bacteria in milk and their control, *Milk Technol.*, 9: 273, 1946*a*.
—: Cheese as the cause of epidemics, *ibid.*, 9: 129, 1946*b*.
—: Cheese and its relation to disease, *Am. J. Pub. Health*, 37: 987, 1947.
—: Strange families in the bacterial world, *Am. Milk Rev.*, 10: 6, 1948.
Frost, W. D.: Improved technic for the micro or little plate method of counting bacteria in milk, *J. Infectious Diseases*, 28: 176, 1921.
Galesloot, T. E.: Bepaling van het kiemgetal van gepasteuriseerde melk met de rolcultuurmethode, *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, pág. 201, octubre 1947*a*.
—: The cause of the early gas defect in cheese and the means to prevent it, *Antoine van Leeuwenhoek*, 13: 67, 1947*b*.
—: An early gas defect in cheese caused by yeasts, *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, pág. 238, octubre 1947*c*.
—: Kwaliteitsbepaling van rauwe melt met de resazurineproef, *ibid.*, pág. 70, abril-junio 1948.
—: Onderzoekingen, betreffende de methyleenblauwproef, *ibid.*, 3: 205, 1949.
Gibson, T., y Y. Abd-el-Malek: The effect of low-temperature pasteurisation on the bacterial flora of milk, *Proc. Soc. Agr. Bact. (Abstracts)*, 1940.
— y —: The micrococci of milk, *ibid.*, 1941.

Gilman, H. L., A. C. Dahlberg, y J. C. Marquardt: The occurrence and survival of *Brucella abortus* in cheddar and limburger cheese, *J. Dairy Sci.*, 29: 71, 1946.
— y J. C. Marquardt: The occurrence and survival of *Brucella abortus* in Italian cheese curd made from raw and pasteurized milk, *J. Milk Food Technol.*, 14: 55, 1951.
Grant, G. A., N. E. Gibbons, J. B. Marshall, y H. J. Lips: Chemical and microbiological studies on stored, salted butter, *Can. J. Research*, F, 26: 105, 1948.
Hales, M. W.: Cultures and starters, Milwaukee, Wis., Chr. Hansen's Laboratory, Inc., 1945.
Hammer, B. W.: «Dairy Bacteriology», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1948.
— y F. J. Babel: Bacteriology of butter cultures: A review, *J. Dairy Sci.*, 26: 83, 1943.
— y M. P. Baker: Classification of the *Streptococcus lactis* group, *Iowa State Coll. Agr. Exp. Sta., Research Bull.*, 99, 1926.
Hedrick, T. I., y B. W. Hammer: Diacetyl and acetylmethylcarbinol production in the manufacture of unsalted butter, *Iowa State Coll. Agr. Exp. Sta., Research Bull.* 301, 1942.
Hetrick, J. H., y P. H. Tracy: Effect of high-temperature short-time heat treatments on some properties of milk. I. Inactivation of the phosphatase enzyme, *J. Dairy Sci.*, 31: 867, 1948.
Hoecker, W. H. y B. W. Hammer: Important factors in flavor development in butter cultures, *Iowa State Coll. J. Sci.*, 18: 267, 1944.
— y —: Bacteriology of butter. IX. Salt distribution in butter and its effect on bacterial growth, *Iowa State Coll. Agr. Exp. Sta., Research Bull.* 339, 1945
Holmes, A. D., y C. P. Jones: Effect of sunshine upon the ascorbic acid and riboflavin content of milk, *J. Nutrition*, 19: 201, 1945.
Hood, E. G., y K. N. Smith: Bacterial spoilage in process cheese, *Sci. Agr.*, 31: 530, 1951.
Hull, T. G., y L. F. Rettger: The influence of milk and carbohydrate feeding on the intestinal flora of white rats, *Zentr. Bakteriol.*, Abt. 1, Orig., 75: 219, 1915.
Humphriss, E. L. E.: A modified Frost little plate method for routine bacteriological control of milk, *Dairy Ind.*, pág. 389, abril 1949.
Johansson, K. R., y W. B. Sarles: Some considerations of the biological importance of intestinal microorganisms, *Bact. Rev.*, 13: 25, 1949.
Kosikowsky, F. V.: A simple universal dairy products phosphatase test, *Science*, 110: 480, 1949.
— y A. C. Dahlberg: The elimination of interfering substances in the Kay-Graham phosphatase test when used for hard ripened cheese, *J. Dairy Sci.*, 31: 561, 1948.
Levine, B. S., y L. A. Black: A comparative study or commonly used staining procedures for the direct microscopic examination fo milk, *J. Milk and Food Technol.*, 11: 139, 1948*a*.
— y —: Newly proposed stining formulas for the direct microscopic examination of milk, *Am. J. Pub. Health*, 38: 1210, 1948*b*.
— y —: Direct microscopic clump counts of pasteurized milk by carbolated, Newman-Lampert No. 2, and the acid-and-water-free methylene blue staining procedures, *J. Milk and Food Technol.*, 12: 69, 1949*a*.
— y —: Comparative analysis of the standard methods methylene blue stain and advantages of the polychrome and acid-and-water-free stains in the direct microscopic examination of milk, *Am. J. Pub. Health*, 39: 1110, 1949*b*.
Mallmann, W. L., C. S. Bryan, y W. D. Baten: A study of methods for the microscopic examination of raw milk with suggested improvements, *J. Milk Technol.*, 7: 315, 1944.
— y E. Churchill: A rapid test for determining bacteria in liquid eggs, *U.S. Egg Poultry Mag.*, 48: 406, 1942.
Morris, C. S.: The occurrence of slow-reducing coliform organism in milk, *J. Dairy Research*, 13: 115, 1943.
—: Presence in raw cow's milk of a bactericidal substance specific for certain strains of coliform organisms, *Nature*, 155: 22, 1945

Nikkilä, O. E.: Über den Bildungsmechanismus von Acetylmethylcarbinol bzw. Diacetyl bei bakteriellen Gärungen. *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, Series A, 1947.
Nilsson, G.: Studies in the bacterial flora of various yoghurt cultures, *Ann. Roy. Agric. Coll. Sweden*, **16**: 441, 1949.
Olsen, E.: Studies on the intestinal flora of infants, Einar Munksgaard, Copenhague, 1949.
Olson, J. C., Jr.: Psychrophiles, mesophiles, thermophiles, and thermodurics—what are we talking about? *Milk Plant Monthly*, noviembre 1947.
Orla-Jensen, S., y P. A. Hansen: The bacteriological flora of spontaneously soured milk and of commercial starters for butter making, *Centr. Bakt.*, Abt. II, **86**: 6, 1932.
Peterson, M. H., M. J. Johnson, y W. V. Price: Liberation of fatty acids during making and ripening of cheddar cheese, *J. Dairy Sci.*, **32**: 862, 1949.
Prouty, C. C., H. A. Bendixen, y S. P. Swenson: A comparison of the roll-tube and standard plate methods of making bacterial counts of milk, *J. Milk Technol.*, **7**: 5, 1944.
Richards, T., y G. M. El-Sadek: The nature and quantity of fatty acids produced in butterfat by the action of micro-organisms, *J. Dairy Research*, **16**: 46, 1949.
Sackett, De L., y G. G. Gralak: The value of the coliform count in the routine examination of milk and dairy products, *J. Milk and Food Technol.*, **13**: 350, 1950.
Sanders, G. P., y O. S. Sager: Heat inactivation of milk phosphatase in dairy products, *J. Dairy Sci.*, **31**: 845, 1948.
Sherman, J. M., K. L. Smiley y C. F. Niven, Jr.: The serological integrity of *Streptococcus lactis*, *J. Dairy Sci.*, **23**: 529, 1940.
Smith, J.: Reviews of the progress of dairy science, *J. Dairy Research*, **17**: 91, 1950.
Stark, P., y J. M. Sherman: Concerning the habitat of *Streptococcus lactis*, *J. Bact.*, **30**: 639, 1935.
U.S. Public Health Service: Milk Ordinance and Code, *Public Health Bull.* 220, 1939.
Watrous, G. H., Jr., y F. J. Doan: Observations on the use of a modified direct microscopic method for estimating bacterial quality of raw and pasteurized milk, *J. Milk and Food Technol.*, **10**: 269, 1947.
Watson, D. W., C. J. Bessell, E. Goldschmidt, y J. G. Davis: The reproducibility of dye reduction tests with pasteurized milk, *Proc. Soc. Appl. Bact.*, pág. 1, núm. 1, 1946.

CAPÍTULO XXIII

BACTERIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Los alimentos echados a perder toman mal aspecto y se hacen invendibles y nocivos. Según Oser (1946), pueden no hacer daño, aunque no sirvan para el consumo humano. Para describirlos se emplean términos tales como corrompidos, pútridos o descompuestos. No todos ellos son por necesidad incomibles; por ejemplo, el queso de Limburg debe su popularidad al proceso de putrefacción de que procede; la salsa china se fabrica igualmente por descomposición enzimática, y ninguno de estos dos productos es incomible ni deja de de comerse, a pesar de tales características. En muchos casos se siembran microorganismos seleccionados en productos nutritivos, a fin de provocar ciertos tipos específicos de descomposición.

Los factores causales que intervienen en la corrupción de alimentos son físicos, químicos o biológicos. Rara vez se trata de procesos simples, sino que suelen ser simultáneos o sucesivos, lo que acarrea deterioros o alteraciones de índole sumamente compleja.

Deterioro por radiación. Uno de los factores físicos más importantes de la corrupción de alimentos es la radiación (rayos visibles, ultravioletas o infrarrojos).

La luz visible modifica el color o comunica sabores desagradables a los alimentos. Muchos líquidos nutritivos se preservan de la luz envasándolos en botellas de vidrio obscuro. La luz ultravioleta destruye bacterias, levaduras y mohos, pero a la vez ocasiona otros daños; por ejemplo, puede dar a las grasas olor a rancio, o colores extraños a los alimentos, o despojar a la leche de gran parte de su riboflavina.

Los rayos infrarrojos hacen subir la temperatura, y este exceso de calor puede traducirse en deshidratación de los alimentos, pérdida de componentes volátiles, alteración de proteínas, variaciones de peso, volumen, textura y aspecto general.

Deterioro por compresión. La compresión estropea a menudo los alimentos. Las frutas y hortalizas quedan invendibles a consecuencia de aplastamiento, magulladura, etc.; aunque no se estropeen por com-

pleto, puede haber pérdida de peso y de substancias nutritivas por exprimirse líquidos.

Deterioro por congelación. Cuando se someten alimentos a congelación, para conservarlos, se pretende diferir modificaciones físicas, químicas y biológicas. Pero si no se tiene cuidado, pueden sobrevenir alteraciones perjudiciales de sabor, textura y estabilidad.

La congelación lenta origina cristales grandes de hielo, que desgarran las paredes celulares; en cambio, la congelación rápida produce cristales diminutos, que no disgregan esas paredes, lo cual permite conservar satisfactoriamente los alimentos, sin estropearlos.

Deterioro por enzimas. Las enzimas continúan funcionando aún después de recolectar frutas y hortalizas o de sacrificar animales. De no resultar destruidas, siguen en actividad durante la manipulación y conservación de los alimentos, y esto significa que pueden ocasionar considerables daños. Las enzimas oxidantes catalizan la destrucción del ácido ascórbico (vitamina C), y pueden influir desfavorablemente en el sabor; las enzimas proteolíticas provocan autólisis y putrefacción de carnes; las amilolíticas descomponen carbohidratos en cuerpos más pequeños; las lipolíticas disocian las grasas en glicerina y ácidos grasos, que pueden pasar por oxidación a peróxidos y aldehídos, asociados al enranciamiento.

La revisión oportuna del pH es de considerable importancia para la elaboración de alimentos. Algunos pigmentos naturales de frutas y hortalizas son indicadores, y su color depende de la acidez de los productos. Proteínas, carbohidratos y grasas experimentan a veces modificaciones inconvenientes cuando la reacción es desfavorable. Las vitaminas son particularmente sensibles a cambios de pH; la vitamina A es estable en medios alcalinos; el ácido pantoténico lo es sólo en medios ácidos. Por eso es difícil o imposible conservar todas las vitaminas de un producto dado.

Deterioro biológico. De todos los agentes que contribuyen a estropear los alimentos, el más importante, sin duda alguna, es la acción de los microorganismos vivos. Causan daños sobre todo bacterias, levaduras y mohos. Los gérmenes pueden ser patógenos o no patógenos, esporíparos o asporógenos, termófilos o mesófilos, aerobios o anaerobios, y cada tipo requiere medios especiales de prevención y oposición.

Diversas clases de microorganismos producen alteraciones de diferentes tipos en los alimentos. La descomposición de los que contienen carbohidratos en abundancia origina habitualmente fermentaciones diversas; la acción de los microbios sobre alimentos ricos en proteínas da por resultado putrefacciones. Los productos de las primeras suelen ser inofensivos, mientras que las segundas dan otros molestos e incluso peligrosos.

Las bacterias son más exigentes que las levaduras o los mohos; esto significa que los dos últimos grupos se pueden reproducir en condiciones desfavorables para el desarrollo de bacterias. Éstas requieren cantidades relativamente grandes de humedad, concentraciones de iones hidrógeno generalmente próximas al punto neutro y presiones osmóticas más bien bajas, para crecer y reproducirse. Las levaduras toleran una humedad menor, no son tan delicadas en cuanto a pH y se multiplican en soluciones de presión osmótica más elevada. Los mohos, entre los hongos, son los que menos exigen: pueden resistir grados de acidez relativamente altos, necesitan mucha menos humedad y hasta crecen sobre substancias casi secas, además de tolerar presiones osmóticas sumamente elevadas.

MÉTODOS EMPLEADOS PARA CONSERVAR ALIMENTOS

Los métodos utilizados en la actualidad se empleaban mucho antes de que se comprendieran bien sus mecanismos; a medida que se han ido conociendo éstos, son varias las mejoras introducidas. Generalmente se hace uso del calor, del frío, de la desecación, de agentes conservadores y de presiones osmóticas altas.

Calor. En el empleo de calor se basa el método doméstico e industrial de preparación de conservas de carnes, frutas y verduras. El calor sirve para esterilizar por completo o para disminuir el número de microorganismos; en este último caso, los gérmenes que no mueren quedan incapaces de multiplicarse. Un calor excesivo destruye todas las formas microscópicas de vida, probablemente por coagulación del protoplasma de la célula viva, y la inutiliza para llevar a cabo sus funciones vitales. No conviene sobrepasar demasiado la temperatura necesaria para esterilizar, porque con ello podrían sobrevenir alteraciones de aspecto, sabor y composición de los alimentos. Puesto que no siempre sucumben todas las bacterias, suele designarse el método por tratamiento térmico de alimentos en conserva.

Los detalles de los procedimientos de conservación varían forzosamente según la naturaleza del producto. Hay algunas operaciones importantes comunes a todos los sistemas, a saber: limpieza, blanqueo, eliminación de aire o precalentamiento, cierre o soldadura del envase, tratamiento térmico del envase cerrado, y enfriamiento posterior del mismo.

Limpieza. Es la primera y una de las principales fases en la industria conservera. Con ella se persiguen dos fines: dar al producto un aspecto más agradable y reducir materialmente la carga de bacterias nocivas que pueden entorpecer notablemente la marcha del tratamiento térmico.

Para la limpieza se utilizan lavadoras de varios tipos. Los productos se someten a aspersiones o chorros de agua a fuerte presión mientras pasan sobre una cinta transportadora o caen en tamices vibratorios o giratorios. La suciedad y las partículas grandes adheridas a ciertos productos alimenticios se eliminan mecánicamente también por medio de tamices móviles o de fuertes ráfagas de aire.

Blanqueo. Esta operación consiste en sumergir los alimentos crudos (frutas y verduras) en agua templada o caliente, o en exponerlos a vapor efectivo, lo cual obedece a varias razones: el blanqueo puede servir simple-

mente como lavado con agua caliente cuando las materias adheridas no se separen con agua fría, o para ablandar los tejidos fibrosos vegetales, bien por contracción (pérdida de agua) o por expansión (absorción de agua), con lo que se consigue llenar bien el envase. Durante el blanqueo se expelen los gases respiratorios, y así se evitan las tensiones internas en el envase durante el tratamiento, a la vez que se facilita el desarrollo de un vacío más perfecto en el producto acabado. El blanqueo interrumpe la acción de las enzimas respiratorias, especialmente de las de oxidación, y proporciona un producto de calidad y valor nutritivo superiores; finalmente, fija el color natural de ciertos productos, y les da un aspecto más atrayente.

Eliminación de aire o calentamiento previo. En todos los procedimientos de elaboración de conservas se procura eliminar en lo posible el oxígeno (aire). La presencia de este gas no es de desear por dos razones: porque puede reaccionar con el producto y con la parte interior del envase y alterar el valor nutritivo y la calidad de la conserva, y porque expone el envase a fuertes presiones internas durante el tratamiento.

Para expulsar los gases se pasa el envase abierto, con el producto crudo, por una cámara de extracción o precalentamiento, en la cual se emplea agua caliente o vapor para hinchar la substancia y expeler el aire y otros gases contenidos en ella y en la parte superior del recipiente. Una vez expulsados los gases, se cierra o suelda inmediatamente el envase, se trata por calor, y se enfría. Durante el enfriamiento se contrae el contenido y deja un espacio vacío, lo cual se admite como prueba de salubridad del producto envasado.

Con algunas substancias se consigue el mismo efecto calentándolas previamente en calderas, vertiéndolas, aún calientes, en latas, y cerrando éstas en seguida mediante soldadura. Otros productos se dejan sin aire añadiendo agua hirviendo, jarabe o salmuera al alimento envasado, o bien empleando medios mecánicos en lugar de calor. Existen máquinas que extraen el aire de las latas y las sueldan al mismo tiempo; este último procedimiento se conoce por envase en vacío.

Soldadura de latas. Cada lata debe soldarse perfectamente antes de someterla al tratamiento térmico. El calor destruye todos los microorganismos existentes en el producto crudo, y el cierre del envase evita que el contenido vuelva a contaminarse. Por eso es la soldadura una de las operaciones más importantes en la preparación de conservas.

Tratamiento térmico de envases cerrados. El tratamiento térmico comprende, por lo general, la aplicación de vapor a presión (autoclave), que mata los microbios patógenos y otros capaces de estropear el producto. La soldadura del envase impide que contaminen de nuevo el contenido los mismos u otros gérmenes.

El tiempo necesario para tratar por calor alimentos en conserva depende de varios factores, tales como naturaleza y composición de las substancias, tipos y números de gérmenes que pueda haber, y concentración de iones hidrógeno en aquéllas. El calor penetra hasta el centro del envase por conducción y convección, pero en alimentos sólidos se introduce únicamente por conducción más bien lenta, si se compara con su rápida entrada por conducción y convección en los alimentos líquidos. El tamaño de las partículas de la substancia influye también en la velocidad de penetración del calor, que es menor cuando aquéllas son grandes.

Normalmente las bacterias se hacen sucumbir con más facilidad en un medio ácido o alcalino que en uno neutro. Por eso las frutas y verduras se tratan más fácilmente que las carnes y el pescado; además, en frutas y

vegetales penetra el calor con menos dificultad. Hay que determinar, pues, la temperatura y el lapso de tratamiento para cada clase de producto. En general, los gérmenes asporógenos en un medio líquido se destruyen a 60° C durante una hora, o entre 70 y 80° C en pocos minutos; a estas temperaturas subsisten las esporas; pero a 115° C, durante treinta minutos, o a 120° C, durante quince, cesa generalmente toda forma de vida.

Spiegelberg (1940 *a*, *b*), en sus estudios sobre deterioro de piña americana en conserva, llega a la conclusión de que con pH de 4,5, o más bajo, una temperatura de 87,8° C en la fruta, después de cocerla, servía para asegurar la esterilidad. Con pH superior a 4,5 se necesitaba una temperatura de 93,3° C para eliminar tipos asporógenos de bacilos fusiformes (*Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides*, y tres no nombrados), mientras que los butíricos (*Clostridium butyricum*) persistían a temperaturas muy superiores.

En el tratamiento de conservas alimenticias se procura reducir el período de aplicación de calor, para que el producto no se deteriore. Por lo general es preferible una exposición prolongada a temperatura relativamente baja, a un tratamiento breve, pero con más calor. Esto se aplica sobre todo a frutas en conserva.

Véase más información en Ball (1947), Gross, Vinton y Martin (1946), Gross, Vinton y Stumbo (1946, *a*, *b*), Sognefest, Hays, Wheaton y Benjamin (1948), Stumbo (1948, *a*, *b*, 1949), Stumbo, Gross y Vinton (1945, *a*, *b*, *c*), Vinton, Martin y Gross (1947, *a*, *b*).

Enfriamiento de las latas después de calentarlas. La última operación del procedimiento industrial consiste en enfriar rápidamente las latas cerradas; se impone hacerlo para detener la acción del calor y evitar un ablandamiento excesivo o un cambio de color del contenido. Las latas se pueden enfriar por medio de aire o de agua.

El enfriamiento por aire se hace en cámaras bien ventiladas, especiales para este objeto, donde las latas se apilan en hileras, con amplio espacio para que circule eficazmente el aire. Para el enfriamiento por agua, se deja entrar este líquido en el autoclave en que se calientan las latas, o pueden trasladarse éstas desde los esterilizadores a depósitos de agua fría, o a través de aspersiones de agua fría.

Frío. Los alimentos se conservan a bajas temperaturas conforme a dos métodos: refrigeración y congelación.

En el primer método, la temperatura se mantiene justamente por encima del punto de congelación, como en las neveras de hielo o eléctricas de uso doméstico corriente. El estado físico de los alimentos no se altera. La refrigeración retarda la acción bacteriana, pero no la impide; y, como muchas bacterias se reproducen lentamente a pocos grados sobre el punto del hielo, los alimentos refrigerados no se pueden conservar durante muchas semanas.

La maduración o envejecimiento se refiere a la práctica de conservar carne entre 1 y 3° C, ante todo para hacerla más tierna y mejorar su sabor. La carne de vaca de buena calidad puede madurarse por espacio de catorce días; la de cordero, durante siete y ocho días, a lo sumo. En la maduración intervienen principalmente enzimas proteolíticas, que se alojan en los tejidos.

El método de congelación está considerado como el más sencillo, seguro y saludable para la conservación de alimentos, siempre que se observen las siguientes normas: selección cuidadosa, envase adecuado, congelación a —18° C o por debajo, almacenamiento a —18° C con fluctuaciones mínimas, y almacenaje no demasiado largo.

La selección cuidadosa es el requisito primero de una conservación eficaz. Las macas y puntos débiles persisten en el producto si no se eliminan antes de congelarlo. Cualquier moho o mucosidad debe retirarse cuidadosamente de la carne antes de tratarla.

Se han ideado diversos recipientes y envolturas de calidad, recomendables para conservar bien los alimentos. Las características de un buen material de envase son: limpieza y salubridad, ausencia de olor y sabor, e impenetrabilidad a los olores; que sea práctico en el aspecto mecánico, de aspecto atrayente, sirva de defensa contra la desecación y resista a la oxidación; que resulte tenaz y no quebradizo a bajas temperaturas, no se engrase ni manche y resista a la humedad, al vapor y al aire (oxígeno).

La congelación rápida es la de mejor resultado en la conservación de alimentos. La lenta se refiere a temperaturas entre —18 y —29° C, y la rápida, a otras más bajas aún. Los alimentos deben congelarse aprisa y a menos de —18° C; los envases han de estar totalmente congelados antes de almacenarlos bien apretados en locales a propósito.

Las vitaminas contenidas en los alimentos se pierden con rapidez a temperaturas por encima de —18° C, y el calor también favorece el enranciamiento. Una vez congelados, la temperatura de conservación debe mantenerse a —18° C, con fluctuaciones mínimas; la fluctuación contribuye a que se deshidraten. Cuando hay nieve o hielo dentro de un envase, indican generalmente fluctuación en la temperatura del almacén.

En contra de lo que se supone, los alimentos congelados no se pueden conservar indefinidamente, pues se echan a perder poco a poco. Es mejor contar con una rotación normal por temporada. Las carnes de vaca y de cordero se conservan sin inconveniente un año entero; la de cerdo no debe guardarse más de nueve meses; y la carne picada resiste bien seis meses.

Supervivencia de gérmenes patógenos en alimentos congelados. Hartsell (1951) ha tratado carne de vaca y guisantes con *Micrococcus Pyogenes* var. *aureus, Salmonella typhosa, S. oranienburg, S. aertrycke* y *Shigella dysenteriae* antes de congelarlos; según informa, los microorganismos patógenos sobrevivieron muchos meses a —9 y —17,8° C, pero se observó mayor destrucción de bacterias a —9° C.

Este autor ha observado que las necesidades metabólicas de los gérmenes se modifican por el almacenaje a bajas temperaturas. Con medios muy nutritivos se recuperan más bacterias que con medios selectivos, cuyos efectos inhibitorios aumentaron al prolongar la conservación del alimento contaminado a temperaturas subcongelantes.

Se encuentra más información en Brady, Hoover y Tucker (1949), Mackintosh, Vail y Filinger (1949).

Desecación. La conservación de alimentos por desecación o deshidratación es de antiguo origen. Aunque al principio no se difundió mucho, hoy ha llegado a adquirir una gran importancia industrial; apenas hay un solo alimento que no se prepare deshidratado: nueces, vegetales, frutas, huevos, leche, pescado, carne y sopas.

Los alimentos deshidratados no son estériles probablemente nunca, y en esto difieren de la mayoría de las conservas. Por ello interesa sobre todo impedir que lleguen a ellos microorganismos capaces de ocasionar intoxicaciones alimenticias, especialmente las formas toxicógenas, como el *Clostridium botulinum* y ciertas cepas de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. Los alimentos deshidratados deben estar libres también de ciertos microbios intestinales que puedan ser patógenos para el hombre al ingerirlos, por ejemplo, miembros de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. El recuento bacteriano en alimentos desecados debe ser razonablemente bajo, para que no sobrevenga descomposición ni se desarrollen malos olores durante el período de reconstitución.

Con objeto de evitar que se formen toxinas bacterianas en alimentos y se desarrollen gérmenes patógenos para el hombre, Haines y Elliot (1944) recomiendan desecar el producto a temperatura impropia para una vegetación bacteriana apreciable. A su juicio, por debajo de 50° C no deben deshidratarse los alimentos; si es inevitable calentar a una temperatura algo inferior, por pérdida de calidad del producto, el período de tal calentamiento no debe exceder de cuatro horas. Estos investigadores han comprobado que no medran las bacterias en los alimentos cuando éstos contienen menos de 15 % de agua.

La deshidratación de los alimentos es un recurso valioso por diversos motivos principales. Los alimentos secos se pueden guardar fácilmente para uso ulterior; esto significa que es posible utilizar algunos de ellos durante más de una breve estación del año. Por deshidratación disminuye notablemente el volumen de un producto, ahorra espacio y facilita las manipulaciones, lo cual constituye una indudable ventaja en lo que concierne a los gastos de transporte. La mayoría de los productos deshidratados, si se han preparado bien, son excelentes substitutos de los alimentos frescos normales, de los cuales no es fácil distinguirlos. Los alimentos secos no requieren esterilización, ni que se mantengan condiciones estériles mientras se preparan; resultan más económicos, por no dar ocasión a pérdidas o despilfarro, ya que basta preparar cada vez la cantidad que haya de usarse.

También son varios los inconvenientes del empleo de alimentos

deshidratados. Requieren un largo período de remojo para restituirles el agua perdida por evaporación; este tiempo no es igual para todos los productos. Si la rehidratación no se practica con cuidado, sus efectos pueden no ser satisfactorios; a veces, los alimentos deshidratados se infestan de insectos, por inadecuado envase o manejo; o bien se humedecen, y así facilitan el desarrollo de bacterias, levaduras y mohos. Esto se aplica más especialmente a los alimentos higroscópicos o a los que absorben bien la humedad del aire.

Para más información, véase Vaughn (1951).

Agentes conservadores. Para conservar alimentos, a veces se les agregan substancias químicas, que destruyen los microorganismos o detienen simplemente su desarrollo.

Un antiséptico ideal sería aquel que, sin producir ningún efecto fisiológico perjudicial, matase los microbios o impidiera su reproducción; pero hasta ahora no parece haberse descubierto tal compuesto. Todos los conservadores usualmente empleados ejercen sobre el cuerpo humano alguna acción fisiológica, y, de no usarlos en cantidades minúsculas, pueden ser nocivos.

Las substancias químicas inorgánicas utilizadas comprenden ácido bórico y boratos, ácido nítrico y nitratos, ácido nitroso y nitritos, ácido sulfuroso y sulfitos.

El ácido bórico es un antiséptico débil. Sus soluciones saturadas no destruyen las bacterias; pero impide el desarrollo de la mayoría de ellas, y se emplea a veces para conservar mantequilla.

El color de los tejidos musculares frescos, sin calentar, proviene de la presencia de un pigmento rojo conocido por miohemoglobina o mioglobina; este pigmento, parte integrante del tejido, no pasa a la circulación sanguínea.

Es corriente agregar nitrato sódico y pequeñas porciones de nitrito sódico a soluciones salinas empleadas para adobar carne. Se creía que el nitrato reaccionaba con la hemoglobina de la carne para formar nitroxihemoglobina; hoy se sabe que el nitrito reacciona con la miohemoglobina del músculo para producir nitroximiohemoglobina, así:

$$NO + \text{miohemoglobina} \rightarrow \text{nitroximiohemoglobina}$$

Algunas bacterias contenidas en la carne pueden reducir nitratos a nitritos. Las mismas y otras especies producen, a partir de la carne, pequeñas cantidades de ácidos orgánicos que convierten nitratos y nitritos en ácidos nítrico y nitroso, respectivamente. El ácido nitroso reacciona entonces con la miohemoglobina, para dar nitroximiohemoglobina. Para que la reacción se desarrolle, hace falta una solución ácida. El compuesto resultante da a la carne un color rojo brillante, que hace

más agradable su aspecto. A diferencia del tejido muscular fresco, la carne curada conserva su color rojo al cocerla. El nitrato y el nitrito ejercen asimismo una acción inhibitoria sobre el desarrollo de las bacterias que eventualmente contenga la carne; se ha demostrado que en este sentido es más eficaz el nitrito que el nitrato.

Para adobar carne, Hall (1935) recomendaba un nuevo método. Se servía de una solución con sal, nitrato, nitrito y una pequeña cantidad de ácido cítrico u otro ácido apropiado. La finalidad del ácido es transformar nitrato y nitrito en ácidos nítrico y nitroso; este último puede entonces reaccionar con la miohemoglobina para dar a la carne el color rojo atrayente.

A líquidos alcohólicos, especialmente vinos, se añaden ácido sulfuroso y sulfitos. Agregando sulfito a carne verdosa, descolorida, se devuelve al producto su color rojo primitivo; por eso gozaba de gran popularidad como aditamento a la carne picada hecha de desperdicios. Actualmente la ley prohibe utilizar sulfito con este objeto.

Los productos químicos orgánicos agregados a alimentos comprenden ácido benzoico y benzoatos, ácido salicílico y salicilatos, formaldehído y creosota.

El ácido benzoico y los benzoatos se emplean para conservar vegetales. A veces se añade una pequeña cantidad de benzoato sódico a la salsa de tomate. El ácido salicílico y los salicilatos se aplican como conservadores de frutas y hortalizas. El formaldehido se utilizaba antes para conservar leche y nata, pero hoy lo prohibe la ley. La utilidad del humo de madera para curar carne se debe a la presencia de pequeñas cantidades de creosota que se forman durante la combustión.

Presiones osmóticas altas. Algunos productos alimenticios resisten la acción de microorganismos en presencia de bastante humedad, sobre todo si contienen azúcar o sal a concentraciones elevadas. En general, se dice que estos compuestos actúan exclusivamente por ósmosis, o sea por separarse agua del protoplasma de los gérmenes, con la consiguiente contracción del mismo y muerte de la célula.

Rockwell y Ebertz (1924) comprobaron que el efecto conservador de la sal no provenía sólo de su acción deshidratante. El sulfato magnésico deshidrata las proteínas más intensamente que el cloruro sódico; pero no es tan eficaz como éste para evitar el desarrollo del *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. En opinión de estos autores, la acción conservadora del cloruro sódico respecto a las proteínas abarca otros cuatro factores: 1.º, el efecto directo del ion cloruro; 2.º, la eliminación del oxígeno del medio; 3.º, la sensibilización del germen de ensayo al dióxido de carbono, y 4.º, la interferencia con la rápida acción de enzimas proteolíticas.

No hay prácticamente multiplicación en soluciones de sal al 25 % o más. Las bacterias capaces de resistir presiones osmóticas elevadas

se denominan halófilas; una concentración de 10 % detiene de modo apreciable el desarrollo de la inmensa mayoría de las especies bacterianas, y los microorganismos patógenos son menos resistentes a soluciones salinas fuertes que las bacterias saprófitas. El azúcar de caña, al 60 a 70 %, suele impedir el desarrollo de todos los tipos de gérmenes; a veces se observan mohos vegetantes en la superficie de una mermelada o jalea contenida en un tarro tapado, pero esto obedece a que el agua evaporada del producto, al no encontrar salida, se recondensa y da origen a una capa superficial de solución de azúcar menos concentrada, en la cual pueden reproducirse algunos mohos.

Para matar bacterias o impedir su reproducción hacen falta presiones osmóticas sumamente elevadas, pues estos microorganismos son menos sensibles a los cambios de ósmosis que las células de animales y plantas superiores.

BACTERIOLOGÍA DE LA CARNE

La cuestión de la presencia de gérmenes vivos en los tejidos y la sangre de animales sanos sigue siendo objeto de controversia. Algunos investigadores han señalado tal presencia en tejidos vivos; otros no han logrado confirmarlo. Burn (1934 *a, b*), y Jensen y Hess (1941), han aportado pruebas de que la invasión de tejidos por bacterias se produce durante la agonía y *post mortem*, y no antes.

Autólisis de tejidos. La carne congelada o conservada en frío se puede tener guardada durante mucho tiempo sin que presente signo alguno de deterioro. En cambio, la conservada a temperaturas más altas (refrigerada) se echa a perder al cabo de períodos bastante más breves. Las alteraciones observadas son obra de enzimas autolíticas contenidas en la carne y de las elaboradas por los microorganismos contaminantes. Las proteínas se convierten primero por hidrólisis en aminoácidos, y luego se pudren y desprenden hedores. Una acción breve de las enzimas proteolíticas es beneficiosa, porque ablanda la carne; pero cuando se prolonga, origina su descomposición y putrefacción.

Las bacterias que se encuentran en la superficie de la carne son habitualmente especies de *Achromobacter* y *Pseudomonas*; los mohos corrientes comprenden especies de *Thamnidium, Rhizopus* y *Mucor*. Estos microorganismos, al desarrollarse en la carne, no comprometen probablemente la salud. Los cambios putrefactivos que producen las bacterias son molestos en cuanto a olor y sabor, y el desarrollo de mohos da a la carne un aspecto nada agradable.

En condiciones corrientes, la carne de vaca se conserva entre 2,2 y 3,3° C durante cinco días después de sacrificada. Si ha de madurarse para hacerla más blanda y sabrosa, se guarda a temperaturas bajas

por más tiempo. Por ejemplo, la carne de vaca presenta el mismo grado de blandura después de conservarla a las temperaturas y durante los plazos siguientes (Jensen, 1944):

21	días a	1,1° C
8	días a	4,4° C
5	días a	8,3° C
3	días a	15,6° C

También se ablandan carnes utilizando preparaciones enzimáticas, y con este fin se utilizan muchas enzimas proteolíticas. Se deja actuar la enzima hasta que la carne está adecuadamente tierna, y luego se calienta ésta para destruir la enzima; de otro modo, se vuelve pulposa y butirácea al guisarla, y en tales condiciones resulta organolépticamente desagradable.

Recuento bacteriano en carnes. En estudios efectuados por Weinzirl y Newton (1914 *a, b*) con muestras de carnes adquiridas en el mercado, comprobaron que contenía de 270 000 a 88 000 000 de microorganismos aerobios, lo mismo la carne picada que los tejidos de grandes trozos, y no pudieron juzgar de su calidad por el número de microbios presentes. Otros autores han llegado a una conclusión similar. No parece haber correspondencia entre la población bacteriana y la condición sanitaria de la carne, pues ésta depende no tanto del número como de la clase de los microbios. Algunas muestras con abundantes microorganismos saprófitos pueden no producir efectos perjudiciales cuando se ingieren, y otras que contienen menos ocasionan a veces daño. Al parecer, para apreciar la calidad de la carne, los factores más importantes son el aspecto, el tacto y el olor, que constituyen lo que se llama la prueba organoléptica.

Flora bacteriana de la carne. En la descomposición de la carne intervienen gérmenes aerobios y anaerobios; aquéllos actúan al principio, y crean un ambiente favorable al desarrollo de los segundos, que atacan luego a las proteínas y dan origen a compuestos malolientes. El proceso de la putrefacción en la Naturaleza es obra de microorganismos aerobios y anaerobios, pero el carácter de las transformaciones observadas es más bien anaeróbico.

Los gérmenes que participan en la putrefacción se pueden agrupar como sigue: 1.°, bacilos aerobios grampositivos, esporíparos; 2.°, bacilos aerobios gramnegativos, sin esporas; 3.°, cocos; 4.°, anaerobios, y 5.°, mohos y levaduras.

El primer grupo comprende *Bacillus subtilis, B. cereus, B. megatherium, B. pumilis*, etc., microorganismos saprófitos, que licuan rápidamente la gelatina.

En el segundo grupo figuran *Escherichia coli, Proteus vulgaris, P. mirabilis, Aerobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens,*

P. putrefaciens, etc. Los individuos del género *Proteus* desarrollan una intensa actividad proteolítica, y son capaces de iniciar algunos de los cambios promovidos por anaerobios.

Algunos de los cocos aislados de carnes son *Micrococcus aurantiacus*, *M. candidus*, *M. caseolyticus*, *M. conglomeratus*, *M. flavus*, *M. freudenreichii*, *M. pyogenes* var. *aureus*, *M. varians* y *Sarcina aurantiaca*, todos ellos grampositivos.

Los cambios más pronunciados en las carnes se deben a los microorganismos esporógenos anaerobios. Algunos de los aislados de carnes frescas y alteradas son *Clostridium aerofoetidum*, *Cl. bifermentans*, *Cl. histolyticum*, *Cl. lentoputrescens*, *Cl. cvalare*, *Cl. parabifermentans* y *Cl. sporogenes*. Estos gérmenes ocasionan modificaciones putrefactivas de proteínas, con liberación de compuestos fétidos.

Los mohos encontrados en carnes pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium* y *Sporotrichium*, y de ellos, los que se han aislado con más frecuencia son especies de *Mucor* y de *Penicillium*. Comúnmente, el aire contiene esporas de tales mohos. También se han aislado varias especies de levaduras de carne en refrigeración.

Los mohos son aerobios y se desarrollan en la superficie de la carne o a escasa profundidad. Pueden eliminarse raspando o separando la capa superficial con un cuchillo; si no se detiene su desarrollo, a veces comunican a la carne olores y sabores desagradables.

Cecina de vaca. La carne se deseca para poderla conservar largo tiempo. La cecina de vaca se prepara como sigue: La carne obtenida de reses recién sacrificadas, deshuesada y limpia, se conserva en nevera hasta el momento de su empleo. Generalmente se cura en barriles o en barricas; en el primer caso, por cada 100 Kg de carne se añaden unos cuarenta y cinco litros de salmuera; en el segundo, por cada 100 Kg de carne se emplean de veintiséis a cuarenta litros de adobo. La preparación dura distintos períodos: según la temperatura empleada, unos setenta y cinco a ciento veinte días por lote.

Los lotes de pierna se han de curar bien; de otro modo puede producirse descomposición mientras se deseca y ahúma la carne, que aumenta un 8 % en peso durante el tratamiento. Suele emplearse una salmuera corriente con salitre, pero a menudo se añade algo de azúcar y nitrito sódico. Una solución típica para curar es la siguiente:

	Partes
Cloruro sódico (NaCl)	25
Nitrato sódico ($NaNO_3$)	0,05
Nitrito sódico ($NaNO_2$)	0,10
Azúcar (sacarosa)	4
Agua, c. s. para	100

Una vez curada la carne, se remoja bien, para quitarle el exceso de sal. El agua se mantiene generalmente a una temperatura de 16 a 27° C, y suele renovarse. El tiempo de remojo es de doce a veinticuatro horas, según la clase de carne, la salmuera empleada y el período de salazón, de modo que las carnes muy curadas y saladas se han de remojar más que las sometidas a un tratamiento menos enérgico. El remojo dura menos en verano que en invierno.

La carne queda lista para desecarla, o para desecarla y ahumarla. Para ello se pasa a una cámara seca y calentada por medio de serpentines de vapor o una estufa de aire caliente y provista de buena ventilación para eliminar el aire húmedo. Por este método la desecación puede terminarse en cinco a nueve días. El secadero se mantiene los dos primeros días a unos 57 ó 58° C, y a unos 46° C hasta el final. A veces se deseca y ahúma a la vez, y para ello se produce y distribuye humo de leña o serrín en ahumaderas, a la vez que circula aire caliente para conservar y dar color y sabor a la carne curada. Para ahumar se emplean mucho maderas duras, como las de nogal americano y arce, por el agradable sabor que comunican a la carne. Ésta se conserva no sólo por desecación, sino también por la absorción de gases y humos de creosota, ácido piroleñoso (mezcla de ácido acético, acetona, alcohol metílico, etc.), y otras substancias antisépticas que contiene el humo de madera. Es indispensable desecar bien el producto.

La operación final consiste en enfriar la carne ahumada a una temperatura de 1° C para poderla cortar con facilidad. Las tajadas de fuera tienen menos humedad que las interiores. El producto cortado queda listo para su envase y expendición.

Para más información sobre carnes, véase Jensen (1945, 1949).

Coloración de cecinas. Las cecinas y productos derivados se someten a una especie de alteración bacteriana que oxida el pigmento propio y produce un color verdoso. Según Evans y Niven (1951), los microorganismos que en ello intervienen pertenecen a un grupo de bacterias halófilas negativas a la catalasa, que se desarrollan a bajas temperaturas y oxidan ciertos substratos del producto cárneo, con formación de peróxido de hidrógeno. El más común de los gérmenes productores de este tipo de alteración es un *Lactobacillus* heterofermentativo.

BACTERIOLOGÍA DEL PESCADO

El pescado se echa a perder principalmente a causa de bacterias. Las clases de éstas, y sus características, son de importancia para mejorar los métodos de manipulación y conservación de productos de pescado.

Dyer (1947) aisló 595 microorganismos del bacalao, y comprobó que

en su mayoría eran de los géneros *Achromobacter, Flavobacterium* y *Micrococcus*; otros pertenecían a los grupos *Alcaligenes, Microbacterium, Proteus* y *Pseudomonas*. Un 98 % de las especies producían ácido a expensas de carbohidratos; 60 % disolvían el músculo del pescado; 29 % reducían el óxido de trimetilamina a su base, y 45 % eran cromógenos.

Castell y Anderson (1948) sembraron en un músculo esterilizado de bacalao cultivos puros de bacterias, e incubaron los tejidos a 3° C. Así comprobaron que no tardaban en producir el hedor corriente a corrompido ciertas especies de *Pseudomonas, Proteus, Achromobacter* y *Serratia*. Las de *Micrococcus* y *Flavobacterium* ocasionaban una descomposición más ligera y mucho menos rápida.

Lo mismo que en la carne, los recuentos bacterianos no sirven para evaluar el grado de corrupción de filetes de bacalao fresco (Castell, Anderson y Pivnick, 1948). Estos autores hallaron una correlación muy estrecha entre el número de gérmenes psicrófilos gramnegativos del pescado y el lapso de conservación del mismo en frío; tal correlación se convertía en una «tendencia general» que no siempre era aplicable a muestras individuales, si los recuentos practicados incluían todos los microorganismos desarrollados en placas incubadas a 25° C.

Para más información, véase Castell (1947), Castell, Richards y Wilmot (1949).

BACTERIOLOGÍA DE LA LECHE CONDENSADA AZUCARADA

La leche condensada con azúcar se prepara como sigue: Se pasteuriza leche pura fresca entre 80 y 90° C durante cosa de un minuto, a fin de inactivar las enzimas y matar la mayoría de las bacterias que puedan ocasionar en ella cambios físicos y químicos desagradables. Se añade azúcar (sacarosa) en cristales secos o en solución concentrada hervida. Se calienta la mezcla a presión reducida, de modo que entre en ebullición a una temperatura de 50 a 60° C, con lo que el volumen de la leche queda reducido a un tercio del primitivo, aproximadamente. El producto final contiene un 25 % de agua, 10 % de sacarosa, no menos de 8 % de grasa y 28 % de sólidos totales de la leche, incluida la grasa. La leche ya concentrada y fría se pasa a envases esterilizados, y éstos se tapan.

La leche condensada con azúcar no se esteriliza antes de envasarla, pues la presión osmótica aumentada de la preparación, a causa del azúcar añadido, basta para impedir el desarrollo de la mayoría de los microorganismos. Por eso, únicamente una pequeña proporción de latas de leche azucarada se conservan estériles, y a veces se encuentran algunas con señales de ataque microbiano: fondos abombados por la

presión del gas que los gérmenes producen a expensas de la sacarosa añadida y de la lactosa que normalmente contiene la leche.

Gérmenes de la leche. Los microorganismos aislados de la leche comprenden micrococos, estreptococos, anaerobios, bacilos productores de gases, bacilos aerobios esporíparos, formas termófilas y levaduras. Los cocos se encuentran en casi todas les muestras de leche condensada con azúcar; estos gérmenes pueden sobrevivir a las temperaturas empleadas para elaborarla. Los microorganismos anaerobios causan poco daño, pues sólo se encuentran por excepción en ella, y lo mismo ocurre con los del grupo *Escherichia-Aerobacter,* observados en ocasiones. El medio les es desfavorable, y los bacilos terminan por sucumbir. En latas de leche normal y descompuesta hay casi siempre bacilos aerobios esporógenos, algunos activamente proteolíticos, capaces de provocar transformaciones en las proteínas de la leche; pero es dudoso que produzcan abombamientos en los botes de leche condensada azucarada, ya que estos envases cerrados contienen insuficiente oxígeno y demasiado azúcar para permitir un desarrollo activo. Con frecuencia existen en esta leche bacterias termófilas, que no son activamente proteolíticas ni producen gases, es decir, que no desempeñan función alguna en la peptonización y fermentación de la leche condensada azucarada.

Se cree que las levaduras son los microorganismos que más intervienen en la alteración de la leche condensada; muchas de ellas son fermentadores activos, que atacan la sacarosa y ponen gases en libertad, dando a los botes un aspecto abombado. No todas las especies que se encuentran en la leche son capaces de atacar la sacarosa; a menos que el azúcar esté fermentado, la presencia de levaduras no significa que se hayan producido cambios anormales. Aun los tipos fermentativos vegetan con dificultad, por no serles favorables las condiciones de ambiente. Las levaduras que se encuentran en botes de leche pueden proceder de contaminación del producto fresco o del aire de la fábrica, o del azúcar añadido. Ninguna de las levaduras contenida en la leche se considera peligrosa para el hombre; la leche alterada, aunque debe rechazarse, está prácticamente libre de substancias tóxicas.

BACTERIOLOGÍA DE LOS HUEVOS

Los huevos frescos no están siempre libres de microorganismos. Por ensayos realizados se sabe que un 10 % de los huevos frescos contienen bacterias vivas y viables. Se han aislado gérmenes de claras y yemas; pero la microbiología de los huevos no se ha estudiado lo suficiente ni de modo sistemático para proporcionar una idea exacta de las clases de gérmenes que contienen.

La cáscara de un huevo tiene alrededor de medio milímetro de

grueso, y se compone en gran parte de carbonato cálcico; su estructura es porosa, y los poros son bastante grandes para permitir el paso de gases y de partículas sólidas microscópicas. Cuando se incuban huevos fecundados, a través de estos poros de la cáscara llega al embrión el oxígeno necesario para su desarrollo. En cáscaras de huevo se encuentran siempre microbios en número variable de 400 a 1 600 000 por gramo de cáscara. Los huevos húmedos y sucios se contaminan pronto, pues la humedad ayuda a transportar microorganismos a través de los poros, tanto mohos como bacterias.

Stuart y McNally (1943) han estudiado la flora bacteriana primitiva de la cáscara de huevo normal justamente antes y después del acto fisiológico de la postura, y comprobado que cuando se halla en el oviducto de la gallina normal no está contaminado. Además, al parecer no se contamina tampoco durante la postura, y continúa estéril después de depositado en el nido. A juicio de estos autores, la infección bacteriana de las cáscaras de huevos normalmente puestos puede atribuirse a contacto con material del nido, con las patas o el cuerpo del ave, y con las subsiguientes manipulaciones.

Se ha visto repetidamente que las bacterias pueden atravesar la cáscara del huevo y provocar descomposición durante su almacenaje. Los huevos no deben lavarse nunca (Sayers, 1943); informes obtenidos de especialistas de toda Norteamérica indican que uno de cada cinco huevos ha sido lavado antes de llegar a sus establecimientos. Durante el lavado, las bacterias se introducen en la cáscara o la atraviesan, y terminan por llegar a la clara o la yema. Por consiguiente, el problema de producir y expender huevos limpios, no contaminados, es simplemente sanitario.

En sus estudios acerca del ritmo de penetración de las bacterias a través de la cáscara y la membrana adyacente, Stuart y McNally (1943) frotaron la mitad de la superficie de huevos normalmente limpios y recién puestos con un cultivo de cuarenta y ocho horas de *Pseudomonas aeruginosa*. Se esterilizó cada huevo sumergiéndolo en alcohol de 70 % y quemándolo, antes de recoger y cultivar la yema y la albúmina. Se comprobó que el microorganismo puede atravesar con gran rapidez la cáscara hasta llegar a la membrana cortical. Se recuperó el germen ensayado de 60 % de las membranas, inmediatamente después de la inoculación; después de tres y seis horas de reposo, la recuperación fue de 80 %; y al cabo de dieciocho y veinticuatro horas, se extendió a 95 % de las membranas. Según los autores,

> Parece ser que las bacterias pasan por la cáscara a la membrana con escasa o nula dificultad, pero en la mayoría de los casos se detienen en ella. En un 50 % de los huevos contaminados, como ocurrió en este experimento, la membrana no puede impedir la penetración rápida de algunos gérmenes en la clara y la yema; sin embargo, el huevo parece tener la facultad de destruir por completo los microorganismos invasores en un número apreciable de casos. En estos experimentos así se comprobó, particularmente en cuanto a la membrana cortical y la albúmina.
>
> Se ha demostrado que existe el agente bactericida lisozima en las claras de huevo, y podemos suponer con seguridad que la disminución del número de claras infectadas y de las cifras de recuento en las almacenadas se debe a la acción de esa substancia.

También se ha visto que la membrana cortical contiene una substancia dotada de un efecto bactericida definido frente al *Pseudomonas aeruginosa*. De ello resulta que esta membrana puede ser un factor preventivo de contaminaciones del interior del huevo muy superior a la capa mucoide que cubre la cáscara.

Véase más información en Forsythe, Ayres y Radlo (1953), Miller y Crawford (1953).

Conservación de los huevos. Se siguen varios métodos para conservar huevos: almacenaje en nevera, congelación, desecación, inmersión en silicato sódico disuelto (vidrio soluble), envolvimiento en salmuera o serrín, o en papel parafinado, aplicación de una capa de vaselina o de parafina e inmersión en agua de cal (solución de hidróxido cálcico).

Para conservarlos en nevera los huevos se mantienen a una temperatura aproximada de — 6° C; más abajo de este punto la albúmina experimenta un cambio irreversible, y el huevo no recupera ya su transparencia propia.

Los huevos congelados se conservan a unos — 18° C, o a temperaturas más bajas, hasta el momento de su empleo. Se consumen mucho en confitería, repostería, industrias de pastas para sopa y otras diversas. Se les quita la cáscara, se colocan en grandes recipientes de metal y se congelan; a menudo se separan las yemas y las claras, a fin de emplearlas en diferentes operaciones. Generalmente estos huevos son más baratos que los frescos, por poderse preparar durante los meses de mayor producción.

Según informes de Schneiter, Bartram y Lepper (1943), Jensen (1944), Winter y Wilkin (1947), la destrucción de bacterias en productos de huevos congelados era mayor en las proximidades de — 18° C que a temperaturas más bajas.

Los huevos se pueden desecar enteros, o después de separar las yemas de las claras. En ambas formas se emplean considerablemente, con harinas preparadas para pasteles y buñuelos, para hacer helados, macarrones y otras pastas, y para otros usos semejantes. Los huevos secos se conservan bien en atmósfera seca y fría; la presencia de un poco de humedad en ambiente templado puede bastar para que se desarrollen microorganismos y los estropeen en poco tiempo; por eso conviene almacenar los huevos desecados en lugar frío y a cubierto de un exceso de humedad.

Los otros métodos empleados para conservar huevos tienden a impedir que pase aire (oxígeno) a través de los poros de la cáscara. Sea cual fuere el procedimiento elegido, los huevos han de tenerse en ambiente frío, para evitar su descomposición por las enzimas que normalmente contienen.

INTOXICACIÓN ALIMENTICIA

La intoxicación por alimentos proviene de ingerir substancias nutritivas contaminadas por bacterias o por ciertos productos de excreción denominados toxinas. No comprende el efecto tóxico resultante del consumo de plantas nocivas, tales como setas venenosas, o de mejillones alterados, o de alimentos descompuestos que contengan venenos químicos, ni tampoco las idiosincrasias relacionadas con ciertos venenos vegetales y animales.

Antes se suponía que la intoxicación alimenticia provenía del consumo de alimentos que contenían ciertos compuestos químicos conocidos por tomaínas, palabra procedente del griego y que significa «cuerpo muerto». Se forman tomaínas en carnes putrefactas y en otros alimentos proteínicos; son substancias básicas, y pertenecen al grupo de compuestos denominados aminas. Derivan principalmente de la descarboxilación de aminoácidos. He aquí una reacción típica:

$$\underset{\text{Alanina}}{CH_3 \cdot CHNH_2 \cdot COOH} \rightarrow \underset{\text{Etilamina}}{CH_3 \cdot CH_2NH_2} + CO_2$$

El aminoácido alanina pierde dióxido de carbono y se convierte en la tomaína etilamina. Las tomaínas sólo aparecen en una fase avanzada de la putrefacción; son tóxicas cuando se inyectan en los tejidos, pero apenas existen pruebas de que lo sean cuando se ingieren por la boca. La teoría de la intoxicación por tomaínas es errónea.

El hecho de que los alimentos contengan bacterias no significa necesariamente que sean perjudiciales. Muchos gérmenes saprófitos pueden atacar proteínas y liberar tomaínas durante las últimas fases de la descomposición; sin embargo, la mayoría de las bacterias capaces de tal acción son inofensivas para el organismo cuando entran en él por vía bucal. Las especies putrefactivas, aerobias y anaerobias, que normalmente se encuentran en el intestino humano y pueden provocar las referidas transformaciones, son innocuas si se ingieren con los alimentos.

Gérmenes causales de intoxicación alimenticia. Los microorganismos que principalmente ocasionan genuinas intoxicaciones alimenticias pertenecen a tres tipos bien definidos: 1.º, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*; 2.º, *Clostridium botulinum* (no ovolítico), *C. parabotulinum* (ovolítico); 3.º, miembros del género *Salmonella (S. enteritidis, S. schottmuelleri, S. typhimurium,* etc.). También se han señalado como responsables de brotes de intoxicaciones alimenticias ciertos estreptococos, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris.*

Micrococcus pyogenes var. *aureus.* Algunas cepas de esta variedad pueden vegetar en los alimentos y segregar una toxina soluble. La ingestión de tales alimentos produce una intoxicación, pero los síntomas suelen ser benignos; rara vez se ha visto un caso de fallecimiento por

consumir alimentos contaminados por toxina de *M. pyogenes* var. *aureus* (figura 192).

Según Dack (1946), al cabo de una a cinco horas aparecen síntomas: náuseas, vómitos, espasmos abdominales y diarrea. En algunos casos graves, la incapacidad es considerable; el paciente se halla débil, abatido, y puede sufrir un shock. A veces hay sangre en lo vomitado o en las deposiciones. Los síntomas suelen comenzar a desaparecer a las pocas horas, y la mayoría de los enfermos se reponen por completo en unos días; generalmente no hay fiebre.

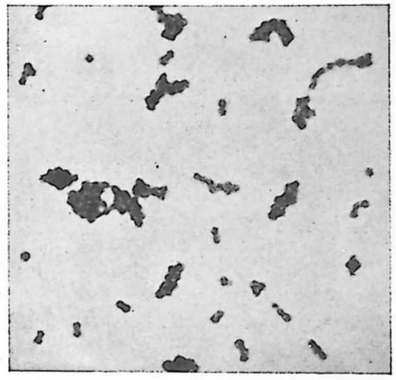


Fig. 192. — *Micrococcus pyogenes* var. *aureus.* Cepa productora de enterotoxina.

Algunas razas de *M. pyogenes* var. *aureus* pueden licuar gelatina, y otras no. Stone (1935, 1939, 1943) supone cierta correlación entre la licuación de gelatina y la capacidad de una cepa bacteriana para producir toxina extracelular. Este autor desarrolló un sencillo método para separar las cepas que licuan gelatina de las que no la digieren. Se siembra en estrías un asa del microorganismo examinado sobre una placa con agar gelatinado que contiene extracto de carne de vaca, y se incuba la placa a 37° C durante veinticinco horas; luego, sobre la superficie del agar, se vierte una solución concentrada de sulfato amónico, y la reacción se produce habitualmente en unos cinco minutos. El sulfato amónico es capaz de precipitar proteína (gelatina) y dar así un aspecto opaco al agar; se digiere la gelatina del contorno inmediato de cada colonia, donde el agar no se opacifica (fig. 193). Una reacción típica muestra zonas claras alrededor de cada colonia, mientras que se ve opaco el resto del agar. El ensayo no revela siempre una perfecta correlación entre la toxigenicidad y la capacidad de una cepa para licuar gelatina.

Chapman (1946) ha informado que todas las razas de *Micrococcus* acusadas de producir brotes locales de intoxicación alimenticia mostraban zonas claras considerables, además de formar pigmento, coagular sangre y fermentar manita.

En un informe posterior, Chapman (1948) da cuenta de un perfeccionamiento que simplifica la técnica del estudio de brotes de intoxicación alimenticia por *Micrococcus,* por el empleo de un medio de la siguiente composición: agua, 1000 ml; *d*-manita, 10 g; triptona Bacto (peptona), 10 g; agar Bacto, 15 g; cloruro sódico, 55 g; extracto de levadura Bacto, 2,5 g; fosfato dipotásico, 5 g; gelatina Bacto, 30 g; sulfato amónico, 75 g, e hidróxido sódico al 10 %, 6 g.

El cloruro sódico permite un aislamiento selectivo de los micrococos, favorece la cromogénesis y es indispensable para coagular la sangre. La manita aumenta la cromogénesis mucho mejor que la lactosa; también la facilita el extracto de levadura más que el de carne de vaca. Además de servir para la reacción de Stone, la gelatina aumenta la propiedad cromogénica de los micrococos. El sulfato amónico se añade directamente al medio para provocar la reacción de Stone; el hidróxido sódico se emplea para neutralizar la acidez del sulfato amónico.

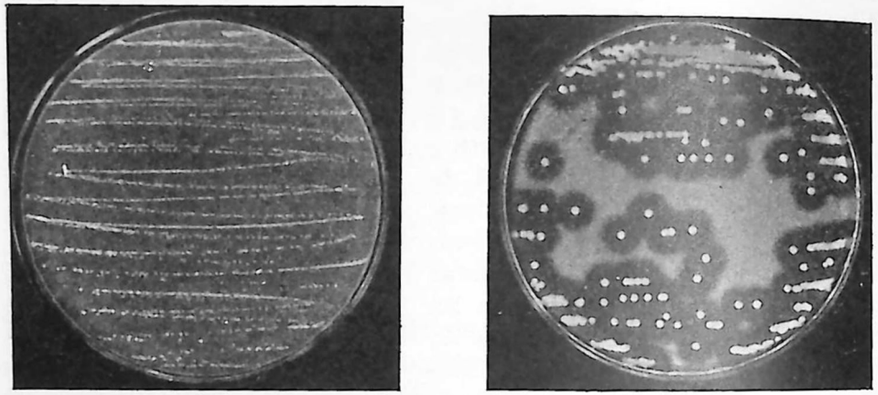


Fig 193. — Izquierda, cepa de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* incapaz de licuar gelatina. Derecha, cepa capaz de licuar gelatina. Se vertió sobre las placas de agar-gelatina una solución concentrada de sulfato amónico, para precipitar la gelatina; las zonas claras en torno a las colonias indican que la gelatina ha sido digerida por una gelatinasa.

Sobre este medio, los micrococos producen un pigmento más intenso que con los métodos de antes, coagulan más rápidamente la sangre, dan la reacción de Stone sin necesidad de cubrir la placa con solución de sulfato amónico y se determina la fermentación de la manita, todo ello en la placa original de aislamiento.

Evans, Buettner y Niven (1950) creen que la prueba de la coagulasa (coagulación de suero sanguíneo) constituye el método más satisfactorio para descubrir si un microorganismo produce enterotoxina. En su opinión, cualquier alimento que contenga un número relativamente elevado de micrococos que reaccionen positivamente con coagulasa debe considerarse peligroso para el consumo humano.

Para más información, véanse Evans y Niven (1950), Hussemann y Tanner (1949).

Especies de Clostridium. Gérmenes de las especies *Clostridium botulinum* y *Cl. parabotulinum* producen su efecto tóxico por segregación de toxinas solubles. Probablemente, estos microorganismos no se reproducen nunca dentro del cuerpo cuando se ingieren con alimentos;

los trastornos que ocasionan son esencialmente intoxicaciones resultantes de la secreción de exotoxinas solubles. Se encuentran esporas de ambas especies en el suelo, y es probable que las contengan muchas clases de alimentos. Si el calentamiento no las destruye, se crean condiciones que habitualmente permiten su germinación; entonces las células vegetativas segregan una potente toxina en el producto alimenticio, y bastará probarlo para que sobrevenga la muerte. La toxina puede atravesar sin alterarse las paredes del estómago y los intestinos, en lo cual difiere de la mayoría de las toxinas bacterianas (fig. 194).



Fig. 194. — Bacilos y esporas de *Clostridium botulinum.*

Especies de Salmonella. Los gérmenes del género *Salmonella* producen principalmente endotoxinas. Se ingieren con los alimentos, y llegan al conducto intestinal sin destruirse. En los intestinos se multiplican y dejan libres sus endotoxinas, después de muertas y digeridas las células bacterianas (fig. 195).

Cherry, Scherago y Weaver (1943) examinaron 250 muestras de diversos tipos de carnes obtenidos de detallistas, y comprobaron que 5,2 % de ellas contenían especies de *Salmonella*; al parecer, el origen más probable de los gérmenes se halla en los animales que proporcionaron la carne.

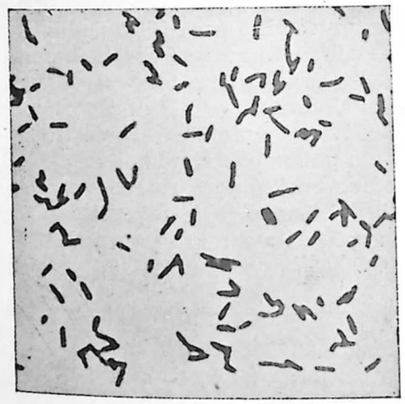


Fig. 195. — *Salmonella enteritidis*, microorganismo que se reproduce en el conducto intestinal y provoca intoxicación alimenticia por elaborar una endotoxina.

Solowey, Rosenstadt, Spaulding y Chemerda (1948) han informado que en cada una de 171 muestras de polvo integral de huevo nebulizado se identificaron serológicamente de 2 a 30 porciones de colonias con presunta reacción positiva de *Salmonella*. Los datos demuestran que el huevo en polvo se halla contaminado muchas veces por más de un tipo de este género; en general, la probabilidad de aislar más de un tipo por muestra aumenta con el número de porciones de colonias supuestamente positivas identificadas por muestra.

Carter, Powell y Borts (1950) han examinado 186 muestras de huevo y hallaron 6 positivas (3,2 %). De una de las muestras se aisló *Salmonella schottmuelleri*, y de las otras cinco, *S. pullorum*. La contaminación sólo podía provenir del contenido o la cáscara de los huevos.

TABLA 38

Intoxicación alimenticia general	Botulismo
Período de incubación	
Por lo general, 2 a 4 horas con toxina de *Micrococcus*; si pasa de 12 horas, bacilos de *Salmonella.*	Regularmente de 24 a 48 horas.
Tratamiento	
De sostén y eliminatorio.	Antitoxina botulínica, tipo específico; reposo absoluto; eliminatorio.
Método de investigación	
1. Emplear el período de incubación como base para determinar el alimento causante. 2. Sospéchese siempre de alimentos recién cocinados o templados, tartas, pasteles, carnes picadas, etc. Las conservas no suelen estar averiadas. Los alimentos están generalmente bien de sabor, aspecto, olor y contextura. 3. Examen bacteriológico de heces del paciente y del alimento sospechoso, en cuanto a *Salmonella, Micrococcus* y otros gérmenes. 4. Investigación bacteriológica y epidemiológica de portadores humanos, y posible contaminación de origen animal. 5. Complicaciones: apendicitis, colecistitis, hipertermia persistente (infección paratifoide).	1. Emplear el período de incubación como base para determinar el alimento causante. 2. Sospéchese siempre de alimentos en conserva, así como de productos cárneos en embutido. Muchas veces se advierte la alteración de los alimentos. 3. Investíguese si hay toxina en el alimento sospechoso, mediante inoculación a animales: ratones, cobayos o conejos. Precisar el tipo con antitoxina específica. Cultivos del alimento sospechoso en busca de esporas, sobre todo si se ha hervido antes. 4. Examinar animales domésticos, como pollos con síntomas de laxitud de cuello, para corroborar datos del campo y de laboratorio. 5. Complicaciones: bronconeumonía.
Sintomatología	
Ataque repentino; náuseas, vómitos, dolores abdominales, decaimiento, diarrea y aumento de temperatura. Mortalidad, 0 a 1 %. Índice elevado de infecciosidad.	Ataque diferido; debilidad muscular manifiesta; escasos síntomas intestinales; trastornos visuales, con diplopía y blefaroptosis; disfagia y dislalia; estreñimiento, pulso acelerado e hipotermia; raramente dolor; muerte por colapso respiratorio. Mortalidad, más de 60 %. Índice habitual de infecciosidad, 100 por 100.

Estos resultados subrayan que el peligro potencial de infección por comer huevos crudos es mayor de lo que se creía hasta ahora.

Los alimentos en conserva estropeados, o los sospechosos de alteración, no deben probarse siquiera. Si el recipiente está contaminado por *Cl. botulinum,* una porción diminuta del alimento puede contener suficiente toxina para causar la muerte. El alimento sospechoso no debe darse a animales ni a pollos, que pueden ser muy sensibles a la toxina; las conservas estropeadas deben someterse a intensa cocción para destruir la secreción tóxica bacteriana.

Según Meyer y Geiger (1942), en la tabla 38 se exponen el período de incubación, el tratamiento, el método de investigación y la sintomatología de los tres principales tipos de gérmenes productores de intoxicaciones alimenticias.

Enterococos. Osler, Buchbinder y Steffen (1948) señalan la presencia de síntomas de trastornos gástricos o intestinales agudos, o de ambos, en 6 o acaso 7 de 26 personas que voluntariamente ingirieron alimentos en los cuales se habían cultivado razas de *Streptococcus faecalis* durante cinco horas. No han dado resultado los intentos de provocar síntomas similares en el hombre con cultivos de veinte horas.

En otro informe, Buchbinder, Osler y Steffen (1948) presentan nuevas pruebas en el sentido de que el enterococo *(S. faecalis)* es tal vez el microorganismo causante de varios brotes de intoxicación alimenticia relativamente benigna; los alimentos eran en este caso productos lácteos y carnes.

Véase más información en American Can Company (1943), Dack (1943), Dack, Niven, Kirsner y Marshall (1949), Dewberry (1943), Dolman (1943), *U.S. Public Health Bull.* 280 (1943), Sipegelberg (1944), y Tanner (1944).

REFERENCIAS

American Can Company: «The Canned Food Reference Manual», Nueva York, 1943.

Ball, C. O.: Processing food for sterilization, *Food Industries,* **19**: 44, 174, 338, 1947.

Brady, D. E., G. V. Hoover, y L. N. Tucker: Storage of frozen meats, poultry, eggs, fruits, and vegetables, *Agri. Exp. Sta., Columbia, Mo., Research Bull.,* 440, 1949.

Buchbinder, L., A. G. Osler, y G. I. Steffen: The isolation of enterococci from foods implicated in several outbreaks of food poisoning, *Pub. Health Reports,* 63: 109, 1948.

Burn, C. G.: Experimental studies of postmorten bacterial invasion in animals, *J. Infectious Diseases,* 54: 388, 1934*a*.

—: Postmorten bacteriology, 54: 395, 1934*b*.

Carter, M. J., M. P. Powell, y I. H. Borts: *Salmonella in* hen eggs, *Pub. Health Reports,* 65: 778, 1950.

Castell, C. H.: Differentation of marine and nonmarine cultures of *Pseudomonas, J. Fisheries Research Board Can.,* 7: 162, 1948.

— y G. S. Anderson: Bacteria associated with spoilage of cod fillets, *ibid.,* 7: 370, 1948.

Castell, C. H., y H. Pivnick: Relation of bacterial counts to quality of cod fillets, *ibid.*, **7**: 378, 1948.
—, J. F. Richards, e I. Wilmot: *Pseudomonas putrefaciens* from cod fillets, *ibid.*, **7**: 430, 1949.
Chapman, G. H.: A single culture medium for selective isolation of plasma-coagulating staphylococci and for improved testing of chromogenesis, plasma coagulation, mannitol fermentation and the Stone reaction, *J. Bact.*, **51**: 409, 1946.
—: An improved Stone medium for the isolation and testing of food-poisoning staphylococci, *Food Research*, **13**: 100, 1948.
Cherry, W. B., M. Scherago, y R. H. Weaver: The occurrence of *Salmonella* in retail meat products, *Am. J. Hyg.*, **37**: 211, 1943.
Dack, G. M.: «Food Poisoning», Chicago, University of Chicago Press, 1943.
—: *Staphylococcus* food poisoning still a serious problem, *Food Industries*, **18**: 1868, 1946.
—, C. F. Niven, Jr., J. B. Kirsner, y H. Marshall: Feeding tests on human volunteers with enterococci and tyramine, *J. Infectious Diseases*, **85**: 131, 1949.
Dewberry, E. B.: «Food Poisoning. Its Nature, History, and Causation. Measures for Its Prevention and Control», Londres, Leonard Hill, Ltd., 1943.
Dolman, C. E. Bacterial food poisoning, *Can. J. Pub. Health*, **34**: 97, 205, 1943.
Dyer, F. E.: Microorganisms from Atlantic cod, *J. Fisheries Research Board Can.*, **7**: 128, 1947.
Evans, J. B., L. G. Buettner, y C. F. Niven, Jr.: Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning, *J. Bact.*, **60**: 481, 1950.
— y C. F. Niven, Jr.: A comparative study of known food-poisoning staphylococci and related varieties, *ibid.*, **59**: 545, 1950.
— y —: Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products, *ibid.*, **62**: 599, 1951.
Forsythe, R. H., J. C. Ayres, y J. L. Radlo: Factors affecting the microbiological populations of shell eggs, *Food Technol.*, **7**: 49, 1953.
Gross, C. E., C. Vinton, y S. Martin, Jr.: Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats. IV. Viability of spores of a putrefactive anaerobic bacterium in canned meat after prolonged incubation, *Food Research*, **11**: 399, 1946.
—, —, y C. R. Stumbo: Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats. V. Characteristics of putrefactive anaerobe used in thermal resistance studies, *ibid.*, **11**: 405, 1946*a*; VI. Thermal death-time curve for spores of test putrefactive anaerobe in meat, *ibid.*, **11**: 411, 1946*b*.
Haines, R. B., y E. M. L. Elliot: Some bacteriological aspects of dehydrated foods, *J. Hyg.*, **43**: 370, 1944.
Hall, L. A.: Acid cure for meat, *Food Industries*, **7**: 533, 1935.
Hartsell, S. E.: The longevity and behavior of patogenic bacteria in frozen foods: the influence of plating media, *Am. J. Pub. Health*, **41**: 1072, 1951.
Hussemann, D. L., y F. W. Tanner: A comparison of strains of staphylococci isolated from foods, *Food Research*, **14**: 91, 1949.
Jensen, L. B.: «Microbiology of Meats», Champaign, III, The Garrard Press, 1945.
—: Microbiological problems in the preservaton of meats, *Bact. Rev.*, **8**: 161, 1944.
—: «Meat and Meat Foods», Nueva York, The Ronald Press Company, 1949.
— y W. R. Hess: A study of ham souring, *Food Research*, **6**: 273, 1941.
Mackintosh, D. L., G. E. Vail, y G. A. Filinger: Preserving foods by freezing, *Kansas Agr. Exp. Station, Circ.* 249, 1949.
Meyer, K. F., y J. C. Geiger: Food Poisoning. From «Home Canning», by W. V. Cruess y A. W. Christie, *Univ. Calif. Agr. Exp. Sta. Circ.* 276, 1942.
Miller, W. A., y L. B. Crawford: Some factors influencing bacterial penetration of eggs, *Poultry Sci.* 32: 303, 1953.
Oser, B. L.: How foods spoil, *Food Industries*, **18**: 1683, 1946.
Osler, A. G., L. Buchbinder, y G. I. Steffen: Experimental enterococcal food poisoning in man, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**: 456, 1948.

Rockwell, G. E., y E. G. Ebertz: How salt preserves, *J. Infectious Diseases*, **35**: 573, 1924.
Sayers, C. W.: Rotting in eggs, *Agr. Gaz. N. S. Wales*, **54**: 292, 1943.
Schneiter, Roy, M. M. T. Bartram, y H. A. Lepper: Bacteriological and physical changes occurring in frozen egg, *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, **26**: 172, 1943.
Sognefest, P., G. L. Hays, E. Wheaton, y H. A. Benjamin: Effect of pH on thermal process requirements of canned foods, *Food Research*, **13**: 400, 1948.
Solowey, M., A. Rosenstadt, E. H. Spaulding, y C. Chemerda: Occurrence of multiple *Salmonella* types in spray-dried whole-egg powder, *Poultry Sci.*, **27**: 12, 1948.
Spiegelberg, C. H.: *Clostridium pasteurianum* associated with spoilage of an acid canned fruit, *Food esearch*, **5**: 115 1940*a*.
—: Some factors in the spoilage of an acid canned fruit, *ibid.*, **5**: 439, 1940*b*.
—: Sugar and salt tolerance of *Clostridium pasteurianum* and some related anaerobes, *J. Bact.*, **48**: 13, 1944.
Stone, R. V.: A cultural method for classifyng staphylococci as of the «food poisoning» type, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **33**: 185, 1935.
—: A *Staphylococcus* index for routine control of food production, *Proc. 6th Pacific Sci. Congr.*, **5**: 395, 1939.
—: Staphylococcic food-poisoning and dairy products, *J. Milk Technol.*, **6**: 7, 1943.
Stuart, L. S., y E. H. McNally: Bacteriological studies on the egg shell, *U.S. Egg Poultry Mag.*, **49**: 28, 45, 1943.
Stumbo, C. R.: Bacteriological considerations relating to process evaluation, *Food Technol.*, **2**: 115, 1948*a*.
—: A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in the higher ranger, *ibid.*, **2**: 228, 1948*b*.
—: Further considerations relating to evaluation of thermal processes in foods, *ibid.*, **3**: 126, 1949.
—, C. E. Gross, y C. Vinton: Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats, *Food Research*, **10**: 260, 1945*a*; II. Influence of meat-curing agents upon thermal resistance of spores of a putrefactive anaerobic bacterium in meat, *ibid.*, **10**: 283, 1945*b*; III. Influence of meat-curing agents upon growth of a putrefactive anaerobic bacterium in heat-processed meat, *ibid.*, **10**: 293, 1945*c*.
Tanner, F. W.: «Microbiology of Foods», Champaign, Ill., The Garrard Press, 1944.
U.S. Public Health Service: «Ordinance and Code Regulating Eating and Drinking Establishments», *Public Health Service* 37, Federal Security Agency, 1943.
Vaughn, R. H.: The microbiology of dehydrated vegetables, *Food Research*, **16**: 429, 1951.
Vinton, C., S. Martin, Jr., y C. E. Gross: Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats. VII. Effect of substrate upon thermal resistance of spores, *Food. Research*, **12**: 173, 1947*a*; VIII. Thermal resistance of spores normally present in meat, *ibid.*, **12**: 184, 1947.
Weinzirl, J., y E. B. Newton: Bacteriological methods for meat analysis, *Am. J. Pub. Health*, **4**: 408, 1914*a*.
— y —: Bacteriological analyses of hamburger steak with reference to sanitary standars, *ibid.*, **4**: 413, 1914*b*.
Winter, A. R., y M. Wilkin: Holding, freezing, and storage of liquid egg products to control bacteria, *Food Freezing*, p. 338, abril, 1947.

CAPÍTULO XXIV

BACTERIOLOGÍA DEL SUELO

Es del dominio general que el suelo se deriva de rocas meteorizadas. Sin embargo, una masa de estas rocas no se trasforma en suelo sin que intervengan procesos vivos. El suelo ha estado sometido a la acción del aire y del agua, que han alterado y eliminado algunos de los componentes primitivos, de modo que las proporciones de las diversas substancias ya no son las mismas de la roca original. Las partículas minerales constituyen la base o el fundamento del suelo, pero no su totalidad (figura 196, de Williamson, 1951).

Toda clase de suelo tiene su propia individualidad. El rasgo distintivo de ella es el perfil del suelo, que consiste en una serie de estratos diferentes entre sí por el color, la organización, la estructura, etc. Cada estrato se denomina horizonte, y la sucesión de estratos, hasta llegar a la roca meteorizada, constituye el perfil completo del suelo. Este perfil se estudia mejor cuando no ha intervenido el cultivo, porque los horizontes próximos a la superficie se destruyen por la mezcla provocada por las labores agrícolas.

MICROORGANISMOS DEL SUELO

En términos generales, el suelo es un excelente medio de cultivo para numerosos microorganismos, en particular si está cultivado o mejorado. En la vida microscópica del suelo hallamos bacterias, levaduras, mohos, algas, diatomeas y protozoos; estos últimos comprenden amebas, flagelados, ciliados y rotíferos. También lo habitan diversos nemátodos, insectos, etc.

Según McCalla y Goodding (1951), cada cucharada de suelo laborable puede contener billones de organismos microscópicos vivos. Multiplicando esta cifra por el número de cucharadas de suelo que comprende una hectárea, resultan guarismos astronómicos. Las bacterias contenidas en 40 áreas de suelo medianamente fértil pesarían aproximadamente lo mismo que una vaca lechera de regular tamaño. La masa bullidora de

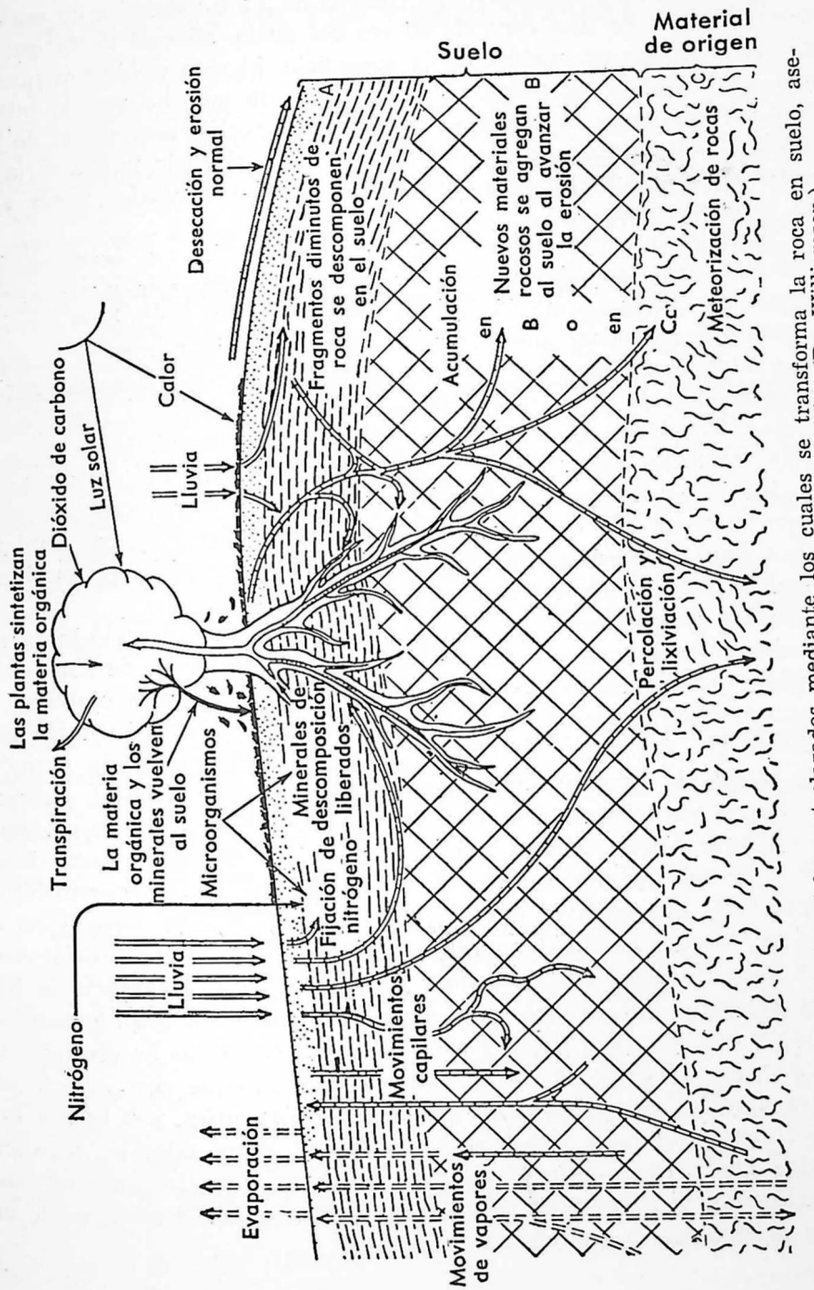


Fig. 196. — Esquema de los ciclos entrelazados mediante los cuales se transforma la roca en suelo, asegurando la persistencia de éste y la de una capa de vegetación. (De Williamson.)

los microorganismos compone una cosecha de 3 a 5 toneladas en esa extensión, dentro de una capa de 30 cm del suelo, además de la que el agricultor recoge de encima de la superficie. Si esta población microbiana soterrada no se nutre adecuadamente, la cosecha visible puede sufrir por efecto de la competencia o de otra acción perjudicial de los microbios. Sin la vida de esos diminutos seres, el suelo nunca sería el sistema dinámico perpetuo que sustenta todos los vegetales, y con ello toda la vida animal.

Como la mayoría de los habitantes del suelo son aerobios, los microorganismos abundan más en los estratos superficiales, y van disminuyendo en número a medida que se profundiza. Un suelo bien aireado contiene más gérmenes que otro pobre en oxígeno. El número y la clase de los microorganismos terrícolas dependen de la naturaleza del suelo, la profundidad, la estación del año, el grado de cultivo, la reacción, la cantidad de materia orgánica, la temperatura, la humedad, etc.

Hay métodos disponibles para contar los microbios del suelo y para aislar las distintas especies en cultivos puros. Como los microorganismos pueden diferir mucho en sus necesidades de desarrollo, hay que emplear muchos tipos de medios nutritivos. Los gérmenes pueden ser aerobios, anaerobios o facultativos.

Muchas de las especies de microbios que viven en el suelo lo hacen asociados a otros, y se suponen frecuentes los fenómenos de simbiosis, sinergia y comensalismo. Dos especies que vegetan juntas elaboran a menudo catabolitos que ninguna de ellas es capaz de producir cuando se cultiva por separado. Un producto del metabolismo de un germen puede servir de alimento para otra especie. Por lo general, existen microorganismos antagónicos, que luchan contra otras especies, en particular contra ciertos gérmenes muy patógenos para las plantas. Esto explica por qué es sumamente difícil determinar, por experimentos de laboratorio con cultivos puros, lo que realmente sucede en el suelo (véase en el cap. XVIII el estudio de los diversos tipos de asociación).

En general, para la propagación y separación de la mayoría de los microorganismos que existen en el suelo se emplean los mismos medios y métodos que para el cultivo y aislamiento de bacterias heterotróficas. Sin embargo, el suelo contiene algunas especies que son específicas y no se desarrollan en los medios nutritivos corrientes, por lo que ha de recurrirse a medios y métodos especiales; entre ellas se cuentan bacterias simbióticas o no simbióticas fijadoras de nitrógeno, formas sulfooxidantes y reductoras de sulfatos y otras que descomponen la urea o la celulosa, o que oxidan amoníaco.

FUNCIONES DE LOS GÉRMENES DEL SUELO

Una de las funciones más importantes de los microorganismos terrícolas consiste en descomponer diversas clases de materia orgánica de origen vegetal o animal: estiércol de establo, abonos verdes, rastrojos, raíces, fertilizantes orgánicos y otros productos. La descomposición de tales compuestos es resultado de las actividades de bacterias, mohos, protozoos, vermes y otros organismos presentes en el suelo; cada grupo selecciona ciertos componentes de la materia orgánica apropiados para sintetizar su propio y característico protoplasma.

Los compuestos orgánicos que se incorporan al suelo en virtud de acciones biológicas comprenden varios azúcares, aminoácidos, pentosanas (cuerpos que ceden pentosas al hidrolizarse), celulosas, ligninas, proteínas, grasas, ceras, taninos y pigmentos. Los microorganismos del suelo descomponen estas substancias, y dejan en libertad sus componentes orgánicos e inorgánicos solubles. Algunos de los cuerpos inorgánicos, sobre todo el amoníaco, pueden ser utilizados por los vegetales como fuentes de nitrógeno.

Los materiales orgánicos, en particular el estiércol y los abonos verdes, parecen producir distintos efectos sobre los procesos desarrollados en el suelo y el desarrollo de las plantas:

1.º Proporcionan a los vegetales substancias nutritivas inorgánicas, especialmente nitrógeno y fósforo.
2.º Modifican las condiciones físicas del suelo, sobre todo las propiedades atemperantes y de retención de humedad.
3.º Suministran ciertos elementos específicos que pueden limitar el crecimiento de algunas plantas.
4.º Favorecen el desarrollo de microorganismos que segregan substancias adversas al desarrollo de ciertas formas específicas fitopatógenas.

Biología del suelo. La estructura del suelo ejerce una influencia apreciable sobre la erosión terrestre, la absorción de agua y el desarrollo de los productos agrícolas. Un suelo granular estable favorece la captación de aguas, el avenamiento y la aireación, y contribuye a la actividad benéfica de los microbios, mientras que, si es disperso o compacto, presenta un ritmo de infiltración más lento. Las mieses son más exuberantes en suelos granulares abonados, bien aireados y desecados. El factor más importante para mantener o mejorar la granulación del suelo es la presencia de microorganismos y de sus productos de descomposición.

Según McCalla (1946 *a*),

> Las plantas en desarrollo y los microorganismos constituyen la fase viva del suelo. En ella existen bacterias vivientes y muertas, virus, bacteriófagos, hongos, algas, protozoos, lombrices de tierra, nemátodos e insectos. Estos

organismos tienen numerosos sistemas enzimáticos capaces de producir substancias aprovechables por parte de las plantas en proceso de crecimiento, por descomposición de algunos de los muchos compuestos orgánicos del suelo.

Físicamente, un suelo de buena calidad se compone de un 5 % en peso de materia orgánica y 95 % de materia inorgánica. La influencia de la pequeña cantidad de substancia orgánica no guarda proporción con su peso, y

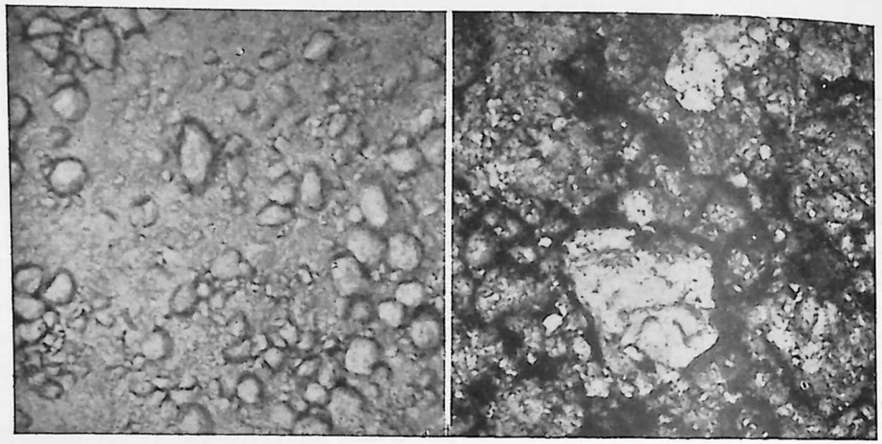


Fig. 197. — Estructura del suelo desarrollada por hongos. Izquierda, löss de Peoria sin tratamiento. Derecha, löss de Peoria en el que se ha estimulado intensamente el desarrollo de hongos. (Según McCalla, con licencia de Soil Conservation Service.)

se relaciona más directamente con el volumen que ocupa. Esta fracción orgánica del suelo se compone de residuos vegetales y animales en todas las fases de descomposición.

Los microorganismos y sus productos metabólicos participan en la formación y estabilización de la estructura de la tierra, si bien intervienen más en la estabilización que en la formación. Una buena estructura del suelo es esencial para la integración y actividad uniforme de los múltiples gérmenes que lo habitan. Los beneficiosos desintegran residuos animales, liberan substancias nutritivas de las plantas y producen otras que estabilizan la estructura del suelo (fig. 197). Si esta estructura desmerece, cesan las actividades de los grupos beneficiosos y aumenta el desarrollo de grupos microbianos que dan fin de las substancias nutritivas y originan, en condiciones anaerobicas, un medio desfavorable para las raíces de los vegetales.

La estructura del suelo influye de numerosos modos en el desarrollo de las plantas. Por ejemplo, aumenta la absorción de agua y el avenamiento; afecta directamente a diversas fases de la vegetación, como penetración, aireación y sujeción de las raíces; interviene en la actividad biológica; fijación de nitrógeno, nitrificación y descomposición de materia orgánica. Una buena estructura reduce al mínimo los procesos de los microorganismos anaerobios, tales como reducción de sulfatos o nitratos a formas aprovechables o tóxicas para las plantas.

Puede mantenerse una estructura conveniente del suelo por medio de una rotación que comprenda una cosecha de hierba y el uso liberal frecuente de estiércoles y residuos de la recolección.

Véase más información en McCalla (1945, 1946b, 1947, 1950).

Ciclo del nitrógeno. El nitrógeno es la clave de las necesidades plásticas de todos los organismos vivientes, y por ello ha de considerarse indispensable para el desarrollo de bacterias y otros microorganismos.

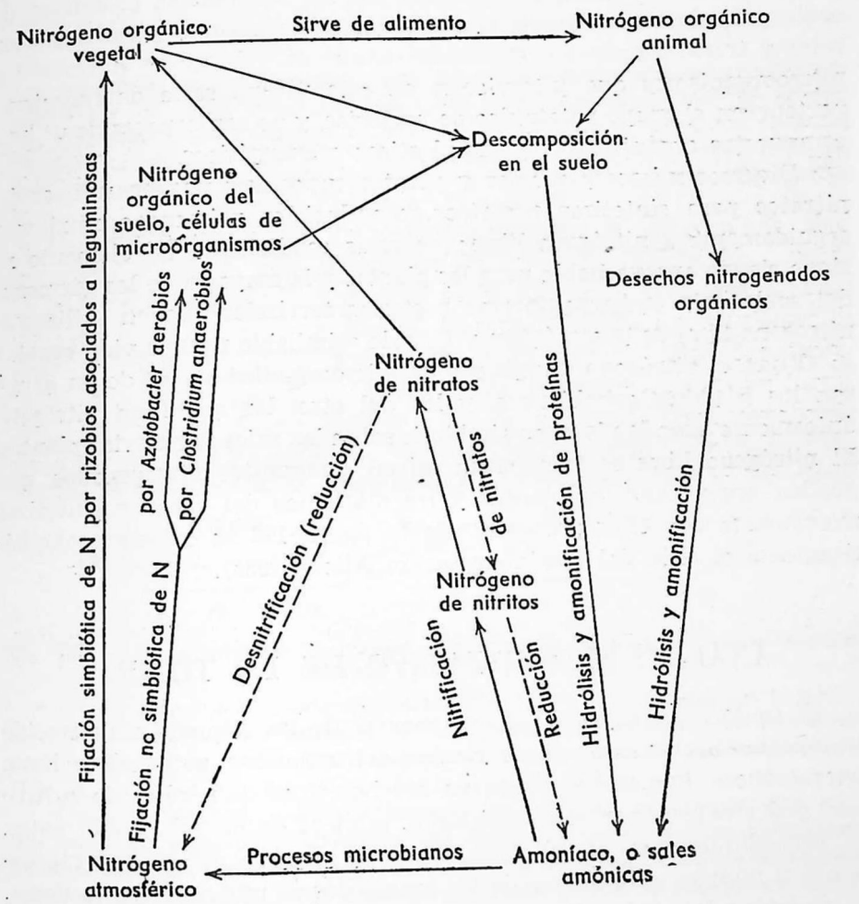


Fig. 198. — Ciclo del nitrógeno. (Según Allen.)

Sin una provisión disponible de este elemento, la vida no podría continuar.

En el suelo se desarrolla constantemente una transformación de nitrógeno a cargo de diversos grupos de microbios. La primera fase de la degradación de proteínas es una hidrólisis de las moléculas en sus materiales constitutivos, o aminoácidos. Éstos se desaminan luego, con liberación de amoníaco:

1. Proteínas + H_2O → aminoácidos.
2. Aminoácidos + H_2O → amoníaco + residuo de carbono.

Después de desprenderse el amoníaco de diversos compuestos nitrogenados, puede ser asimilado por microorganismos del suelo para sintetizar nuevamente proteínas, o consumido por plantas superiores como provisión de nitrógeno, o absorbido por las substancias coloidales del suelo y fijado como amoníaco, o aprovechado por otros gérmenes terrícolas y transformado por oxidación en nitritos y luego en nitratos. Los microorganismos que intervienen en esta última serie de reacciones pertenecen al grupo autotrófico de bacterias, y no son capaces de utilizar compuestos orgánicos con fines plásticos o energéticos.

Diversos microorganismos y plantas superiores pueden utilizar los nitratos para sintetizar proteínas, o reducirlos primero a nitritos y seguidamente a nitrógeno libre; en estas condiciones, tal elemento no sigue siendo aprovechable para las plantas y la mayoría de los gérmenes del suelo; sin embargo, ciertas bacterias terrícolas pueden utilizar el nitrógeno libre de la atmósfera y hacerlo asimilable para la vida vegetal.

Fijan el nitrógeno dos grupos de microorganismos; los de un grupo son los fijadores asimbióticos, y los del otro, los que fijan nitrógeno únicamente cuando viven en simbiosis sobre las raíces de ciertas plantas. El nitrógeno libre se transforma así en compuestos nitrogenados, que pueden aprovechar las plantas y los microbios del suelo y sintetizar nuevamente con ellos proteínas. En la figura 198 se expone esquemáticamente el ciclo del nitrógeno, según Allen (1935).

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA TIERRA

El suelo constituye el asiento natural de un número muy crecido de especies bacterianas, desde formas estrictamente autotróficas hasta heterotróficas. Por eso se necesitan muchos tipos de medios de cultivo para poder determinar con precisión el número de microbios existentes. Tal procedimiento no es aplicable cuando se requiere determinar rápidamente el número aproximado de los contenidos en una muestra de tierra.

Coloides del suelo. Los microorganismos bacterianos se encuentran sobre todo en la capa de materia coloidal que envuelve las partículas de tierra. Conn y Conn (1940), McCalla (1940) y otros autores han observado que las bacterias crecen mejor en arcilla coloidal que cuando ésta les falta. McCalla atribuye el estímulo del desarrollo bacteriano al efecto catalítico de la arcilla como acelerador de reacciones bioquímicas, ya por hacer más eficaz el consumo de substancias nutritivas, ya por absorber productos de desecho y disminuir así sus efectos tóxicos.

Las bacterias en contacto con los coloides del suelo adsorben cationes. En condiciones normales, el material sólido de la tierra constituye un 80 %, y el agua, aproximadamente, el otro 20 %; esta última se halla en torno a las partículas del suelo y entre ellas. Es de presumir que

las bacterias viven normalmente en las películas de agua adheridas a los corpúsculos coloidales que contienen iones adsorbidos. A este propósito dice McCalla:

La célula bacteriana se halla indudablemente muy próxima a las partículas del suelo, y, admitiendo que las bacterias puedan adsorber iones y retener algunos en su superficie, esto ha de permitir un intercambio por contacto de los iones adsorbidos. De éstos se superpondrán los que posean gran volumen de oscilación, y el intercambio será fácil entre los distintos sistemas; en cambio, no puede esperarse que se alejen de la superficie del coloide los iones fuertemente adsorbidos. A base de la traslación del azul de

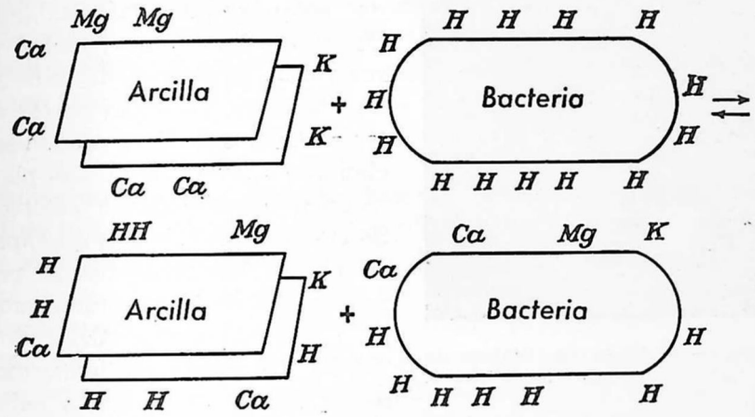


Fig. 199. — Mecanismo de intercambio iónico entre bacterias del suelo y arcilla coloidal. (Según McCalla.)

metileno retenido por adsorción, es de suponer que los iones son adsorbidos por las bacterias desde los coloides del suelo por el siguiente orden: $H > Al > Fe > Mn > Ba > Ca > Mg > K > NH_4 > Na$.

De estos hechos, y de consideraciones teóricas, se deduce que en la adsorción de principios nutritivos del suelo por parte de las bacterias, y posiblemente de las células vivas en general, se produce un canje de bases adsorbidos entre ellas y los coloides del suelo, según se expone en la figura 199. En el metabolismo bacteriano se forman grandes cantidades de dióxido de carbono y agua; en presencia de ésta se forman iones H a expensas del dióxido de carbono que pueda quedar adsorbido en la superficie de la célula. Cuando una partícula de arcilla coloidal, saturada de bases por adsorción, se pone en contacto con una bacteria saturada de hidrogeniones, se establece un intercambio de iones hasta alcanzar un equilibrio; y como este equilibrio se altera al consumirse por completo los iones básicos adsorbidos en el metabolismo bacteriano, puede producirse un nuevo intercambio, y la arcilla coloidal funciona como reserva constante de iones básicos utilizados en el desarrollo de tales microorganismos.

Es difícil eliminar o separar los microorganismos de esta capa coloidal; por eso, el número de colonias que aparezca en una placa de agar no da idea exacta de la población de una muestra de tierra.

Y tampoco hay un solo medio de cultivo satisfactorio para el desarrollo de todas las especies que el suelo contiene.

Para la determinación cuantitativa de los microorganismos del suelo se emplean generalmente dos métodos: el de la placa y el microscópico directo.

Método de la placa. Es el más usado, y consiste en lo siguiente: Se pesa una muestra de tierra y se mezcla con un volumen conocido de agua esterilizada; se agita bien, para separar el mayor número posible de microbios de la capa coloidal que envuelve las partículas de tierra. De esta suspensión se suelen preparar varias diluciones, de cada una de las cuales se trasladan partes alícuotas a platillos de Petri, donde se mezclan con agar fundido. Las placas se incuban durante dos a catorce días. Se cuentan las colonias que aparecen en ella y los recuentos se reducen a número de microorganismos por gramo de tierra (fig. 200).



Fig. 200. — Análisis cuantitativo de tierra por el método de la placa.

Pueden emplearse numerosos medios para aislar bacterias del suelo. Uno que contenga algo de materia orgánica resulta más satisfactorio que otro con abundancia de ella. Los medios peptonados son particularmente malos, pues la peptona permite el desarrollo excesivo de gérmenes esporógenos y de *Pseudomonas* proteolíticos que no dejan prosperar las colonias de bacterias más comunes, pero de vegetación más lenta. Tampoco da buen resultado la incubación a temperatura superior a 25° C.

Objeciones al método. La enumeración de los gérmenes del suelo por este método implica varios errores muy graves. Las condiciones no favorecen el desarrollo de los microorganismos anaerobios; las bacterias autotróficas no se reproducen en un medio orgánico; los gérmenes asimbióticos fijadores de nitrógeno sólo medran hasta cierto punto; muchos de los microbios que descomponen la celulosa no crecen en los medios comúnmente usados, y los que reducen sulfatos lo hacen sólo en un medio sintético sulfatado. Los recuentos obtenidos por este método representan únicamente una parte de la población bacteriana total del suelo; sin embargo, dan una idea del número de microorganismos del suelo capaces de desarrollarse en un medio de agar nutritivo.

La temperatura a que se conservan las tierras influye mucho en el número de gérmenes que se desarrollan en platillos de agar. Greaves y Jones (1944) almacenaron tierras, durante veinticuatro meses, a 10, 20, 30 y 40° C, y las examinaron para determinar el número de microbios al cabo de seis, doce, dieciocho y veinticuatro meses. El número máximo correspondió a la conservada a 10° C, y el mínimo, a la que se tuvo a 40° C.

La tierra suele contener mohos, aunque los números hallados en placas de agar representan sólo una pequeña proporción de los recuentos totales. Las levaduras son aún menos abundantes, si bien aumenta su número en suelos ácidos y en viñedos y huertos.

El número de microorganismos hallados en el suelo por el método de la placa de agar oscila entre 200 000 y 100 000 000 por gramo, y son muy inferiores a los verdaderos, a causa de las limitaciones antes mencionadas. Según Waksman, las colonias que aparecen en las placas de agar comprenden 10 a 40 % de actinomicetos, 50 a 80 % de bacterias no esporíparas y 3 a 10 % de bacterias esporíparas.

Para más información, véase Dawson y Dawson (1946).

Método microscópico directo. Este método se considera más exacto que el de la placa de agar.

Se practica como sigue: Una parte de tierra se mezcla con diez veces su peso de una solución acuosa de agar al 0,015 %; el agar sirve para fijar los microorganismos al portaobjetos. Sobre un porta reticulado se extiende uniformemente por la zona marcada un volumen conocido de la suspensión de tierra. El porta se deseca sobre una superficie plana al calor de un baño de maría y se cubre luego con una solución colorante compuesta de 1 % de rosa de Bengala disuelto en una solución acuosa de fenol a 5 %. La preparación se lava por último con agua corriente, se seca y se examina al microscopio con objetivo de inmersión en aceite.

Si la preparación está bien hecha, las bacterias toman un color rosado intenso o rojo, mientras que las fracciones minerales no se tiñen. Parte de la materia orgánica muerta aparece de color rosado claro, pero es mayor la porción que se tiñe de amarillo o no toma color. Cuando las bacterias se ven débilmente teñidas, o todo aparece de color rosado, hay que hacer una nueva preparación, pues lo primero indica generalmente que se ha lavado el porta más de lo conveniente, y lo segundo, que la solución colorante es ya demasiado vieja.

Las cifras obtenidas por recuento directo son de cinco a veinte veces mayores que las resultantes del método de la placa. Gran parte de esta diferencia proviene de las bacterias que no se desarrollan en las placas, más que de la presencia de grandes agregados de gérmenes que no llegan a deshacerse en ellas.

Objeciones al método. El método microscópico directo para determinar el número de microorganismos del suelo está sujeto a varios errores graves, especialmente en manos poco expertas. Se incluyen microorganismos muertos, que en el método de la placa de agar resultan

eliminados. Hay que extender los gérmenes por igual en el portaobjetos, y se han de preparar extensiones muy uniformes; generalmente conviene hacer varias y tomar un promedio de los recuentos. Otro factor de perturbación es la dificultad de reconocer las bacterias; muchas de las formas terrícolas son demasiado pequeñas para distinguirlas fácilmente de los corpúsculos de tierra, y gran número de éstos parecen bacterias. Por consiguiente, se requiere una gran experiencia para determinar con exactitud la población microbiana del suelo por el método directo.

Para más información, consúltense Conn (1918, 1926) y Skinner, Jones y Mollison (1952).

Métodos de recuento. Además de los dos métodos ya descritos, Jones y Mollison (1948) han propuesto una nueva técnica para la determinación cuantitativa de gérmenes del suelo. Sus características esenciales radican en la suspensión de cantidades conocidas de tierra en un medio de agar fundido, de donde se retiran gotitas que se dejan solidificar como delgadas películas sobre una cámara hemocitométrica de profundidad determinada. El endurecimiento instantáneo del agar asegura la fijación de los componentes del suelo en su distribución inicial. Las películas se desecan y se tiñen en una solución de azul de anilina acética; se hacen preparaciones permanentes por deshidratación consecutiva en alcohol acético y se montan en bálsamo. Como las películas de un volumen definido contienen una cantidad conocida de tierra, los recuentos diferenciales de una superficie medida de película proporcionarán un cálculo cuantitativo de microorganismos del suelo.

Variaciones en los recuentos. El número de gérmenes de un suelo, incluso en una extensión pequeña, no es uniforme. Para aumentar la exactitud del análisis hay que tomar varias muestras de una misma parcela de tierra y considerar como cifra representativa el promedio de todas las determinaciones. Un simple recuento puede considerarse desprovisto de valor para computar la población bacteriana de la tierra examinada.

Se ha comprobado que el número de microorganismos del suelo varía de un día a otro. Estos cambios diarios parecen estar relacionados con las fluctuaciones del número de protozoos activos. Según Russell y Hutchinson (1909, 1913), si se esteriliza parcialmente el suelo al vapor o con un antiséptico volátil, como el tolueno, el número de bacterias disminuye al principio, y luego aumenta con rapidez, lo mismo que la actividad. Añadiendo un poco de tierra sin tratar, disminuye de nuevo. La esterilización parcial del suelo destruye los protozoos, pero no las bacterias, y éstas aumentan súbitamente; la adición de tierra no tratada vuelve a introducir protozoos, y el número de

bacterias disminuye de nuevo. Los protozoos de importancia que influyen en las variaciones diarias del recuento bacteriano comprenden ciliados, flagelados y rizópodos. Estos organismos parecen estar universalmente difundidos en el suelo.

Cutler, Crump y Sandon (1922) comprobaron que existe de día en día una relación inversa entre el número de bacterias y el de amebas activas del suelo, es decir, que una disminución del número de protozoos va seguida de un aumento de la población bacteriana, y al contrario. Esto significa que, si un análisis de tierra ha de ser útil, importa mucho examinar muestras de diferentes partes de una misma parcela, y hacerlo a intervalos frecuentes por espacio de largo tiempo.

Para más información, véanse James y Sutherland (1942, 1943*a*, *b*), y Singh (1947*a*, *b*).

ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA TIERRA

El desarrollo de las plantas, según Lochhead (1940), influye notablemente en la naturaleza de la microflora del suelo. En la rizosfera (zona sometida al influjo de las excepciones radicales), abundan más los bacilos gramnegativos que los grampositivos, los cocos y los gérmenes esporógenos.

Los microorganismos de la rizosfera parecen fisiológicamente más activos que los más apartados de la planta. Allí es mayor la proporción de formas móviles; se advierte un aumento pronunciado del número de bacterias cromógenas, y es mayor la frecuencia de microorganismos capaces de licuar gelatina y atacar la glucosa.

Según manifiestan Katznelson, Lochhead y Timonin (1948),

> Aunque en la mayoría de los casos no se dispone de explicaciones adecuadas respecto a la congregación de microorganismos en las superficies de las raíces y a la estimulación preferente de tipos o grupos específicos, estos fenómenos se hallan sin duda íntimamente relacionados con el suministro de principios nutritivos inorgánicos y orgánicos en esta interficie o zona de contacto entre las raíces y el suelo. Se han admitido, en general, como argumentos, la excreción vegetal de substancias inorgánicas, factores auxéticos accesorios, nitrógeno de aminas y otras diversas substancias. Tampoco deben pasar inadvertidos materiales proporcionados por cápsulas radicales desprendidas, filamentos de raíces, células corticales y epidérmicas, pues las atacan rápidamente microorganismos terrícolas y suministran considerables cantidades de substancias nutritivas orgánicas e inorgánicas.
>
> A consecuencia de esta abundancia de alimentos en la rizosfera, comienzan a multiplicarse los microorganismos habitualmente alojados en el suelo, entre ellos hongos, bacterias y actinomicetos, y sobre todo, los capaces de descomponer materia orgánica reciente o de utilizar directamente principios nutritivos inorgánicos y orgánicos sencillos. A esta actividad biológica intensificada acompañan diversas interacciones microbianas, tales como simbiosis, mutualismo, estimulación e inhibición, con sus efectos resultantes sobre el equilibrio microbiológico y también sobre las plantas. Es natural suponer

que los aumentos y reducciones observados en el número de los grupos específicos de microbios de la rizosfera provienen tanto de efectos asociativos o antagónicos como de la influencia de las raíces mismas. La eliminación de elementos inorgánicos, como el potasio y el fósforo, por parte de las plantas, puede favorecer el desarrollo de las bacterias cuyas necesidades nutritivas en la rizosfera no sean complicadas, y el desprendimiento de aminoácidos estimula probablemente las que requieren esos compuestos. La descomposición de partes radicales proporciona igualmente substancias nutritivas del mismo género y contribuye a los aumentos relativos de tales grupos de microorganismos. Por otra parte, la frecuencia relativamente menor con que en la rizosfera se encuentran bacterias necesitadas de substancias complejas no identificadas en extractos de tierras puede explicarse suponiendo que estos gérmenes se hallan más estrechamente vinculados a la disgregación de residuos de humus que a la del material orgánico fresco de la superficie de la raíz, o bien que están relativamente reprimidas por el desarrollo rápido de los microorganismos capaces de utilizar estas últimas substancias.

Podría esperarse que las bacterias oxidantes del nitrógeno amoniacal resultaran estimuladas en la zona de las raíces por efecto de la liberación de amoníaco que producen la amplia multiplicación y actividad de los gérmenes amonificantes en la rizosfera. Además, es posible que la presencia de nitrógeno de nitratos y de cantidades apreciables de dióxido de carbono estimule a bacterias desnitrificantes y otros gérmenes anaerobios facultativos o incluso obligados. Acompañando a la descomposición de materiales orgánicos fácilmente aprovechables de la rizosfera, o a continuación de la misma, son atacadas substancias celulósicas, y así aumenta el número de bacterias que degradan la celulosa. Se comprende el desarrollo de bacterias anaerobias a expensas de los productos de excreción, descomposición o autólisis celular. Con tan amplia proliferación bacteriana, los protozoos tienen probablemente en esa zona un rico almacén, con tal de que no lo supriman fenómenos de antagonismo. El hecho de que formas tales como *Azotobacter* y bacterias aerobias esporógenas no prosperen en este ambiente puede atribuirse a la competencia por los alimentos, a la sensibilidad a antibióticos, o a que esos microorganismos están menos adaptados a las condiciones facultativas reinantes en la referida zona.

West y Lochhead (1940) han empleado tres medios sintéticos, y lograron clasificar la mayoría de las bacterias del suelo en cinco diferentes grupos, a base de sus necesidades nutritivas. Posteriormente, Lochhead y Chase (1943) han examinado más a fondo lo que necesitan las bacterias terrícolas, y lograron cultivar un número mayor de ellas empleando siete clases distintas de medios.

Véase más información en Clark (1947), Katznelson y Chase (1944), Lochhead (1949), Lochhead y Thexton (1952), Taylor (1951), Timonin y Lochhead (1948), Wallace y Lochhead (1949, 1950).

Clasificación de las bacterias del suelo. Winogradsky ha dividido las bacterias del suelo en dos grupos, con las denominaciones de «cimógenas» y «autóctonas» (Conn, 1948).

Los tipos cimógenos son los microorganismos de fermentación activa que requieren ingredientes agotables con rapidez. En condiciones

adecuadas, estos gérmenes se multiplican aprisa cuando disponen de los principios nutritivos especiales a que están adaptados, y su número disminuye de nuevo hasta que se presenta otra ocasión de desarrollarse activamente. Los tipos autóctonos, en cambio, se conocen más familiarmente como «indígenas» o «nativos», y pueden considerarse numerosos siempre en el suelo, sin grandes oscilaciones numéricas y sin requerir otros alimentos o fuentes de energía que los contenidos normalmente en la tierra.

Bacterias cimógenas. Este grupo comprende los gérmenes que intervienen en los procesos de preparación de materia orgánica para que puedan consumirla las plantas. La materia orgánica no es un componente normal del suelo. Añadido a éste, sufre una descomposición rápida en fases sucesivas, cada una de las cuales comprende un grupo específico de microorganismos. Por tanto, la incorporación de materia orgánica a la tierra puede estimular el desarrollo de diversos grupos de bacterias cimógenas; algunas requieren medios especiales para su cultivo en el laboratorio, mientras que otras prosperan en medios nutritivos corrientes.

Los microorganismos de este grupo comprenden las bacterias nitrificantes (pág. 677), las fijadoras de nitrógeno (pág. 664), los gérmenes que hidrolizan celulosa (pág. 660), las que oxidan azufre (pág. 679), bacterias acidorresistentes, mohos, actinomicetos, bacterias esporíparas (*Bacillus cereus, B. mycoides, B. megatherium,* etc.), y asporógenas (*Pseudomonas fluorescens,* o un grupo de especies muy afines).

Bacterias autóctonas. Este grupo incluye los microorganismos que se encuentran en número bastante crecido y muy constante, porque no cambia según cuenten con substancias nutritivas especiales o carezcan de ellas. La función concreta de estos gérmenes en el suelo no se comprende bien; al parecer, utilizan los mismos alimentos (sales) que las plantas superiores, y desarrollan escasa actividad en la tierra. Se sirven de las mismas fuentes de nitrógeno que las plantas, de las que pueden considerarse rivales en este aspecto. Como las bacterias viven poco y se autolizan fácilmente después de muertas, su antagonismo con las plantas no puede considerarse de importancia. Las bacterias autóctonas producen reacciones débiles de fermentación, que hacen difícil clasificarlas; por eso se agrupan casi exclusivamente a base de su morfología.

El grupo incluye algunos de los actinomicetos que resultan mejor clasificados en él que entre las bacterias cimógenas.

Un crecido número de especies encontradas en el suelo presentan características intermedias entre las de bacterias genuinas y actinomicetos. Son algo pleomórficas, y pueden aparecer bacilares, cocoides o miceloides. Conn creía mejor colocar estos microorganismos en un nuevo género, que él denominaba *Arthrobacter*; se asemejan a los acti-

nomicetos sólo por su propiedad de producir en ocasiones cortos micelios. Las colonias que se desarrollan en agar o en gelatina son pequeñas y puntiformes.

El suelo contiene algunos bacilos móviles pequeños, no pleomórficos ni esporógenos, que difieren de los *Arthrobacter* por no presentar tendencia a ramificarse ni a asumir formas cocoides. Conn incluyó estos microbios en un género nuevo, con el nombre de *Agrobacterium*; la mayoría de estas especies son patógenas de plantas.

PRODUCCIÓN DE AMONÍACO

La mayoría de las especies de bacterias pueden descomponer proteínas y sus productos de degradación y poner en libertad amoníaco, uno de los componentes, que se desprende antes de consumirse el residuo orgánico ácido, en particular como elemento energético. La producción de amoníaco es una fase esencial en el proceso de formación de nitratos en el suelo; la mayoría de las cosechas dependen en gran parte de esos nitratos para su constitución y desarrollo.

Es importante señalar que la descomposición de cuerpos nitrogenados y su aprovechamiento como fuentes de energía ocurren sólo cuando no hay carbohidratos de fácil consumo. En presencia de un carbohidrato que fermente con rapidez, las bacterias toman su energía del mismo y utilizan los compuestos nitrogenados sólo para fines plásticos, con lo que disminuye notablemente la producción de amoníaco y nitratos. Por tanto, sólo se llega al rendimiento máximo de amoníaco cuando no se dispone de un carbohidrato de asimilación rápida.

Microorganismos que descomponen urea. Las proteínas y sus productos de degradación no son las únicas substancias capaces de ceder amoníaco a consecuencia de la actividad bacteriana. Ésta afecta asimismo a algunos compuestos nitrogenados no proteínicos, con desprendimiento de amoníaco.

Los estiércoles de establo y de cuadra suelen emplearse como fertilizantes por su contenido en nitrógeno y para contribuir a la reposición del de la tierra. En ese material estercoráceo suele haber gran cantidad de orina, que contiene urea como principal componente nitrogenado. Muchos microbios tienen la facultad de convertir urea en carbonato amónico y de liberar finalmente amoníaco y dióxido de carbono, conforme a la ecuación

$$O=C(NH_2)_2 + 2\,H_2O \rightarrow (NH_4)_2CO_3$$

$$(NH_4)_2CO_3 \rightarrow 2\,NH_3 + CO_2 + H_2O$$

La presencia en el suelo de microorganismos que descomponen urea se determina agregando este cuerpo al medio de cultivo. Si éste desprende amoníaco, es porque se encuentran en él los gérmenes específicos que atacan ese compuesto nitrogenado. Entre los microorganismos importantes que descomponen la urea se cuentan el *Micrococcus ureae*, coco aerobio inmóvil, variable al gram, que aparece suelto, en parejas y en paquetes, y produce esporas atípicas, convierte urea en carbonato amónico, resiste una temperatura de 80° C durante diez minutos y tiene una temperatura óptima de 20° C; y el *Pseudomonas ureae*, bacilo móvil aerobio facultativo, que toma el gram, se presenta suelto o apareado, ataca la urea para formar carbonato amónico, se desarrolla a 0° C y tiene una temperatura óptima de 20° C.

Las bacterias ureolíticas medran sobre todo en medios que contengan urea, sobre todo cuando se alcaliniza con carbonato amónico. Son capaces de transformar rápidamente urea en esta sal amónica, y se encuentran comúnmente en el aire, el agua, la tierra y el estiércol. Un 2 % de los microorganismos presentes en la capa superficial del suelo, y alrededor del 10 % de los presentes en el estiércol, son capaces de descomponer urea. Estos gérmenes se aíslan fácilmente, con tal de añadir urea al medio de cultivo.

Además de los microbios mencionados, Stuart, Van Stratum y Rustigian (1945) han informado que, en un medio bien atemperado, miembros del género *Proteus* dan pruebas de utilizar urea; si el medio se atempera poco, consumen la urea muchos cultivos de gérmenes coliformes y paracólicos, especialmente del tipo *Aerobacter*.

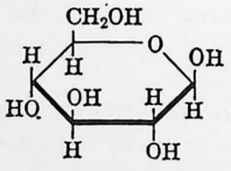
Actividades como las de ureasa en el suelo. En una serie de investigaciones, Conrad (1940 *a*, *b*, *c*, 1942 *a*, *b*, 1944) hizo pasar soluciones de urea a través de tierras cultivadas y sin cultivar, y demostró que la hidrólisis del compuesto era en gran parte efecto de uno o varios catalizadores termolábiles, más bien que obra de microorganismos. Se practicaron determinaciones con antisépticos y sin ellos; a tal fin se emplearon tolueno, cloroformo y sulfuro de carbono, todos ellos capaces de anular la acción bacteriana. Estos antisépticos apenas detuvieron la hidrólisis de urea en los suelos estudiados. La actividad catalítica natural de la tierra cesa o se reduce mucho calentando previamente el suelo humedecido a 85° C; esta actividad resiste mucho más a la descomposición que la de la ureasa de laboratorio agregada. Cuando la acción del suelo obedece a la presencia de la enzima ureasa, tiene que haberse asociado ésta con algún otro material que la preserve de la descomposición. Como las enzimas son elaboradas por células vivas, los microorganismos del suelo deben considerarse como productores potenciales de cualesquiera enzimas presentes en la tierra.

DIGESTIÓN DE LA CELULOSA

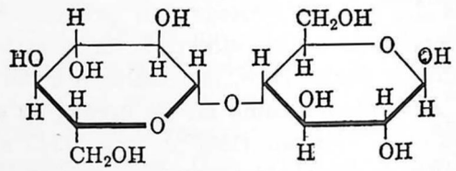
La mayor parte de la materia orgánica del suelo es descompuesta por bacterias en el proceso de adquirir energía. Los carbohidratos más sencillos, incluidos monosacáridos, disacáridos y algunos polisacáridos, son objeto de ataque y descomposición por parte de un crecido número de bacterias terrícolas. La adición de tales substancias a la tierra provoca un aumento rápido de la población bacteriana.

La celulosa es uno de los cuerpos más importantes añadidos al suelo, en el que se introduce como componente principal de residuos de cosechas y de la vegetación natural. En condiciones normales de temperatura y humedad, la celulosa desaparece por completo y en muy poco tiempo. Las paredes celulares de las plantas se componen de celulosa, mientras que las de células animales están constituidas por proteína; ésta es una de las características distintivas entre vegetales y animales.

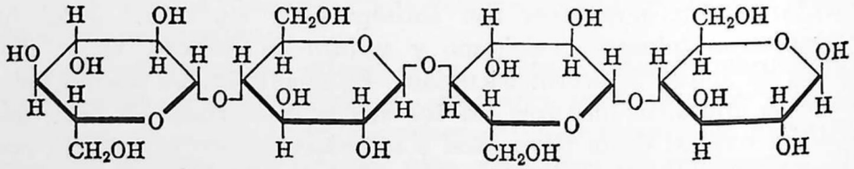
La molécula de celulosa consta de unidades de β-glucosa; dos moléculas de esta última se combinan mediante un enlace 1,4, para dar β-celobiosa. Una molécula de celulosa consiste en una cadena de moléculas de celobiosa unidas por sus extremos mediante enlaces 1,4-β-glucosídicos:



β-glucosa



β-celobiosa



Cadena de celulosa

La primera fase del aprovechamiento de la celulosa se supone que sea una reducción por hidrólisis de la molécula a celobiosa, y finalmente a glucosa. En la reacción intervienen las dos enzimas celulasa y celobiasa; aquélla descompone celulosa en celobiosa, y la celobiasa desdobla la celobiosa en dos moléculas de glucosa (págs. 313 a 315).

Las dos enzimas celulosa y celobiasa, que se acompañan mutuamente, son de enorme importancia para disolver en el suelo la celulosa

insoluble. Como los animales no elaboran celulosa, la presencia de bacterias que descomponen celulosa en el intestino de los herbívoros es causa de la hidrólisis del compuesto insoluble, mediante la cual se hace aprovechable como alimento.

Para más información, véanse Levisson, Mandels y Reese (1951), y Preece (1948).

Microorganismos que intervienen. Atacan la celulosa bacterias terrícolas muy diversas, que comprenden especies aerobias mesófilas, aerobias termófilas, anaerobias mesófilas y anaerobias termófilas; todas ellas utilizan celulosa como fuente de energía. Además de las bacterias, pueden atacar la celulosa algunos mohos y protozoos.

Bacterias aerobias. Casi todas las bacterias aerobias mesófilas que atacan la celulosa y se han aislado hasta ahora se incluyen en los géneros *Cellfalcicula, Cellulomonas, Cellvibrio, Cytophaga* y *Sporocytophaga*; además, son capaces de utilizar celulosa algunas especies de los géneros *Bacillus, Bacterium, Corynebacterium, Pseudomonas* y *Vibrio*. Con excepción del *Pseudomonas erythra,* todos son microorganismos versátiles, capaces de desarrollarse en presencia de muchos carbohidratos. La especie *Bacillus aporrhoeus* produce colonias que se mueven de un lado a otro sobre la superficie del medio de agar; una porción de una colonia puede apartarse en línea delgada del cuerpo principal, a razón de 3 mm cada dos horas. No todas las colonias son móviles.

La presencia de microorganismos aerobios se puede demostrar fácilmente añadiendo tierra a un medio de cultivo compuesto de ciertas sales inorgánicas y celulosa u otro carbohidrato satisfactorio (papel de filtro, algodón, almidón), e incubándolo durante varios días a temperatura adecuada. El carbohidrato es atacado y licuado lentamente. McBee (1948) ha aislado dos cultivos puros de bacterias termófilas que descomponen celulosa partiendo de sus orígenes naturales. El método consiste en añadir tierra al contenido de botellas con tapones de vidrio, constituido por un medio de sal inorgánica y celulosa (algodón finamente dividido). Este cultivo inicial sirvió como punto de partida para el aislamiento de cultivos puros.

Fermentaron pequeñas cantidades de celulosa (0,15 %) sin que se formaran porciones apreciables de azúcar reductor. En presencia de más celulosa se acumulaban azúcares (celobiosa, glucosa) durante las fases últimas de la fermentación y después de cesar ésta. McBee cree que la celulosa se aprovechó en dos tiempos: hidrólisis y fermentación. Fue atacada la celobiosa, pero no la glucosa; los productos de la fermentación comprendían dióxido de carbono, hidrógeno, alcohol etílico, ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico y glucosa.

Bacterias anaerobias. Las bacterias anaerobias que descomponen celulosa pueden incluirse en los siguientes grupos; bacilos y cocos mesófilos asporógenos, gérmenes mesófilos y termófilos esporíparos y actinomicetos.

Hungate (1950) ha aislado de la panza de reses bovinas un bacilo asporógeno pequeño, que ataca activamente la celulosa; es gramnegativo, anaerobio estricto, se tiñe desigualmente y su temperatura óptima es de 38 a 42° C. Fermenta celulosa, glucosa, celobiosa, maltosa,



Fig. 201. — *Micromonospora propionici*, actinomiceto anaerobio que descompone celulosa. (Según Hungate.)

dextrina, almidón y trehalosa; los productos obtenidos de la celulosa comprenden ácidos fórmico (indicios), acético, propiónico, butírico y succínico, y dióxido de carbono. Su descubridor le dio el nombre de *Bacteroides succinogenes.*

Los cocos incoloros constituyen, según Hungate, las bacterias de esta clase más importantes en la panza, donde se han encontrado en número que varía entre 10 y 100 millones por mililitro. Estos gérmenes consumen celulosa y celobiosa, pero no glucosa.

Del humor de la panza se aislaron dos cepas de un coco amarillo, que atacaban celulosa, celobiosa y glucosa. Los productos de la fermentación de celulosa comprendían ácidos acético y láctico, alcohol etílico, celobiosa, dióxido de carbono e hidrógeno.

La mayoría de las bacterias celulolíticas encontradas en la Naturaleza son anaerobias esporógenas, del género *Clostridium.*

Khouvine (1923) señaló la presencia en el intestino humano de un bacilo anaerobio estricto, esporíparo, que atacaba la celulosa y producía

ácido acético, acompañado de cantidades menores de ácido butírico, alcohol etílico, dióxido de carbono e hidrógeno; la celulosa le servía de única fuente de carbono. El microbio se pudo cultivar en un medio de sales inorgánicas con 0,1 % de peptona, un 1 % de celulosa y algo de extracto fecal; pero no medró en un medio en el que se

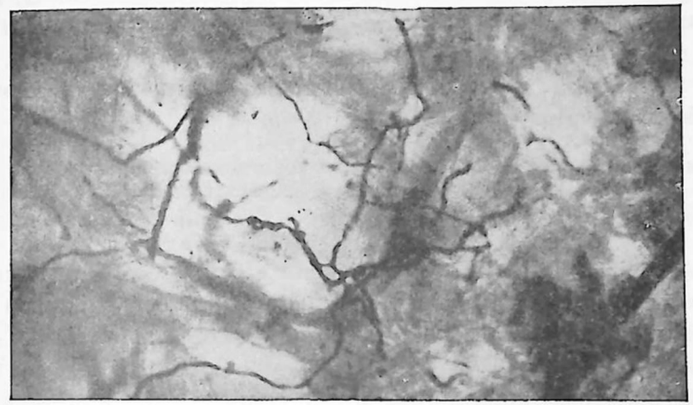


Fig. 202. — Microfotografía de un moho digestor de celulosa, desarrollado sobre papel. (Según Swanson.)

había substituido la celobiosa o la glucosa por celulosa. Tal germen recibió el nombre de *Bacillus cellulosae dissolvens (Clostridium dissolvens).*

Hungate (1944) ha aislado un anaerobio digestor de celulosa, el *Cl. cellobioparus,* de la panza de reses bovinas. Este microorganismo se desarrolla bien en un medio orgánico con biotina y celulosa o cualquier otro de varios azúcares. Los productos de la fermentación comprenden ácidos acético, fórmico y láctico, alcohol etílico, dióxido de carbono e hidrógeno; el más importante de la digestión de celulosa es celobiosa. No se forma glucosa.

Otras especies celulolíticas importantes del género *Clostridium* son *Cl. cellulosolvens, Cl. omelianskii, Cl. spumarum* y *Cl. werneri.*

Algunas especies anaerobias son capaces de disolver celulosa a temperaturas de 60 a 65° C. Estos microorganismos se hallan muy difundidos en la Naturaleza, y se encuentran en el suelo, el fango de ríos y el contenido intestinal de animales. Se pueden aislar sembrando en un medio inorgánico que contenga celulosa una infusión de estiércol en descomposición rápida, e incubando en condiciones anaeróbicas a 65° C. Si hay gérmenes, la celulosa se disolverá en seis a ocho días.

Hungate (1946) ha aislado un actinomiceto celulolítico del conducto digestivo de termes. Este microorganismo produce principalmente ácido propiónico, con cantidades menores de ácido acético y dióxido de car-

bono, y su descubridor lo ha llamado *Micromonospora propionici* (figura 201).

Otros microorganismos. Se han descrito numerosos mohos y gérmenes análogos capaces de digerir celulosa. Las especies estudiadas con más extensión pertenecen a los géneros *Aspergillus, Penicillium, Monilia, Alternaria, Trichoderma, Mucor, Rhizopus, Merulius, Paxillus, Fusarium, Cladosporium, Chaetomium, Polyporus, Actinomyces* y otros. Los mohos vegetan especialmente sobre papel viejo, sobre todo en atmósfera húmeda; ellos han ocasionado la pérdida de muchos manuscritos de gran valor (fig. 202).

Para más información sobre gérmenes digestores de celulosa, véanse Alarie y Gray (1947), Fuller y Norman (1943 *a, b*), Hungate (1947), McBee (1950) y Sijpesteijn (1949).

Especificidad de la reacción. Se ha dicho que los gérmenes celulolíticos atacan el compuesto como fuente de energía y no son capaces de utilizar ninguna otra provisión de carbono. Stanier (1942 *a, b*) ha presentado pruebas en apoyo de que probablemente no se trata de bacterias que forzosamente hidrolicen celulosa; y demuestra que la glucosa y otros carbohidratos pueden reemplazar a la celulosa en el cultivo de varias especies del género *Cytophaga,* que se tenían generalmente por formas obligadas o estrictas. Es muy probable que la glucosa pueda substituir a la celulosa en el metabolismo de otros grupos celulolíticos. Esto refuta el aserto de Winogradovsky (1929) de que hay oxidación directa de la molécula de celulosa. La semejanza del ritmo de oxidación de celulosa, celobiosa y glucosa por el *C. hutchinsoni* es buena prueba de que la celulosa se convierte primero por hidrólisis en glucosa y luego se oxida el monosacárido como fuente de energía.

FIJACIÓN SIMBIÓTICA DEL NITRÓGENO

Hace ya muchos años se demostró que la vegetación de ciertas plantas mejora la tierra y, al aumentar su fertilidad, estimula o favorece las cosechas venideras. Las plantas que producen tal estímulo resultaron ser de la familia *Leguminosas.*

Hellriegal y Wilfarth (1888) pusieron de manifiesto que la estimulación provenía de un aumento en la provisión de nitrógeno del suelo, en virtud de la presencia de unos nódulos o tubérculos en las raíces de esas plantas; sin tales nódulos no se producía estímulo ni mejora alguna en la cosecha siguiente.

Microorganismos participantes. La formación de tuberosidades en las raíces se debe a la vegetación asociada de la planta leguminosa y un microorganismo bacteriano. Las bacterias pertenecen al género

Rhizobium, y se califican de radicícolas; se desarrollan en las células de la raíz, donde su crecimiento y sus actividades metabólicas producen una excrecencia o nódulo. Los microorganismos radicícolas utilizan el nitrógeno de la atmósfera y sintetizan compuestos nitrogenados. La planta recibe su nitrógeno de las actividades sintéticas de las bacterias, y proporciona a éstas alimento; es decir, que una y otras se benefician viviendo en común, y esto es lo que se conoce por simbiosis.

El género *Rhizobium* (del griego *rhiza,* raíz, y *bios,* vida), se caracteriza como sigue:

Bacilos de 0,5 a 0,9 por 1,2 a 3μ; móviles cuando jóvenes, y que suelen asumir formas bacteroides en medios de cultivo artificiales que contengan alcaloides o glucósidos, o en los que se intensifique la acidez, o bien durante la simbiosis en el nódulo. Son gramnegativos; aerobios, heterotróficos, y vegetan mejor con extractos de levadura, malta u otras substancias vegetales. Pueden reducir nitratos a nitritos, y no utilizan éstos. No licuan la gelatina, o lo hacen muy poco tras prolongada incubación. Temperatura óptima, 25° C. Los gérmenes de este grupo producen nódulos en las raíces de *Leguminosas,* y fijan nitrógeno libre en el curso de esta simbiosis.

El género comprende seis especies: **Rhizobium leguminosarum,** *R. phaseoli, R. trifolii, R. lupini, R. japonicum* y *R. meliloti.* Hasta ahora carecen de nombre específico los gérmenes que producen tuberosidades en plantas del grupo de la *Vigna sinensis,* especie conocida en América por «fríjol de vaca». Walker y Brown (1935) propusieron unir este grupo con el de la soya (soja) como inoculados por una sola especie, *R. japonicum.* Reid y Baldwin, a base de datos experimentales, sugieren incluir también el grupo del altramuz.

Grupos de interinoculación. Hay millares de plantas leguminosas, y casi otras tantas cepas de bacterias radicícolas. Los gérmenes fijadores de nitrógeno aislados de los nódulos de una planta no siempre son capaces de producir excrecencias en todas las legumbres. El trébol se desarrolla mejor si se inocula con bacterias radicícolas aisladas de la misma especie vegetal, y lo propio sucede con el guisante. Hay que conjugar la pareja adecuada, pues de otro modo pueden fallar los resultados; la planta y el rizobio han de ser perfectamente compatibles. Esta selectividad tan manifiesta de las bacterias radicícolas sirvió para reconocer grupos de interinoculación en las plantas leguminosas. Cualquiera de ellas, dentro del grupo, se puede inocular con un cultivo de las bacterias adecuadas, que suele comprender varias cepas de notoria eficacia para inocular todas las leguminosas del grupo particular respectivo.

Sin embargo, los grupos de interinoculación han suscitado críticas porque algunas cepas de bacterias son eficaces para más de un grupo. Sin embargo, para todos los fines prácticos, tales grupos resultan convenientes en lo que atañe a la preparación de cultivos inoculables. Los

agricultores se han acostumbrado a ordenar los cultivos de legumbres por las designaciones de grupo; se reconocen siete: alfalfa, judía, trébol, fríjol de vaca, altramuz, guisante y guija, y soya. Wilson (1945) distingue veintidós grupos de inoculación cruzada entre las bacterias de las leguminosas. No se conoce la causa de esta especificidad de la planta huésped.

Para más información, véanse Allen y Allen (1947*a*), Andre y Beeler (1949), Burton (1949), Burton y Allen (1950), Erdman (1953), Kleczkowski, Nutman y Bond (1944), Kleczkowski y Thornton (1944), Parker, Allen y Ahlgren (1949) y Wilson (1948).

Formación de los nódulos. Los gérmenes fijadores de nitrógeno viven libres en el suelo. Trabajos recientes (Niss y Wilson, 1947; Tove y Wilson, 1948; Virtanen, 1947) señalan que sólo fijan nitrógeno estas bacterias cuando viven asociadas a la planta, en la que se introducen a través de los pelos radicales o de otras células epidérmicas. Luego se multiplican con gran rapidez y forman largos filamentos en esos pelos y hacia el interior del parénquima radical; originan una rápida proliferación de los tejidos circundantes en las células corticales más internas de la raíz, y así se inicia la formación del nódulo (fig. 203). Este esbozo empuja hacia fuera el parénquima y la epidermis, y produce una tumefacción lateral en la raíz; el nódulo consiste en una masa de células parenquimatosas de fina membrana, generalmente llenas del germen específico, rodeada de una capa suberosa y de ramificaciones de un sistema vascular, el cual proporciona a aquél substancias nutritivas. A su vez, la planta retira los compuestos nitrogenados que sintetizan las bacterias.

Los nódulos son de forma y tamaño distintos, según las plantas en que se producen. Los del trébol son redondos u ovales; los del guisante suelen ser redondos, alargados, y con frecuencia se arraciman; en la judía y la soya, los nódulos son relativamente grandes, redondos, y están firmemente sujetos a la raíz; los de la alfalfa suelen ser largos, de figura dactilar.

Véase más información en Allen (1949), Bond (1948) y Nutman (1948, 1952, 1953).

Fijación de nitrógeno en nódulos extirpados. Allison, Hoover y Minor (1942) separaron nódulos de raíces de trébol oloroso (meliloto), fríjol de vaca, almorta, soya y guija o muela, y trataron de determinar si tales nódulos eran capaces de fijar el nitrógeno atmosférico manteniéndolos en soluciones de cultivos en el laboratorio. A base de sus datos experimentales, llegaron a las siguientes conclusiones:

1. No se ha observado fijación de nitrógeno con nódulos enteros o machacados en una solución de cultivo inorgánico que contenía sacarosa, glucosa o manita.

2. En algunos casos, con nódulos mantenidos en capas poco profundas de un medio de glucosa-manita, entre 4 y 12° C, durante uno a tres días se obtuvo un aumento de nitrógeno de 1 a 3 %, apenas apreciable.

3. Cultivos puros de rizobios no fijaron nitrógeno al agregarles ácido oxalacético (pág. 671). Unos experimentos similares con nódulos extirpados dieron resultados negativos o dudosos.

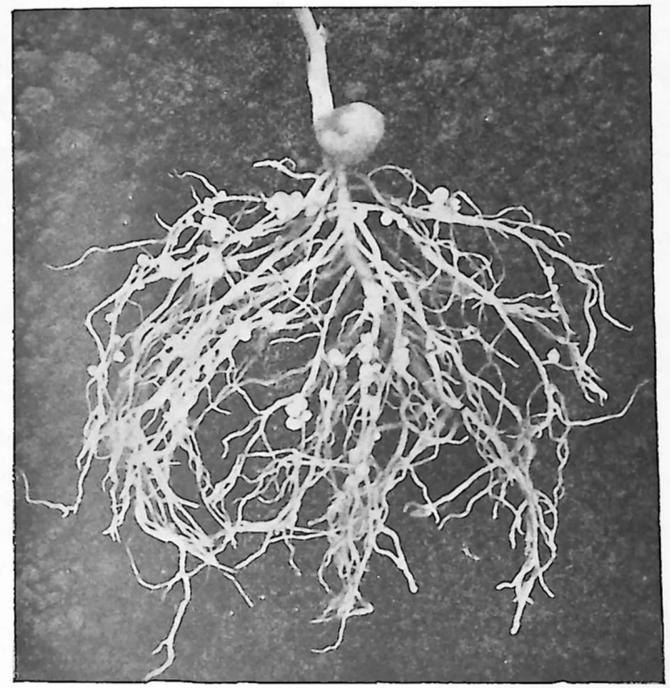


Fig. 203. — Nodulación precoz de un plantón de guisante, a causa de inoculación de la semilla. (Con licencia de O. N. Allen.)

4. Quince series de experimentos, en los que se tuvieron en cuenta muchas variables, no demostraron que los zumos extraídos de nódulos y esterilizados pasándolos por bujías filtrantes puedan fijar nitrógeno atmosférico si se incuban en soluciones inorgánicas azucaradas.

Tove, Niss y Wilson (1950) ensayaron más de 150 nódulos extirpados de plantas de soya y de fríjol de vaca y obtuvieron resultados similares. Utilizaron nitrógeno isótopo ($^{15}N_2$) y advirtieron que los nódulos no fijaban habitualmente nitrógeno en cantidad perceptible.

Plantas con nódulos. En general, se afirma que sólo se encuentran nódulos en leguminosas. Cierto es que la formación de nódulos se efectúa de modo más patente en estos vegetales, pero ciertas especies de la familia no los desarrollan, y, en cambio, los forman algunas de otras familias.

Según Allen y Allen (1947 *b*), la familia *Leguminosas* consta de 429 géneros con unas 10 000 especies de plantas. De ellos, 179 géneros (41 %), con 946 especies (9,4 %), han sido objeto de estudio respecto a la nodulación, y únicamente 77 especies de legumbres han dejado de presentar nódulos una y otra vez.

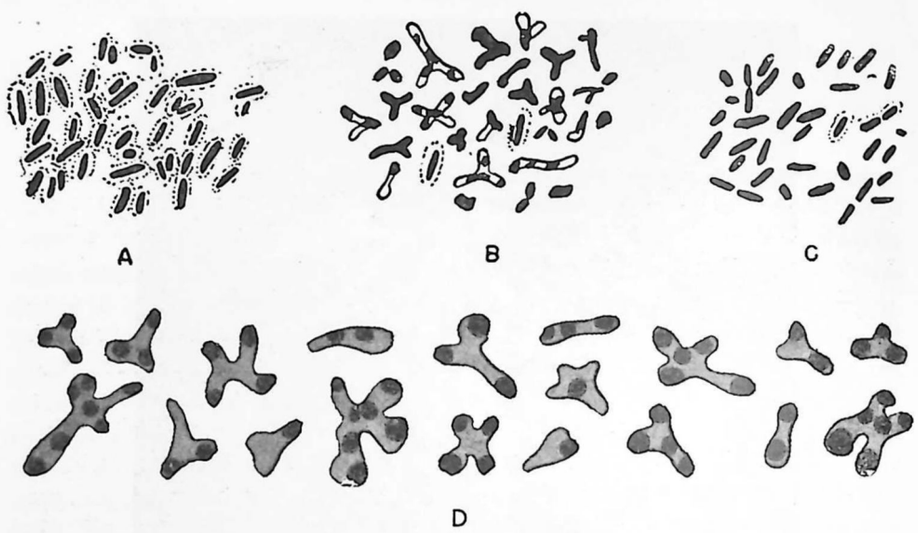


Fig. 204. — Bacilos y bacteroides procedentes de nódulos radicales. *A*, bacilos de un nódulo blanco inactivo; *B*, bacteroides de un nódulo rojo activo; *C*, bacilos de un nódulo verde inactivo; *D*, diversas formas de bacteroides. (Según Virtanen.)

Gérmenes radicícolas. Los nódulos contienen microorganismos en gran número. Su presencia se puede demostrar fácilmente: se lava un nódulo y se estruja entre dos portas; se fija y se tiñe la preparación de la manera usual. Es relativamente sencillo aislar un cultivo puro del germen de un nódulo previamente lavado y esterilizado. Los medios nutritivos corrientes no sirven para cultivar estos microorganismos. Uno que ha proporcionado resultados muy buenos se conoce por agar con fosfato de manita de Ashby, que constituye un medio inorgánico al que se añade manita como fuente de energía. Incubando las placas a 25° C, aparecen colonias al cabo de cinco a diez días.

Las características de las colonias de gérmenes muestran cierta variación, pues dependen de las plantas de que se hayan aislado. Algunas especies dan colonias prominentes, lustrosas, semitranslúcidas, blancas, glutinosas, y a veces viscosas, con abundante goma; otras las forman pequeñas, poco prominentes, lustrosas, opacas, blancas y butiráceas, con escasa goma.

Los microbios simbióticos se presentan en forma de diminutos bacilos, aerobios estrictos, móviles cuando son jóvenes; abundan los ramificados, característicos en los nódulos. Las células procedentes de

las excrecencias suelen ser irregulares, con figura de X, Y, estelares, piriformes y mazudas; al parecer, predominan las formas hinchadas o vacuoladas, que se conocen también por bacteroides (fig 204). A veces hay también células redondas o cocoides; éstas proceden de las células hinchadas o vacuoladas, que más tarde se restituyen a la forma bacilar. Algunos autores consideran todas estas formas como fases propias del ciclo vital del germen.

Aunque en el nódulo predominan las formas bacteroides, suelen faltar generalmente cuando se siembra en estrías material nodular

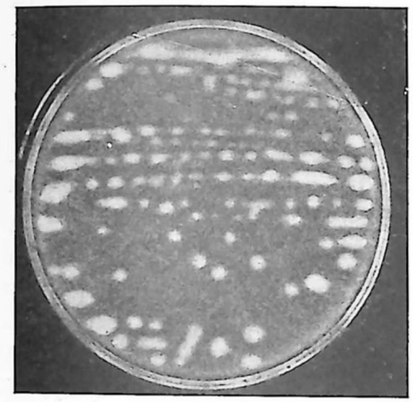


Fig. 205. — Cultivo en placa de agar de *Rhizobium leguminosarum* incubado seis días a temperatura ordinaria. Nótese el aspecto mucoso de las colonias, con tendencia a confluir.

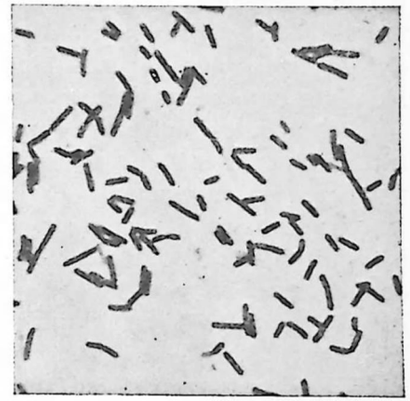


Fig. 206. — *Rhizobium leguminosarum* procedentes de un cultivo en agar con manita.

sobre placas de agar (figs. 205 y 206). Después de que el nódulo muere y se disuelve, los microorganismos vuelven a la tierra como células bacilares u ovoides capaces de emitir flagelos; en esta fase, el microbio puede nadar en la humedad de la tierra, y es probable que por tales medios llegue a las raíces de su planta hospedante.

Los microorganismos de los diversos grupos de interinoculación muestran algunas diferencias en sus reacciones de fermentación. Sin embargo, a lo sumo atacan débilmente los carbohidratos; en algunas cepas esto obedece con probabilidad a la lentitud con que se desarrollan en medios artificiales.

Algunas de las bacterias de nódulos radicales muestran una gran propensión a producir abundante goma cuando se cultivan en medios carbohidratos; la formación de goma puede ser tan manifiesta, que el medio se hace muy viscoso y varía notablemente según los microorganismos de distintos grupos de interinoculación. La goma no contiene nitrógeno, es hidrosoluble, y precipita de la solución al añadir alcohol

o acetona. Cuando se calienta con un ácido inorgánico, la goma se convierte por hidrólisis en un azúcar reductor.

Se encontrará más información en Bisset (1952).

Mecanismo de la fijación simbiótica de nitrógeno. Virtanen (1945 *a*, *b*, 1947) ha observado dos tipos de nódulos en plantas de guisantes; uno de ellos fijaba activamente nitrógeno, y el otro no. Las plantas que contenían nódulos inactivos no crecían mejor que las de contraste, no inoculadas. Según Virtanen, los nódulos inactivos contenían solamente bacilos rodeados de una capa glutinosa; los activos presentaban formas bacteroides visiblemente hinchadas (fig. 204). A juicio de este autor, la capa glutinosa en torno a los microorganismos inactivos entorpecía su nutrición y la absorción de oxígeno.

Los nódulos radicales de plantas leguminosas que fijan activamente nitrógeno contienen un pigmento rojo, mientras que los nódulos inactivos carecen de pigmento. Parece existir una correlación positiva entre la concentración de pigmento rojo y la capacidad de los nódulos para fijar nitrógeno. El pigmento se torna verde cuando cesa la fijación de nitrógeno en plantas anuales, al final del desarrollo vegetativo, o cuando se colocan las plantas en la obscuridad durante unos días. El pigmento rojo se puede concentrar tratando una suspensión de nódulos estrujados con sulfato amónico, y es capaz de almacenar y transportar oxígeno. Químicamente, consiste en una proteína con bandas de absorción similares a las de la hemoglobina; Virtanen lo denominó leghemoglobina. El pigmento verde puede aislarse también de los nódulos verdes, como el anterior de los suyos; es asimismo una cromoproteína. Sin embargo, las bandas de absorción de los pigmentos verde y rojo no son iguales.

A base de sus datos experimentales, Virtanen llega a las siguientes conclusiones:

1.ª Cuando las plantas de guisante se desarrollan en condiciones que permiten la fijación de nitrógeno, los nódulos radicales formados por cepas bacterianas activas contienen siempre pigmento rojo.

2.ª Los nódulos producidos por cepas inactivas no contienen nunca pigmento rojo ni fijan nitrógeno.

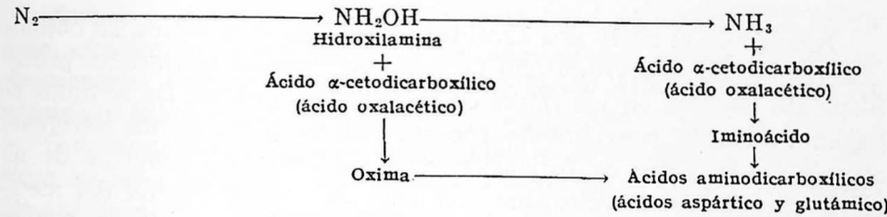
3.ª Cuando las plantas de guisante se desarrollan en substratos carentes de oxígeno, no hay pigmento rojo ni siquiera en nódulos producidos por cepas activas; tales nódulos no fijan nitrógeno.

4.ª Si se colocan en la oscuridad plantas de guisante, el pigmento rojo se vuelve verde; los nódulos verdes ya no son capaces de fijar nitrógeno, aunque las plantas se expongan de nuevo a la luz.

5.ª Las bacterias que viven libremente en leguminosas no forman pigmento rojo ni son capaces de fijar nitrógeno; el pigmento rojo es necesario para que esta fijación se produzca.

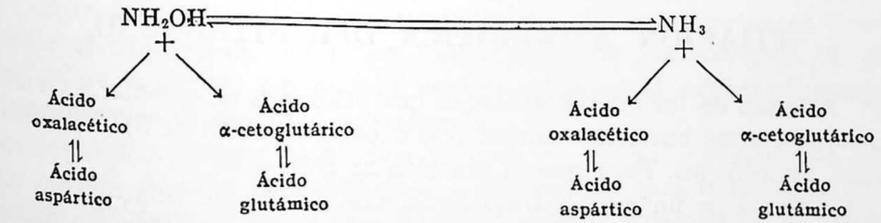
Se han expuesto diversas teorías para explicar el mecanismo de la fijación biológica de nitrógeno. Las dos más importantes parecen ser la de Virtanen y Laine (1939) y la de Burris y Wilson (1945).

Teoría de Virtanen y Laine. Se inoculan legumbres con un microorganismo activo de nódulo radical, y se siembran en un cultivo esterilizado exento de nitrógeno. En cuanto se forman nódulos, aparecen compuestos nitrogenados, que pasan al suelo desde los nódulos radicales, y no desde las raíces. En algunos casos se elimina más de la mitad del nitrógeno total fijado, y abunda más en plantas jóvenes, donde los nódulos continúan desarrollándose y no muestran signos de decadencia. El nitrógeno eliminado es principalmente amínico, y se ha identificado como ácidos *l*-aspártico y *l*-glutámico; también se forma algo de β-alanina, a partir del ácido *l*-aspártico, por descarboxilación. Billen y Lichstein (1949) han demostrado la presencia de un sistema enzimático en el *Rhizobium trifolii*, capaz de producir esta reacción. En los productos eliminados se encontraron también pequeñas cantidades de N de oximas y de nitritos. Virtanen y Laine han propuesto el siguiente esquema de fijación biológica del nitrógeno:



Este esquema concuerda bastante con la hipótesis que exponen Burris y Wilson (véase más adelante), basada en las observaciones realizadas con *Azotobacter* por el método del nitrógeno isótopo.

Teoría de Burris y Wilson. Como compuesto nitrogenado central se toma hidroxilamina, de la que se obtiene amoníaco por reducción, y que puede reaccionar también directamente con un cetoácido. El esquema de estos autores es el reproducido a continuación:



Ambas teorías postulan la formación de ácidos aminodicarboxílicos como aminoácidos primarios en la fijación biológica del nitrógeno.

Véase más información en Burris y Wilson (1952), Jensen (1951), Little y Burris (1947), Virtanen (1948), Virtanen, Jorma, Linkola y Linnasalmi (1947), Wilson y Burris (1947).

Inoculación artificial de plantas. La eficacia de la fijación simbiótica de nitrógeno se ha intensificado mucho mediante selección de leguminosas apropiadas, desarrollo de nuevas variedades de estas plantas, inoculación artificial de semillas con cultivos puros de bacterias radicícolas y ajuste del ambiente a las mejores condiciones posibles.

Para aumentar la proporción de nitrógeno en el suelo se han añadido a éste cultivos de los gérmenes, o se han inoculado a las semillas. Esto último es más fácil, y parece dar mejores resultados. Remojar las semillas en un cultivo de las bacterias específicas nodulares constituye una práctica acreditada, especialmente cuando se siembra por primera vez una planta leguminosa.

Para que dé buenos resultados el empleo de cultivos destinados a inocular semillas, es de suma importancia que la cepa microbiana seleccionada produzca notoriamente nódulos activos en la leguminosa. Al parecer, no existe norma fija para esta selección, salvo el ensayo efectivo de diversas cepas en las plantas que interesan. Los ensayos de estufa deben completarse con otros de campo, para asegurar una buena selección de cepas con destino a la producción de cultivos en escala comercial.

Añadiendo al suelo una cantidad abundante de nitratos, se obtiene una vegetación exuberante. En tales condiciones, no aparecerán probablemente nódulos en las raíces de las plantas, aunque las semillas se hayan inoculado previamente con un cultivo puro de los gérmenes específicos. La falta de formación de los nódulos no proviene de un efecto directo del nitrato, sino más bien de una alteración del metabolismo de las plantas. En cambio, la adición de calcio y fósforo estimula la producción de nódulos, en la que asimismo influyen otros factores, como la reacción del suelo, su temperatura, humedad y contenido en oxígeno.

Véanse los artículos y monografías de Allen y Allen (1950), Thornton y Kleczkowski (1950), y Wilson (1940).

FIJACIÓN ASIMBIÓTICA DEL NITRÓGENO

Además de los microorganismos que acabamos de estudiar, el suelo alberga ciertas bacterias asimbióticas capaces también de fijar el nitrógeno atmosférico. Para que la reacción se desarrolle, parece necesaria la presencia de un carbohidrato fácilmente asimilable. Son muchos los microorganismos que pueden fijar nitrógeno en pequeñas cantidades, pero sólo unas pocas especies tienen la facultad de utilizar este gas en cantidades relativamente grandes.

Gérmenes participantes. El primer germen asimbiótico fijador de nitrógeno que se aisló fué el *Clostridium pasteurianum (butyricum)*,

bacilo móvil, anaerobio, grampositivo y esporógeno, probablemente muy difundido en suelos ricos en humus. Este microbio es capaz de fijar nitrógeno atmosférico en pequeñas porciones. Otras quince especies, por lo menos, de *Clostridium* han resultado ser capaces de fijar nitrógeno (Rosenblum y Wilson, 1949, 1950). Sin embargo, los microorganismos más importantes que intervienen en la fijación asimbiótica de nitrógeno pertenecen al género *Azotobacter*.

El género *Azotobacter* (del francés *azote*, nitrógeno, y del griego *bakterion*, bastoncillo), se define como sigue:

> Células sin endosporas. Bacilos relativamente grandes, o incluso cocos, a veces casi con aspecto de levaduras. El tipo de flagelación en este género se ha establecido definitivamente como peritrical. Aerobios estrictos, gramnegativos, que se desarrollan habitualmente en película sobre la superficie del medio nutritivo; fijan nitrógeno atmosférico si se les proporciona carbohidrato u otra fuente de energía. Crecen mejor en medios con escaso nitrógeno; son bacterias del suelo y del agua.

Se han identificado tres especies: *Azotobacter chroococcum, A. agile* y *A. indicum.*

Horner y Allison (1944) han informado que, en ausencia de nitrógeno atmosférico, estas bacterias pueden asimilar varios compuestos nitrogenados orgánicos, entre ellos urea, ácido aspártico, asparagina, adenina y ácido glutámico.

Con excepción de la urea, esos cuerpos no se utilizan tan fácilmente como las sales amónicas inorgánicas y los nitritos y nitratos. La menor fijación de nitrógeno en los cultivos, por adición de compuestos nitrogenados, corresponde muy de cerca a la cantidad de nitrógeno fijado asimilable. Los autores citados deducen que la relativa disponibilidad y la probable presencia de compuestos nitrogenados fijos en suelos son tales, que no bastan para retardar señaladamente la fijación de nitrógeno por el *Azotobacter* en las condiciones más corrientes.

La presencia de microorganismos fijadores de nitrógenos puede demostrarse fácilmente sembrando una pequeña porción de tierra fértil en un medio inorgánico que contenga glucosa. En tal solución se desarrolla el *Clostridium butyricum*, juntamente con las bacterias. Si se reemplaza la glucosa por manita, predominarán en el cultivo gérmenes pertenecientes al género *Azotobacter*.

La mejor temperatura para incubar el medio inoculado es de unos 25° C. Al cabo de varios días a esta temperatura empieza a formarse una película en la superficie del medio; primero es de color gris, y luego toma una tonalidad pardusca. Un examen microscópico revela la presencia de numerosas células típicas de *Azotobacter*, rodeadas de cápsulas mucoides. Se preparan nuevos cultivos pasando porciones del velo a un matraz con medio fresco; después de varios pases,

el cultivo se enriquece considerablemente en *Azotobacter*. Se siembra en estría un asa de la película en la superficie del mismo medio, solidificado con agar, y se incuba la placa a 25° C hasta que aparezcan colonias. Para obtener un cultivo puro se traslada una colonia típica de la placa a un tubo de medio recién preparado.

Los gérmenes del género *Azotobacter* están ampliamente difundidos en la tierra, y si faltan en algunos suelos, probablemente es por el pH de los mismos; las células de *Azotobacter* no se desarrollan cuando es inferior a 6 (Gainey, 1948). Si la reacción se ajusta a un pH adecuado, aparecen los microorganismos en el suelo.

El tamaño y la forma de las células depende de ciertos factores de ambiente, tales como la composición del medio, las condiciones de cultivo y la cantidad de oxígeno. Cuando éste es abundante, las células se alargan y se hacen más móviles. La adición de substancias orgánicas coloidales o de sales de aluminio al medio prolonga considerablemente la juventud de las células; en cambio, la de sales alcalinas estimula su maduración.

Modo de favorecer la fijación de nitrógeno en cultivos mixtos. Probablemente, las condiciones del suelo son pocas veces las mejores para que el *Azotobacter* fije nitrógeno. Los coeficientes extraordinarios de fijación obtenidos en el laboratorio no se reproducen en la Naturaleza sino por excepción, o nunca. Los microorganismos asociados pueden mejorar el ritmo normalmente lento de fijación poniendo en libertad elementos esenciales contenidos en minerales del suelo, proporcionando reservas mayores de carbono o asimilando iones de amonio libres. Como las células de *Azotobacter* son capaces de sintetizar biotina, inosita, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, riboflavina y tiamina (Jones y Greaves, 1943), los microbios asociados pueden disponer de estos factores, así como de una provisión de nitrógeno.

Mecanismo de la fijación asimbiótica de nitrógeno. Virtanen y Laine (1939) suponían que el mecanismo de la reacción mediante la cual fijan nitrógeno los *Azotobacter* y *Rhizobium* es probablemente el mismo.

En las dos teorías (Virtanen y Laine, Burris y Wilson) formuladas para explicar la fijación asimbiótica del nitrógeno se parte del supuesto de que la hidroxilamina era el primer compuesto producido. Segal y Wilson (1949) han agregado hidroxilamina a un medio exento de nitrógeno y comprobado que se reducía rápidamente a amoníaco. El *Azotobacter agile* se desarrolla en un medio con hidroxilamina, situado en una atmósfera de hidrógeno y oxígeno, y la vegetación es proporcional a la concentración inicial de hidroxilamina. La proporción del desarrollo se explica enteramente por el amoníaco que resulta de la descomposición de la hidroxilamina.

Los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* ofrecen señaladas diferencias

en la cantidad respectiva de productos excretados. El primero cede al suelo porciones muy pequeñas de compuestos nitrogenados; en el caso del *Rhizobium*, 50 a 80 % del nitrógeno fijado total pasa de los nódulos a la tierra. El *Azotobacter* consume ampliamente los compuestos de nitrógeno fijados para elaborar la proteína de sus propias células.

Wilson, Hull y Burris (1943) han cultivado *Azotobacter vinelandii* en presencia de compuestos nitrogenados normales en una atmósfera que contenía el isótopo estable de nitrógeno (^{15}N). Por análisis isotópicos se ha podido determinar la capacidad de varios compuestos para competir con la reacción de fijación del nitrógeno; a saber:

El amoníaco y los compuestos que se convierten fácilmente en el primero se utilizan excluyendo virtualmente el nitrógeno molecular. Con compuestos de amonio, y probablemente con urea, el cambio de un metabolismo a base de N_2 solamente a otro basado en nitrógeno combinado es rápido y completo. Con otros compuestos, en particular nitratos, es indispensable un período de «adaptación» para que no cese la fijación totalmente. Con asparagina, después de la adaptación se observa una inhibición más pronunciada, aunque no completa, de la fijación de nitrógeno. Los compuestos nitrogenados que el microorganismo asimila con dificultad (ácidos aspártico y glutámico) o no asimila (arginina), no inhiben la fijación de N_2 en grado apreciable. De todo ello se deduce que las pruebas proporcionadas por la investigación con nitrógeno isótopo favorecen la opinión de que el NH_4+ constituye una clave intermedia.

Wilson (1939, 1940) ha demostrado que el hidrógeno molecular actúa como inhibidor específico de la fijación del nitrógeno en plantas inoculadas de trébol común o rojo. Posteriormente, Wyss y Wilson (1941) hicieron cálculos de fijación del nitrógeno por tres especies de *Azotobacter*, y llegaron esencialmente al mismo resultado. De ellos reproducimos el siguiente párrafo:

Cultivos de *Azotobacter* desarrollados en una atmósfera con la presión de N_2 reducida a 0,3 atm, y la de O_2 mantenida a 0,2 atm, y en la que el N_2 consumido no se repone o se sustituye por helio o argón, fijan N_2 atmosférico en proporción igual a la observada con cultivos desarrollados al aire. No obstante, si se reemplaza N_2 por H_2, se advierte una disminución apreciable tanto en la rapidez como en la intensidad de fijación. Como el sistema simbiótico de fijación del nitrógeno en el trébol común responde al H_2 en la atmósfera de modo esencialmente idéntico, se deduce que el mecanismo de la fijación de nitrógeno por el sistema simbiótico es similar, si no igual, al que se observa en los *Azotobacter* libres.

Véase más información en Kyle y Eisenstark (1951), Novak y Wilson (1948), Zelitch, Rosemblum, Burris y Wilson (1951).

Inoculación del suelo con Azotobacter. Se han hecho muchos intentos para aumentar la proporción de nitrógeno en el suelo mediante inoculaciones con cultivos puros de *Azotobacter*. En la mayoría de los casos, los efectos de la inoculación en el rendimiento de plantas no

leguminosas han sido nulos, aun empleando números extraordinariamente elevados de este microorganismo; en general, los *Azotobacter* disminuyen constantemente en los dos o tres meses siguientes a la iniciación del desarrollo. En unos pocos experimentos se ha notado un influjo contraproducente. Los fracasos se atribuyen a los siguientes factores: falta de ambiente adecuado, como temperatura, humedad, cantidad de oxígeno, alimento y reacción del suelo convenientes; carencia de una fuente de carbono, y efectos nocivos de los productos finales liberados al descomponerse el carbohidrato añadido.

Véase más información en Allison (1947), Allison, Gaddy, Pinck y Armiger (1947), Clark (1948), Timonin (1948), Wilson y Burris (1947).

BACTERIAS AUTOTRÓFICAS

Las plantas clorofílicas pueden sintetizar sus propios compuestos orgánicos; toman dióxido de carbono del aire y lo combinan con agua para formar carbohidratos. Absorben el nitrógeno del suelo como nitratos u otros compuestos nitrogenados, y con él sintetizan proteínas.

Algunas especies bacterianas no pueden sintetizar su complejo protoplasma a partir de simples sales inorgánicas, sino que han de disponer de compuestos orgánicos, tales como proteínas, peptonas, aminoácidos y vitaminas. Estos gérmenes se califican de heterotróficos estrictos.

Otras bacterias utilizan para sus necesidades de estructura y energía compuestos inorgánicos y orgánicos. Son heterotróficas facultativas, y constituyen la inmensa mayoría de las que se encuentran en la Naturaleza.

Hay también especies de bacterias que obtienen su carbono del anhídrido carbónico y su energía de la oxidación de compuestos y aun de elementos inorgánicos. No pueden utilizar substancias orgánicas, y la presencia de éstas basta para perjudicarlas: son bacterias autotróficas estrictas, y se distinguen de todas las demás por las siguientes propiedades:

1.ª Su única fuente de energía es la oxidación de material inorgánico.
2.ª Sólo obtienen carbono del anhídrido carbónico, que es, además, insustituible.
3.ª No pueden utilizar ningún otro material para reponer su energía o su carbono.

Las especies autotróficas obligadas son muy pocas; abundan más las autotróficas facultativas, que vegetan de ambos modos. Las primeras comprenden los gérmenes nitrificantes y algunas de las bacterias sulfurosas y ferruginosas. Las formas facultativas pueden obtener su energía por oxidación de substancias inorgánicas y reducción de dióxido de carbono, o bien la toman de compuestos puramente orgánicos. Son autotróficas facultativas algunas de las bacterias sulfurosas, ferruginosas y del hidrógeno.

El grupo autotrófico comprende formas de aspecto morfológico sumamente variado. Unas se presentan como diminutas células muy parecidas a las *Eubacteriales*; otras, a modo de filamentos largos, y las hay muy afines a las algas por su tamaño, figura y manera de dividirse. Algunas contienen un pigmento rojo conocido por bacteriopurpurina, el cual funciona a semejanza de la clorofila cuando las bacterias se exponen a la luz.

BACTERIAS NITRIFICANTES

Los microorganismos nitrificantes derivan su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito, y de éste a nitrato, y se desarrollan a expensas de tal oxidación. No prosperan en medios que contengan materia orgánica, si carecen de las substancias inorgánicas específicas que ellos utilizan como provisión de energía. Muchos compuestos orgánicos comúnmente encontrados en medios corrientes de cultivos son tóxicos para este grupo.

Nitrosificación. Los gérmenes que intervienen en la oxidación de amoníaco a nitrito en el suelo pertenecen a los géneros *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosocystis* y *Nitrosogloea.* Las células son elipsoidales, esféricas o espirales, aerobias, asporógenas, y su temperatura mejor se aproxima a los 25° C. obtienen su energía auxética de la oxidación de amoníaco a nitrito, y medran poco o nada en un medio que contenga materia orgánica.

Aislamiento de los gérmenes. Estas bacterias se pueden aislar del suelo creando condiciones desfavorables para el desarrollo de otras especies. Se emplea un sencillo medio inorgánico que contenga un compuesto amónico, carbonato magnésico y otras sales. Como los microorganismos son señaladamente aerobios, los cultivos deben exponerse al aire en capas delgadas; los matraces de Erlenmeyer son muy apropiados para el caso.

Sólo se forman nitritos en terrenos neutros o ligeramente alcalinos; el amoníaco del medio pasa por oxidación a ácido nitroso y, a medida que éste aumenta, disminuye la proporción del primero, hasta que todo el amoníaco se convierte en nitrito. El proceso se prolonga añadiendo más sal amónica, siempre que haya un exceso de carbonato magnésico para neutralizar el ácido nitroso. Una vez descompuesto todo el carbonato, los gérmenes deben trasladarse a un matraz con medio fresco o reciente. Se obtienen colonias sembrando en estrías las bacterias sobre el mismo medio solidificado con ácido silícico, substancia mejor que el agar para el cultivo de gérmenes nitrificantes.

Preparación de placas con gel de sílice. Los métodos de preparación de estos medios de cultivo se basan en una reacción química entre silicato sódico y ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o entre un ortosilicato orgánico y agua. Después de formado el gel, se lava con agua, para eliminar impurezas, y se trata luego con el medio inorgánico, que es absorbido por el silicato poroso.

Anderson y Macsween (1942) recomiendan un medio de este tipo, que se prepara como sigue:

Se diluye con agua vidrio soluble del comercio (silicato sódico), hasta un peso específico de 1,3. Se mezcla 1 vol. de la solución con 9 vol. de medio de cultivo y 25 ml de azul de bromotimol al 0,04 % por litro. La solución se esteriliza a través de un filtro de Seitz lo antes posible, una vez efectuada la mezcla. Una demora de una o dos horas tan sólo retarda considerablemente la filtración, y con dos o tres días de reposo se constituye el gel. La mezcla de silicato y caldo filtrada se lleva asépticamente a una vasija estéril; se ajusta entonces el pH, añadiendo al efecto ácido fosfórico 8 N ó 4 N, en condiciones asépticas. Se forma gel con pH entre 5 y 9, pero mucho más aprisa hacia el lado alcalino; el punto óptimo parece ser 7,2, pero puede variarse a fin de adaptarlo a las necesidades del germen estudiado. Para ajustar a un pH de 7,2 la mezcla de caldo y silicato, se requiere un volumen de ácido fosfórico 8 N unas diez veces menor que el del caldo. La gelificación con este pH tarda unos dos minutos, y da tiempo más que suficiente para la distribución en placas. Conviene incubar éstas durante 24 horas en posición invertida antes de usarlas, para que escurra por completo el líquido del gel por sinéresis; de no hacerlo así, la siembra puede ser arrastrada o dar una vegetación difusa. El líquido que escurre se puede retirar asépticamente, si se quiere, aunque no es necesario, en realidad. La incubación preliminar sirve también para comprobar la esterilidad.

Temple (1949) ha sugerido un método simplificado para preparar placas con gel de sílice. Emplea «Ludox» (DuPont), una solución acuosa de sílice coloidal al 30 %.

La solución se diluye hasta 10 % de sílice; se añaden substancias nutritivas (sales), se ajusta el pH, si se quiere, y se dispone el medio en placas; éstas se llevan al autoclave, y al mismo tiempo se provoca la gelificación. Las placas quedan bastante firmes para sembrar fácilmente en estrías. Como el gel de sílice es más sensible que el agar a la desecación y las grietas, las placas se pondrán en el autoclave dentro de un bote, se calentarán despacio y se incubarán en un recipiente con algo de agua.

Los gérmenes nitrosificantes se hallan muy difundidos en la Naturaleza, prácticamente en todos los terrenos de reacción neutra o alcalina. Son los agentes iniciales de la formación de nitratos, que las plantas superiores toman luego del suelo para sintetizar proteínas y otros compuestos nitrogenados.

Nitrificación. Los microorganismos autotróficos incapaces de convertir amoníaco en nitrito por oxidación, pero que oxidan nitritos a nitratos, son miembros de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrocystis*.

Aislamiento de gérmenes. El medio empleado para el cultivo de estos gérmenes es similar al ya descrito, salvo que el sulfato amónico se substituye por nitrito sódico. Sembrando en un medio de esta clase una muestra adecuada de tierra, disminuye gradualmente el contenido en nitrito y aumenta en proporción la cantidad de nitrato. Para enriquecer el cultivo en bacterias nitrificantes son necesarias varias resiembras en medio fresco; éste no es específico para el desarrollo de microbios productores de nitratos, y por eso puede contener otras especies.

Todos los suelos neutros o ligeramente alcalinos presentan microorganismos capaces de oxidar amoníaco a nitrito, y finalmente a nitrato. Martin, Buehrer y Caster (1942) han aportado demostraciones experimentales de que existe un pH liminar de 7,7 $\pm$ 0,1 para la nitrificación de amoníaco en terrenos desérticos alcalinos. Las bacterias nitrificantes son peculiarmente sensibles a la alcalinidad, y apenas hacen pasar nitritos a nitratos por oxidación, con valores pH apenas superiores al liminar. Justamente por debajo de este pH, la oxidación de nitritos acumulados hasta convertirlos en nitratos se hace tan rápida, que suscita dudas en cuanto al carácter puramente microbiológico de la transformación. Es significativo que las bacterias presenten un cambio tan pronunciado de actividad dentro de un margen de pH tan limitado.

Véase más información sobre el tema en Lees (1951), Lees y Quastel (1946), Meiklejohn (1950, 1953), y Quastel y Scholefield (1951).

BACTERIAS SULFUROSAS

En la tierra se encuentra abundante azufre, libre y combinado. Lo contienen en esta última forma compuestos orgánicos e inorgánicos; ejemplos del primer grupo son: taurina y sus derivados, mucina, mucoide, proteínas, cistina, cisteína, metionina, metilmercaptano, tiourea, tiamina, biotina, etc., y del segundo, principalmente sulfatos, tiosulfatos, sulfitos y sulfuros.

Los gases que despiden los volcanes contienen dióxido de azufre y sulfuro de hidrógeno. Hay grandes cantidades de azufre en los manantiales sulfurosos, y azufre volcánico sublimado en las paredes de respiraderos, probablemente a causa de reacciones entre el sulfuro de hidrógeno y el dióxido de azufre. La reserva comercial más importante de azufre es la piedra pómez recogida en las laderas de volcanes o extraída de minas en ciertas partes del mundo; se encuentran vastos depósitos en la isla de Sicilia y en Luisiana. Se expende en forma de flor de azufre, preparado de la piedra pómez por sublimación. El azufre llega al suelo por efecto de la descomposición de rocas nativas, o procede de abonos orgánicos o de agua de lluvia.

Este elemento es uno de los indispensables para los seres vivientes, pues forma parte de todas las células vegetales y animales. La adición de azufre a un terreno escaso en este elemento estimula notablemente la vegetación. Al morir y descomponerse plantas y animales, el azufre escapa a la atmósfera; el agua de lluvia disuelve los gases y los

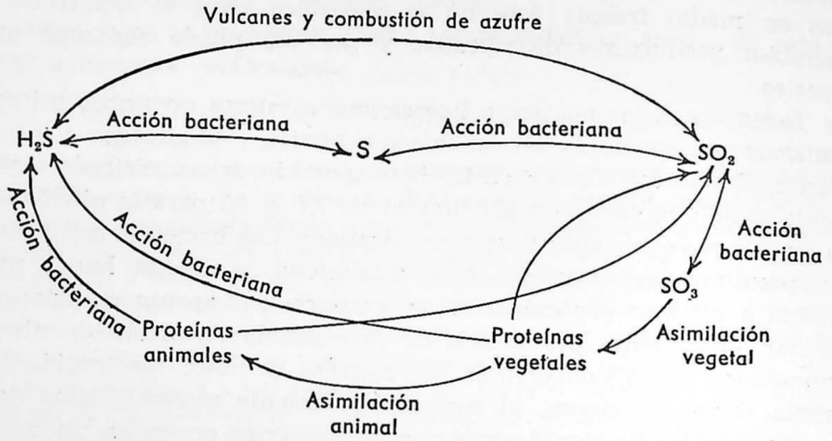


Fig. 207. — Ciclo del azufre en la Naturaleza.

restituye al suelo, donde ciertos gérmenes convierten en sulfatos los que contienen azufre. De estos sulfatos utilizan una parte las plantas en desarrollo, y la otra es arrastrada por las aguas hasta el mar; allí, los sulfatos pueden reducirse a sulfuros y ser luego precipitados con hierro como sulfuro ferroso, o convertirse en sulfato cálcico insoluble. Se supone que los depósitos de yeso (sulfato cálcico) se han formado de este modo. Los yacimientos de azufre son probablemente el resultado de la reducción de sulfatos a sulfitos, y luego a azufre elemental, o bien de la oxidación de sulfuro de hidrógeno. En la figura 207 se expone esquemáticamente el ciclo del azufre en la Naturaleza.

Bacterias sulfurosas estrictamente autotróficas. Las bacterias autotróficas estrictas capaces de derivar su energía de la oxidación de azufre o de compuestos del mismo pertenecen al género *Thiobacillus*, que comprende células bacilares pequeñas, grampositivas, inmóviles o móviles por medio de un solo flagelo polar. Obtienen su energía de la oxidación de azufre elemental y tiosulfatos, y en algunos casos también de sulfuros, sulfitos y politionatos. Se desarrollan en condiciones ácidas y alcalinas y toman su carbono del anhídrido carbónico o de bicarbonatos disueltos. Las especies autotróficas estrictas de este género son *T. thioparus* y *T. thioxidans*.

Thiobacillus thioparus. En un medio inorgánico con tiosulfato sódico, este germen forma por oxidación sulfatos y azufre libre; este último, al proseguir la oxidación, se convierte en ácido sulfúrico:

$$5Na_2S_2O_3 + H_2O + 4O_2 \rightarrow 5Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4S$$
$$4S + 6O_2 + 4H_2O \rightarrow 4H_2SO_4$$

En la superficie del medio se forma una película consistente en mezcla de bacterias y gránulos de azufre. Sobre agar con tiosulfato, las colonias son pequeñas, circulares y de color amarillo blanquecino por el azufre precipitado.

En presencia de aire con dióxido de carbono, pero exento de carbonato o bicarbonato disuelto, el desarrollo es mucho más lento. Si también falta el dióxido de carbono, no hay vegetación, ni siquiera en presencia de diversos compuestos orgánicos; los microbios no pueden acumular entonces azufre en el interior de sus células, aunque fuera de ellas sea abundante la producción. La formación de azufre y sulfato a expensas de tiosulfato constituye una reacción exotérmica que desprende considerable energía; ésta sirve para reducir bicarbonato sódico y sintetizar compuestos de sostén. El tiosulfato sódico puede substituirse por un sulfuro metálico, un tetrationato o sulfuro hidrógeno; el dióxido de carbono no se puede reemplazar por compuestos de carbono orgánicos como fuente de este elemento.

Thiobacillus thiooxidans. Sus células son bacilos cortos, redondeados por los extremos, y que se presentan sueltos, apareados o en cadenas; se mueven mediante un solo flagelo polar y son gramnegativos. Se desarrollan mejor en medio ácido y consumen carbono del anhídrido carbónico, pocas veces del bicarbonato y en ningún caso de carbonatos.

La adición de azufre al suelo proporciona ácido sulfúrico por oxidación:

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$$

Si a una mezcla de azufre y tierra se agrega fosfato cálcico insoluble en polvo, el ácido sulfúrico resultante del azufre solubiliza el fosfato:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 3H_2SO_4 + 6H_2O \rightarrow 3CaSO_4 \cdot 2H_2O + 2H_3PO_4$$

El fosfato tricálcico se convierte en sulfato cálcico y ácido fosfórico. La cantidad de fosfato disuelto es directamente proporcional al contenido en ácido sulfúrico del suelo.

Los bacilos se cultivan con facilidad en un medio de sales inorgánicas con azufre libre y reacción ácida. Como son aerobios estrictos, el desarrollo se acelera disponiendo el medio en capas delgadas. Al microscopio, los gránulos de azufre aparecen rodeados de los gérmenes espe-

cíficos; la acidez del medio aumenta al mismo tiempo que éstos se desarrollan en una escala de pH de 0,5 a 6, con zona óptima entre 2 y 3,5. El *T. thiooxidans* produce más ácido, por oxidación de azufre, y sigue viviendo en un medio de mayor acidez que la resistida por ningún otro germen conocido hasta ahora, pues el pH desciende hasta 0,6 y menos. Las células no sólo sobreviven, sino que incluso se desarrollan en ácido sulfúrico al 5 a 7 %.

En una serie de investigaciones sobre el *T. thiooxidans*, Vogler (1942 *a*, *b*); Vogler, LePage y Umbreit (1942); Vogler y Umbreit (1942), y LePage (1942) demostraron que se producía una captación mensurable de oxígeno en ausencia de azufre. Se ha podido diferenciar la respiración endógena de la sulfurosa mediante ciertos inhibidores, entre los cuales sirve de ejemplo notable la azida sódica; la respiración resulta ser efecto del consumo de materiales orgánicos, que seguramente han sido sintetizados de antemano por síntesis química, lo cual demuestra que las bacterias autotróficas desarrollan un proceso de disimilación que comprende el desdoblamiento de materiales orgánicos y proporciona energía para sustentar la célula durante períodos en que falta la substancia nutritiva específica. Está comprobado que el material orgánico de reserva es un polisacárido formado durante la vegetación a base de azufre. En la descomposición de este material parecen intervenir productos fosforilados intermedios, que son esencialmente los mismos hallados en células heterotróficas.

Corrosión de hormigones y de mezclas para soldar tubos. Se ha observado que las actividades de bacterias sulfooxidantes del género *Thiobacillus* ocasionan una corrosión intensa del hormigón. Parker (1947) señala que la oxidación de azufre o de sulfuro de hidrógeno produce ácido sulfúrico suficiente para corroer ese material. Las principales especies aisladas son *T. thioparus* y *T. concretivorus* (probablemente idéntico al *T. thiooxidans*). Informes similares proceden de Taylor y Hutchinson (1947), quienes han encontrado bacterias sulfooxidantes (*T. thiooxidans*) en número superior a 1 000 000 por gramo de hormigón corroído en húmedo.

Para soldar las uniones de cañerías de hierro fundido se emplean mezclas con una proporción relativamente grande de azufre. El material fundido se vierte en las juntas, donde forma un cemento impermeable. De ordinario, este material de soldadura se mantiene intacto años enteros, pero a veces se descompone el cemento sulfuroso en ciertas condiciones; se ha informado que el principal germen causante de ello es también el *T. thiooxidans*. Al parecer, el azufre pasa por oxidación a sulfato, y las bacterias sulfooxidantes reducen éste a sulfuro (pág. 379).

Se encontrará más información sobre el particular en Frederick y Starkey (1948), Leathen (1953) y Umbreit (1947).

Bacterias sulfurosas autotróficas facultativas. Se han aislado muchos gérmenes sulfurosos que no parecen ser autotróficos estrictos. Por su carácter ambiguo, se han clasificado por recurso como formas autotróficas facultativas.

Comúnmente se encuentran en aguas que contienen sulfuro de hidrógeno disuelto, procedente de la descomposición de materia orgánica por gérmenes saprófitos. Las bacterias viven en substratos tales como algas marinas en descomposición, charcas roqueras que contengan algas muertas y otras formas inferiores de vida vegetal, aguas estancadas y residuales, etc. Se han hallado bacterias sulfurosas en manantiales sulfurosos calientes y en minas de azufre; algunas especies pueden vivir en cañerías de agua y ocasionar graves obstrucciones. Al morir y descomponerse, producen malos olores y alteran el sabor del agua.

Las principales bacterias sulfurosas facultativas se incluyen en las familias *Acromatiáceas, Begiatoáceas, Clorobacteriáceas* y *Tiorrodáceas.*

Acromatiáceas. Células grandes, de figura esférica a ovoide, a veces bacilares; pueden contener glóbulos de azufre, cristales de carbonato cálcico, o ambas cosas. No poseen pigmentos fotosintéticos.

Begiatoáceas. Microorganismos filamentosos, compuestos de cadenas de células; las sueltas no suelen verse sin teñir. Carecen de clorofila y ficocianina. Cuando se desarrollan en presencia de sulfuro de hidrógeno, los filamentos contienen glóbulos de azufre.

Clorobacteriáceas. Bacterias verdes, habitualmente pequeñas, sueltas o en agregados celulares de diversas formas y tamaños, que se desarrollan en medios con sulfuro de hidrógeno a concentraciones más bien elevadas y expuestos a la luz. Por lo general, no albergan glóbulos de azufre, pero con frecuencia depositan azufre elemental fuera de las células. Contienen pigmentos verdes de naturaleza clorofílica, aunque no idénticos a las clorofilas comunes de las plantas verdes, ni a la bacterioclorofila. Son capaces de fotosíntesis en presencia de sulfuro de hidrógeno, y no dejan oxígeno en libertad.

Tiorrodáceas. Microbios unicelulares, que a menudo se desarrollan en forma de agregados o familias celulares de diversas formas y tamaños. Las células sueltas son esféricas, ovoides, o con figura de bacilos cortos, vibrios, espirales, bacilos largos, a veces cadenas. Se encuentran naturalmente en medios que contengan sulfuros, y necesitan luz para vegetar; sirven al efecto los rayos infrarrojos con longitud de onda hasta de unas 900 mμ. Producen un sistema pigmentario compuesto de bacterioclorofila verde y carotenoides amarillos y rojos; en consecuencia, aparecen como masas celulares de color púrpura pálido, pardusco a rojo intenso. Las células sueltas, aun siendo grandes, suelen dar impresión de no estar pigmentadas. Son gérmenes anaerobios o microaerófilos, con un metabolismo fotosintético, en el que se reduce dióxido de carbono con ayuda de donadores especiales de hidrógeno, sin poner en libertad oxígeno molecular. Cuando se encuentran estos microorganismos en la Naturaleza, el sulfuro de hidrógeno cede este último, y en las células se acumula azufre, primer producto intermedio de la oxidación, a modo de gotitas. Probablemente todos los miembros del grupo pueden aprovechar diversas substancias orgánicas como donadoras de hidrógeno para la fotosíntesis. Son potencialmente mixotróficos.

Fotosíntesis bacteriana. La fotosíntesis vegetal se puede definir como la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua, en tejidos cargados de clorofila, con ayuda de la energía radiante del sol.

Las fases primera y última del proceso pueden resumirse por la ecuación.

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} \underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2$$

El dióxido de carbono se reduce a carbohidrato, y el agua se descompone, dejando oxígeno libre; la reacción es aeróbica.

Son también fotosintéticas ciertas bacterias incluidas en las familias *Atiorrodáceas, Tiorrodáceas* y *Clorobacteriáceas.*

Atiorrodáceas. Bacterias unicelulares, relativamente pequeñas, con figura de esferas, bacilos cortos, vibrios, bacilos largos y espirales; móviles por medio de un flagelo polar, gramnegativas. Producen un sistema pigmentario compuesto de bacterioclorofila y uno o más carotenoides, que dan a las células una coloración pardoamarillenta, pardoolivácea, pardooscura o diversas tonalidades del rojo. El color no suele percibirse en células sueltas, sino sólo en masas celulares. Son generalmente microaerófilas, aunque hay muchas que crecen a la tensión plena del oxígeno atmosférico. Pueden desarrollarse en condiciones anaeróbicas estrictas, pero sólo en cultivos iluminados, en virtud de un metabolismo sintético; éste depende de la presencia de donadores extraños de hidrógeno, como alcoholes, ácidos grasos, hidroxiácidos y cetoácidos, y no produce desprendimiento de oxígeno molecular. Los gérmenes que pueden medrar en presencia del aire son cultivables también en la oscuridad, pero sólo en condiciones aeróbicas.

Las características de las otras dos familias se han expuesto anteriormente.

Las bacterias fotosintéticas son de colores muy diversos: verde, pardo, rojo o purpúreo. Pueden vivir en medios estrictamente inorgánicos, al abrigo del aire, pero sólo cuando se iluminan los cultivos. Producen materia orgánica a partir de dióxido de carbono, única fuente de este elemento en el medio. Los pigmentos fotosintéticos contenidos en las bacterias son semejantes por su estructura a la clorofila de las plantas, pero no idénticos.

Las bacterias sulfurosas o tiobacterias verdes y purpúreas se desarrollan en medios inorgánicos que contengan sulfuro de hidrógeno, en presencia de luz y en condiciones completamente anaeróbicas; no lo hacen cuando falta sulfuro de hidrógeno o dióxido de carbono. La reacción no desprende oxígeno, como ocurre en las plantas verdes.

Durante el crecimiento de bacterias sulfurosas verdes, el sulfuro de hidrógeno pasa por oxidación a sulfuro libre, que se deposita fuera de las células:

$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow{\text{Luz}} CH_2O + H_2O + 2S$$

Cuando crecen las bacterias sulfurosas purpúreas, el sulfuro de hidrógeno se oxida a ácido sulfúrico:

$$2CO_2 + H_2S + 2H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} 2CH_2O + H_2SO_4$$

El carbono de anhídrido carbónico que desaparece puede recuperarse de las células bacterianas como carbono orgánico. No hay desarrollo en la obscuridad, aunque el ambiente sea anaeróbico.

Las bacterias no sulfurosas pardas y rojas contienen también un pigmento fotosintético, y son sensibles a la luz en condiciones anaeróbicas; pero muestran las siguientes diferencias frente a las bacterias sulfurosas verdes y purpúreas:

1.ª No contienen gránulos de azufre dentro de sus células.

2.ª Reducen dióxido de carbono en presencia de donadores extraños de hidrógeno, tales como alcoholes, ácidos grasos, hidroxiácidos y cetoácidos, sin desprendimiento de oxígeno molecular. En presencia de ácido butírico, la reacción es

$$CO_2 + C_3H_7{\cdot}COOH + H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} 5\,CH_2O$$

3.ª Pueden producir hidrógeno molecular y dióxido de carbono en presencia de ácido dicarboxílico, ácido glutámico o aspártico como fuente de nitrógeno, y de biotina como factor de crecimiento. La producción neta de CO_2 y H_2 es extraordinaria, dado que estos microorganismos pueden consumir H_2 y CO_2, según la reacción.

$$2\,H_2 + CO_2 \xrightarrow{\text{Luz}} \text{«material celular»}$$

Las bacterias sulfurosas verdes y púrpuras pueden ser adaptadas al desarrollo en medios que contengan compuestos orgánicos sencillos en vez de sulfuro de hidrógeno. De manera análoga, las bacterias no sulfurosas pardas y rojas se pueden adaptar al desarrollo en medios que contengan sulfuro de hidrógeno en lugar de ciertos compuestos orgánicos sencillos. Para expresar el metabolismo de las bacterias fotosintéticas sirve la siguiente reacción general:

$$CO_2 + 2\,H_2A \xrightarrow{\text{Luz}} CH_2O + H_2O + 2\,A$$

Véase más información sobre el tema en Bred, Murray y Hitchens (1949), Duchow y Douglas (1949), Gaffron (1933, 1935), Gest (1951), Larsen (1952), Newton y Wilson (1953), y Van Niel (1941, 1944, 1949).

SIDEROBACTERIAS

Después del oxígeno, el hierro es el elemento abundante más necesario para la vida celular. En algunas especies sólo se han encontrado cantidades pequeñísimas, pero, aun así, es absolutamente necesario para el desarrollo y el bienestar de todos los animales y plantas.

En la clorofila, materia colorante verde de los vegetales, hay más magnesio que hierro; sin embargo, cuando falta por completo el hierro, las hojas no se ponen verdes, y si a una planta con la clorofila ya bien desarrollada se le quita hierro, su color se vuelve paulatinamente amarillo.

Ciertos microorganismos existentes en el agua y en la tierra son

capaces de tomar hierro del medio y acumularlo en la superficie de sus células, donde se oxida con rapidez y se convierte en hidróxido férrico. Las siderobacterias autotróficas de importancia están clasificadas dentro de los órdenes *Eubacteriales* y *Clamidobacteriales*; el primero comprende el género *Gallionella*, y el segundo, los géneros *Clonothrix*, *Crenothrix* y *Leptothrix*.

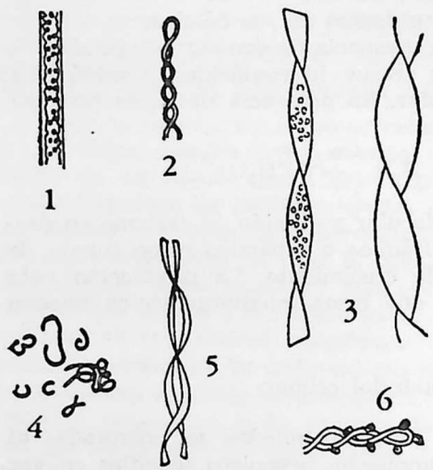


Fig. 208. — Siderobacterias. 1, *Leptothrix ochracea*; 2, 3, 4, 5 y 6, *Gallionella ferruginea*. (Según Ellis.)

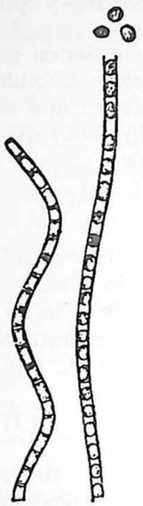


Fig. 209. — Filamentos de *Crenothrix polyspora*, diferenciados en base y porción apical (Según Zopf.)

Gallionella. Comprende bacterias pediceladas, con el eje largo de las células bacilares perpendicular al del pedicelo; éste consiste en una banda retorcida y ahorquillada, compuesta de hidróxido férrico, que se disuelve por completo en ácido clorhídrico (fig. 208). Las células se reproducen por escisión binaria transversal; cuando jóvenes, son incoloras, y luego se vuelven pardas o rojas de herrumbre, por acumulación de hierro. Los filamentos retorcidos se identifican fácilmente, pues no se conoce otro germen de carácter similar que adopte esta forma. Al incrustarse de hierro las espiras, el filamento parece una sarta de cuentas. No se ha demostrado la existencia de vaina. Los gérmenes se adhieren a cañerías de agua, y originan depósitos considerables de hierro, que comprometen seriamente la circulación; por eso se llaman a veces «bacterias de la peste del agua». Se hallan muy difundidas en la Naturaleza.

Clonothrix. Filamentos adheridos, con ramificaciones falsas. Vainas de substancia orgánica, incrustadas de hierro o manganeso, anchas por la base y afiladas hacia el ápice. Células incoloras, cilíndricas. Se reproducen mediante conidios esféricos, dispuestos en cadenas por escisión transversal de las células; la formación de conidios es acrópeta, y se limita a ramas cortas de la porción más joven del filamento. Estos gérmenes se encuentran en obras de fontanería y tubos de conducción de agua.

Crenothrix. Filamentos sin ramificaciones, unidos a un substrato firme, con base y ápice diferenciados. Vainas patentes, delgadas e incoloras por la punta, gruesas e incrustadas de hierro por la base. Células cilíndricas a

esféricas, divididas en tres planos para producir los conidios esféricos inmóviles; éstos pueden quedar libres y dar origen a nuevas células, o bien germinan dentro de la vaina. La *C. polyspora* es la única especie identificada (fig. 209). Se encuentran en aguas estancadas y corrientes que contengan materia orgánica y sales de hierro; crecen en agregados gruesos, que dan al agua un color pardusco o verdoso, pero no se desarrollan en medios artificiales. Cuando los filamentos mueren, los descomponen rápidamente microorganismos existentes en el agua, y desprenden olores desagradables.

Leptothrix. Filamentos compuestos de células incoloras, cilíndricas, con una vaina que primero es fina e incolora, y luego se hace más gruesa y toma color amarillo o pardo, por incrustarse de hidróxido férrico; éste se puede disolver con ácido clorhídrico diluido, y entonces se ven bien las células internas. Se multiplican por escisión y separación de las células, y también por planetocitos cilíndricos; éstos germinan a veces en las vainas, con lo que los filamentos parecen realmente ramificados. Se encuentran en ríos, lagos, charcas y pantanos que contengan hierro combinado con materia orgánica. La especie más conocida, *L. ochracea*, es cosmopolita (fig. 208).

Las siderobacterias autotróficas pueden oxidar los compuestos ferrosos a férricos y utilizar la energía así obtenida para la asimilación quimiosintética de carbono. Estos microorganismos deben distinguirse de las formas capaces de precipitar hierro por descomposición de compuestos orgánicos de este elemento. En los gérmenes del segundo grupo, el hierro no participa apreciablemente en su desarrollo; obtienen su energía de la oxidación de la parte orgánica de los compuestos.

La reacción de oxidación de hierro por las bacterias ferruginosas autotróficas es como sigue:

$$4\,FeCO_3 + O_2 + 6\,H_2O \rightarrow 4\,Fe(OH)_3 + 4\,CO_2 + 40\ cal.$$

Puede advertirse que esta reacción proporciona muy poca energía. Para cubrir sus necesidades energéticas, los gérmenes han de precipitar grandes cantidades de hierro en forma de hidróxido férrico. Esto explica por qué se encuentran masas voluminosas de hidróxido férrico en aguas que contienen siderobacterias autotróficas.

Las aguas ferruginosas suelen presentar en el fondo de su cauce un limo amarillento o rojizo, color que proviene de la sedimentación de hierro en las vainas exteriores de los filamentos. La acumulación de hierro y su oxidación a hidróxido férrico dan origen a una membrana dura y rígida, que a veces acarrea la muerte de las bacterias. Los filamentos viejos contienen más hierro que los jóvenes, cuyas células presentan en algunos casos vainas desprovistas en absoluto de este elemento. El hidróxido férrico se puede disolver con ácido clorhídrico diluido, y entonces se hacen visibles las membranas de fuera.

Se encontrará más información sobre siderobacterias en los trabajos de Breed, Murray y Hitchens (1949), Cholodny (1926), Colmer, Temple y Hinkle (1950), Olsen y Szybalski (1949), Pringsheim (1949), Starkey (1945), Temple y Colmer (1951).

CICLO DEL FÓSFORO

El fósforo no se encuentra nunca libre en la Naturaleza. Forma parte de muchos compuestos inorgánicos y orgánicos, y entra en la composición de fosfatos orgánicos, de hexosa, triosa y adenosina, ácidos adenílico, fosfopirúvico, codeshidrogenasas I y II, ácidos nucleicos, fosfoproteínas, lecitinas, fitina, etc. Los fosfatos se encuentran en el suelo y en yacimientos naturales; el esqueleto del hombre y de los animales consta en gran parte de fosfato cálcico.

Compuestos fosforados orgánicos. Muchos microorganismos del suelo pueden atacar compuestos orgánicos de fósforo. Hidrolizan la lecitina y dejan libres glicerina, ácidos grasos, ácido fosfórico y colina. Son posibles muchas lecitinas, según la naturaleza de los radicales ácidos grasos que intervengan (pág. 311).

La fitina es el éster fosfórico de la inosita. Abunda en los tejidos vegetales, sobre todo en semillas y granos. Algunos microbios elaboran la enzima fitasa, que hidroliza la fitina y la transforma en inosita y ácido fosfórico (pág 312). La inosita es atacada y fermentada como otros carbohidratos o compuestos similares.

Fosfatos de calcio. Los gérmenes del suelo convierten fosfatos cálcicos insolubles en otros solubles. Se atribuye esta acción disolvente a la presencia de ácidos orgánicos y dióxido de carbono, producidos por bacterias del suelo. El dióxido de carbono parece ser más eficaz que los ácidos orgánicos para solubilizar los fosfatos insolubles.

$$Ca_3(PO_4)_2 + 4\,H_2O + 4\,CO_2 \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 2\,Ca(HCO_3)_2$$
$$2CaHPO_4{\cdot}2H_2O + 2CO_2 \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + Ca(HCO_3)_2 + 2H_2O$$
$$Ca_4P_2O_9 + 5H_2O + 6CO_2 \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 3Ca(HCO_3)_2$$

Entre estos diversos ácidos orgánicos se cuentan el butírico, el láctico, el acético, el cítrico, el oxálico y el fumárico, todos los cuales reaccionan con los fosfatos para dar butiratos, lactatos, acetatos, citratos, oxalatos, fumaratos y ácido fosfórico. Las sales de los ácidos orgánicos suelen seguirse oxidando hasta transformarse en dióxido de carbono y carbonatos.

La presencia de sales amónicas en el suelo permite a las bacterias autotróficas oxidarlas primero a ácido nitroso y luego a ácido nítrico; el ácido correspondiente al radical negativo queda libre, y pasa igualmente a la tierra. Si la sal es sulfato amónico, se desprenderá algo de ácido sulfúrico. Los ácidos pueden reaccionar con fosfato cálcico insoluble y convertirlo en compuestos solubles:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 2HNO_2 \rightarrow 2CaHPO_4 + Ca(NO_2)_2$$
$$Ca_3(PO_4)_2 + 4HNO_4 \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 2Ca(NO_2)_2$$
$$Ca_3(PO_4)_2 + H_2SO_4 \rightarrow 2CaHPO_4 + CaSO_4$$

Para transformar el fosfato tricálcico insoluble en la forma soluble se necesita una concentración de hidrogeniones relativamente elevada. La mayor parte del ácido nitroso liberado reacciona con carbonatos cálcico y magnésico y con sales de ácidos orgánicos, y el ácido nitroso es reemplazado por ácidos orgánicos débiles. En presencia de mucho ácido, se disuelve algo de fosfato insoluble; pero el grado de acidez requerido con este objeto es tan elevado, que probablemente destruiría la planta en desarrollo. Es decir, que las bacterias nitrificantes proporcionan sólo una pequeña cantidad de los fosfatos solubles contenidos en la tierra.

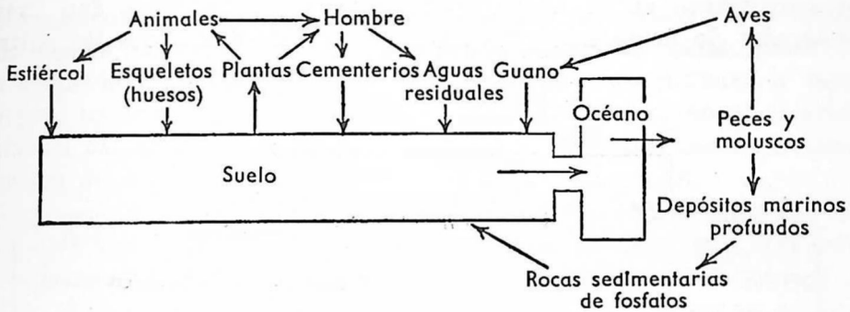


Fig. 210. — Ciclo del fósforo. (Según Lotka.)

Oxidan y transforman el azufre en ácido sulfúrico gérmenes del género *Thiobacillus*. La disolución de los fosfatos minerales por el ácido sulfúrico es muy similar a su transformación por el ácido nitroso: el ácido sulfúrico reacciona con carbonatos cálcico y magnésico, y con sales de ácidos orgánicos, antes que con fosfatos insolubles. La intensa acidez (pH 3, aproximadamente) necesaria para disolver fosfatos es notoriamente perjudicial para plantas en desarrollo.

El ciclo del fósforo se puede representar esquemáticamente como muestra la figura 210.

Nucleoproteínas. Las nucleoproteínas están ampliamente distribuidas en la Naturaleza, pues forman parte de todas las células vivas, sobre todo de sus núcleos. Son combinaciones de ácido nucleico con proteínas; de ambos se han aislado diversos tipos, lo cual indica que hay muchas clases de nucleoproteínas naturales. Las proteínas del compuesto son de carácter básico, pues pertenecen al grupo de las protaminas o al de las histonas.

Las nucleoproteínas dan reacción ácida y son insolubles en agua; se disuelven en álcalis diluidos, y precipitan de la solución al acidularla. Su composición es muy compleja, y son inestables químicamente. El ácido nucleico se puede separar generalmente de la fracción proteínica con ayuda de sales o agregando con cuidado ácidos o álcalis. En muchos casos, estos compuestos parecen ser mezclas de proteínas y ácido nucleico, más bien que compuestos químicos definidos. La acción

de las enzimas o de ácidos débiles sobre las proteínas provoca la separación de parte de la proteína y transforma el compuesto en una mezcla de proteína y nucleína; esta última contiene aún algo de la primera. Insistiendo, se separa el resto de la proteína y queda libre ácido nucleico, tal como se indica en el esquema de la figura 211.

Ácidos nucleicos. Estos compuestos contienen mucho fósforo y dan reacción ácida. Se conocen dos tipos; ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico; el primero suele encontrarse en el citoplasma de células vegetales y animales, en forma de gránulos, y el otro aparece principalmente en el núcleo. Por hidrólisis ambos tipos dan cuatro moléculas de ácido fosfórico, cuatro de carbohidrato, dos de purinas

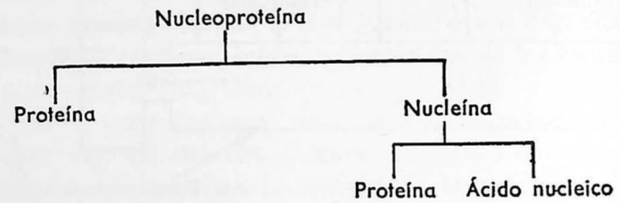
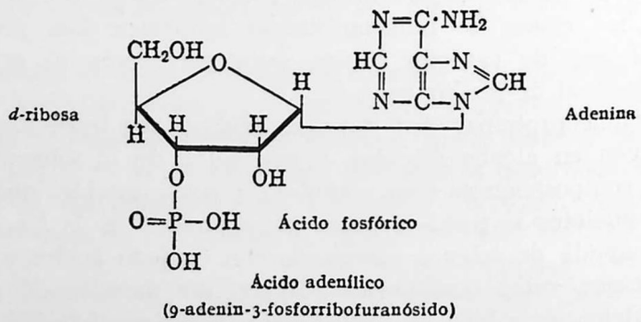


Fig. 211. — Descomposición por hidrólisis de una nucleoproteína en ácido nucleico y proteína.

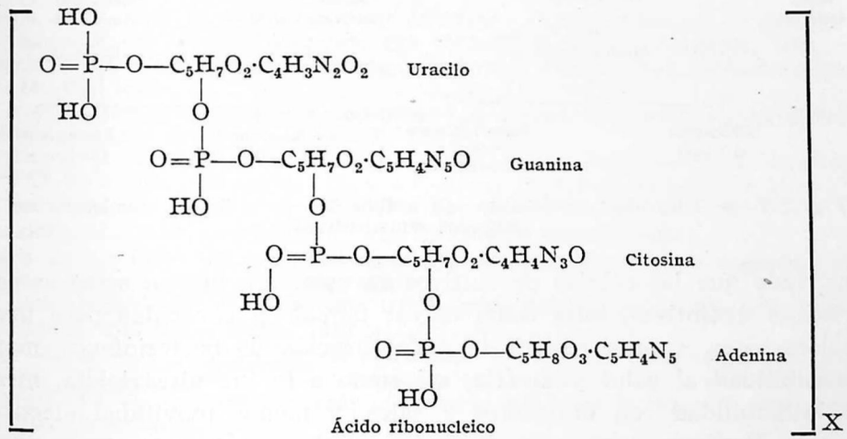
y dos de pirimidinas. Esta idea aproximada se basa en el supuesto de una estructura de tetranucleótido, que estudiamos más adelante. El ácido ribonucleico contiene la pentosa *d*-ribosa, y el ácido desoxirribonucleico encierra la desoxipentosa *d*-2-ribodesosa. En ambos tipos de ácido nucleico están presentes las purinas adenina y guanina, pero difieren uno de otro por las clases de pirimidinas componentes; las del ácido ribonucleico son citosina y uracilo; las del desoxirribonucleico, timina y citosina.

Generalmente se cree que una molécula de ácido nucleico consta de cuatro mononucleótidos. La estructura de un mononucleótido del ácido ribonucleico se imagina como sigue:



Esto es cierto solamente en cuanto al ácido ribonucleico. En el desoxirribonucleico, el ácido fosfórico está ligado al carbono 5 del azúcar. En las coenzimas ácido adenílico y adenosina, un extremo de la molécula de azúcar (carbono 5) está ligado al ácido fosfórico, y el otro (carbono 1), se une a la posición 7 de la adenina (pág. 422).

El ácido adenílico da por hidrólisis ácido fosfórico, *d-ribosa* y adenina. El nucleótido toma su nombre de la base purínica o pirimidínica presente. Por ejemplo, un nucleótido que contenga guanina se conoce por ácido guanílico; el que contiene citosína, por ácido citidílico, etc. Generalmente se cree que una molécula de ácido nucleico, en su forma más simple, es un tetranucleótido, cada uno de los cuales difiere de los demás por la naturaleza de la base (purinas y pirimidinas), y tiene un peso molecular aproximado de 1300. En su estado natural, el ácido nucleico parece existir en unidades mayores, formadas por la polimerización de un número ignorado de tetranucleótidos:



Los mononucleótidos del ácido ribonucleico se unen entre sí por un enlace de éster entre el ácido fosfórico de uno y el azúcar de otro, mediante el carbono 2. En el ácido desoxirribonucleico, el ácido fosfórico se enlaza por medio del carbono 3 del azúcar.

En la figura 212 se expone la hidrólisis de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico en sus unidades integrantes por la acción enzimática.

Contenido de las bacterias en ácido nucleico. Malmgren y Heden (1947) han informado que el contenido total de las bacterias en nucleótidos cambia durante el desarrollo y alcanza su máximo en las células hacia el final de la fase dilatoria del ciclo de cultivo. Morse y Carter (1949), experimentando con un cultivo de *Escherichia coli*, han obtenido resultados análogos. Según estos autores, no se conocía la significación del gran incremento en ácido ribonucleico durante la fase

dilatoria, pero parecía vinculado con la síntesis protoplasmática y proteínica desarrollada después de comenzar la división celular.

La síntesis observada se produce en la fase de evolución del cultivo conocida por «juventud fisiológica». Durante este período se advierten muchos máximos de actividad química en cultivos bacterianos; se ha comprobado que en el curso del mismo es máxima la actividad de la célula en cuanto a producción de calor, dióxido de carbono, amoníaco y sulfuro de hidrógeno, así como a consumo de oxígeno. Asimismo se

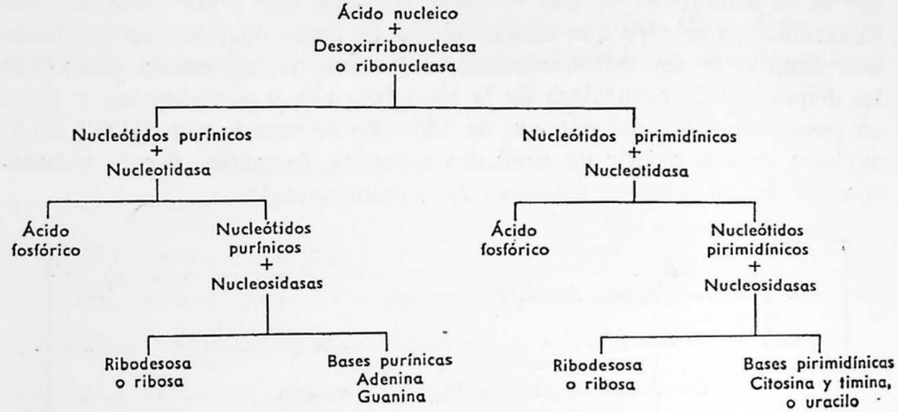


Fig. 212. — Hidrólisis enzimática de ambos tipos de ácidos nucleicos en sus unidades constitutivas.

ha visto que las células de cultivos en esta fase poseen otras características distintivas, tales como mayor tamaño y capacidad para tomar coloraciones, y para resistir la multiplicación de bacteriófagos, mayor sensibilidad al calor y al frío, así como a la luz ultravioleta, menor aglutinabilidad con antisueros y sales, y menor movilidad electroforética. Demostraciones más recientes revelan cierta conexión entre la formación de enzimas por adaptación y los ácidos nucleicos (Spiegelman, 1948), y entre la síntesis de bacteriófagos y los ácidos nucleicos (Price, 1948).

Véase más informacón en Bartholomew y Goring (1948), y Lampen (1952).

REFERENCIAS

Alarie, A. M., y P. H. H. Gray: Aerobic bacteria that decompose cellulose, isolated from Quebec soils. I. Isolation and description of the species, *Can. J. Research, C*, **25**: 228, 1947.

Allen, E. K., y O. N. Allen: Biochemical and symbiotic properties of rhizobia, *Bact. Rev.*, **14**: 273, 1950.

Allen, O. N.: Inoculate legumes—it pays, *Agr. Exp. Sta., Univ. Wis., Bull.* 484, 1949.

— y E. K. Allen: A survey of nodulation among leguminous plants, *Soil. Sci. Soc. Am.*, **12**: 203, 1947*a*.

Allen, O. N., y E. K. Allen: The distribution of root nodules in the family *Leguminosae, Proc. 4th International Congr. Microbiol.*, 1947b.

Allison, F. E.: *Azotobacter* inoculation of crops. I. Historical, *Soil Sci.*, **64**: 413, 1947.

—, V. L. Gaddy, L. A. Pinck, y W. H. Armiger: II. Effect on crops under greenhouse conditions, *ibid.*, **64**: 489, 1947.

—, S. R. Hoover, y F. W. Minor: Biochemical nitrogen fixation studies. IV. Experiments with excised legume nodules, *Botan. Gaz.*, **104**: 63, 1942.

Anderson, C. G., y J. C. Macsween: The use of silica gel as a substitute for agar in culture media. *J. Path. Bact.* **54**: 530, 1942.

Andre, F., y R. Beeler: What's new in farm science, *Agr. Exp. Sta., Univ. Wis., Bull.* 487, 1949.

Bartholomew, W. V., y C. A. I. Goring: Microbial products and soil organic matter. I. Some characteristics of the organic phosphorus of microorganisms, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.* **13**: 238, 1948.

Billen, D., y H. C. Lichstein: Studies on the aspartic acid decarboxylase of *Rhizobium trifolii, J. Bact.*, **58**: 215, 1949.

Bisset, K. A.: Complete and reduced life cycles in *Rhizobium, J. Gen. Microbiol.*, **7**: 233, 1952.

Bond, L.: Origin and developmental morphology of root nodules of *Pisum sativum, Botan. Gaz.*, **109**: 411, 1948.

Breed, R. S., E. G. D. Murray, y A. P. Hitchens: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1949.

Burris, R. H., y P. W. Wilson: Biological nitrogen fixation, *Ann. Rev. Biochem.*, **14**: 685, 1945.

— y —: Effect of haemoglobin and other nitrogenous compounds on the respiration of the rhizobia, *Biochem. J.*, **51**: 90, 1952.

Burton, J. C.: The legume nodule story, *J. Soil Water Conservation*, **4**: 81, 1949.

— y O. N. Allen: Inoculation of crimson clover (*Trifolium incarnatum L.*) with mixtures of rhizobia strains, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **14**: 191, 1950.

Cholodny, N.: «Die Eisenbakterien», Jena, Gustav Fischer, 1926.

Clark, F. E.: Rhizosphere microflora as affected by soil moisture changes, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **12**: 239, 1947.

—: *Azotobacter* inoculation of crops. III. Recovery of *Azotobacter* from the rhizosphere, *Soil Sci.*, **65**: 193, 1948.

Colmer, A. R., K. L. Temple, y M. E. Hinkle: An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines, *J. Bact.*, **59**: 317, 1950.

Conn, H. J.: The microscopic study of bacteria and fungi in soil, *N.Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 64, 1918.

—: An improved stain for bacteria in soil, *Stain Technol.*, **1**: 125, 1926.

—: The most abundant groups of bacteria in soil, *Bact. Rev.*, **12**: 257, 1948.

— y J. E. Conn: The stimulating effect of colloids upon the growth of certain bacteria, *J. Bact.*, **39**: 99, 1940.

Conrad, J. P.: Hydrolysis of aurea in solis by thermolabile catalysis, *Soil Sci.*, **40**: 253, 1940*a*.

—: The nature of the catalyst causing the hydrolysis of urea in soils, *Soil Sci.*, **50**: 119, 1940b.

—: Catalytic activity causing the hydrolysis of urea in soils as influenced by several agronomic factors, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **5**: 238, 1940c.

—: The occurrence and origin of ureaselike activities in soils, *Soil Sci.*, **54**: 367, 1942*a*.

—: Enzymatic vs. microbial concepts of urea hydrolysis in soils, *J. Am. Soc. Agron.*, **34**: 1102, 1942b.

—: Some effects of developing alkalinities and other factors upon urease-like activities in soils, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **8**: 171, 1944.

Cutler, D. W., L. M. Crump, y H. Sandon: A quantitative investigation of the bacterial and protozoan population of the soil, with an account of the protozoan fauna, *Trans. Roy. Soc (London)*, Series B, **211**: 317, 1922.

Dawson, V. T., y R. C. Dawson: Further observations on the use of rose bengal for the enumeration of soil fungi, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **11**: 268, 1946.

Duchow, E., y H. C. Douglas: *Rhodomicrobium vannielii*, a new photoheterotrophic bacterium, *J. Bact.*, **58**: 409, 1949.
Erdman, L. W.: Legume inoculation: what its is; what it does, *U.S. Dept. Agr., Bull.* 2003, 1953.
Frederick, L. R., y R. L. Starkey: Bacterial oxidation of sulfur in pipe sealing mixtures, *J. Am. Water Works Assoc.*, **40**: 729, 1948.
Fuller, W. H., y A. G. Norman: Cellulose decomposition by aerobic mesophilic bacteria from soil, *J. Bact.*, **46**: 273, 281, 291, 1943*a*.
— y —: Characteristics of some soil cytophagas, *J. Bact.*, **45**: 565, 1943*b*.
Gaffron, H.: Über den Stoffwechsel der schwefelfreien Purpurbakterien, *Biochem. Z.*, **260**: 1, 1933.
—: Über den Stoffwechsel der Purpurbakterien. II, *ibíd.*, **275**: 301, 1935.
Gainey, P. L.: The significance of available calcium as a factor limiting growth of *Azotobacter* at pH levels below 6.0, *J. Agr. Research*, **76**: 265, 1948.
Gest, H.: Metabolic patterns in photosynthetic bacteria, *Bact. Rev.*, **15**: 183, 1951.
Greaves, J. E., y L. W. Jones: The influence of temperature on the microflora of the soil, *Soil Sci.*, **58**: 377, 1954.
Hofer, A. W.: Flagellation of *Azotobacter*, *J. Bact.*, **48**: 697, 1944.
Horner, C. K., F. E. Allison: Utilization of fixed nitrogen by *Azotobacter* and influence on nitrogen fixation, *J. Bact.*, **47**: 1, 1944.
Hungate, R. E.: Studies on cellulose fermentation. I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium *J. Bact.*, **48**: 499, 1944; II. An anaerobic cellulose-decomposing actinomycete, *Micromonospora propionici*, n. sp., *ibíd.*, **51**: 51, 1946; III. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle, *ibíd.*, **53**: 631, 1947.
—: The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria, *Bact. Rev.*, **14**: 1, 1950.
James, N., y M. L. Sutherland: Individual plot studies of variation in numbers of bacteria in soil. I. Response to cropping. II. The errors of the procedure, *Can. J. Research*, **20**: 435, 444, 1942.
— y —: Variation in numbers of bacteria in two plots, *ibíd.*, **21**: 119, 1943*a*.
— y —: Numbers of bacteria developing on plates in relation to soil environment, *Can. J. Research*, **21**: 191, 1943*b*.
Jensen, H. L.: Nitrification of oxime compounds by heterotrophic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 360, 1951.
Jones, L. W., y J. E. Greaves: *Azotobacter chroococcum* and its relationship to accesory growth factors, *Soil. Sci.*, **55**: 393, 1943.
Jones, P. C. T., y J. E. Mollison: A technique for the quantitative estimation of soil microorganisms, *J. Gen. Microbiol.*, **2**: 54, 1948.
Katznelson, H., y F. E. Chase: Qualitative studies of soil microorganisms: VI. Influence of season and treatment on incidence of nutritional groups of bacteria, *Soil, Sci.*, **58**: 473, 1944.
—, A. G. Lochhead, y M. I. Timonin: Soil microorganisms and the rhizosphere, *Botan. Rev.*, **14**: 543, 1948.
Kleczkowska, J., P. S. Nutman, y G. Bond: Note on the ability of certain strains of rhizobia from peas and clover to infect each other's host plants, *J. Bact.*, **48**: 673, 1944.
Kleczkowski, A. y H. G. Thornton: A serological study of root nodule bacteria from pea and clover inoculation groups, *J. Bact.*, **48**: 661, 1944.
Kyle, T. S., y A. Eisenstark: The genus *Azotobacter*, *Bull. Okla. Agr. Mech. Coll.*, June, 1951.
Lampen, J. O.: Enzymatic studies on the metabolism of nucleosides and their components in microorganisms, *Phosphorus Metabolism*, **2**: 363, 1952.
Larsen, H.: On the culture and general physiology of the green sulfur bacteria, *J. Bact.*, **64**: 187, 1952.
Leathen, W. W.: Bacteriologic aspects of bituminous coal mine effluents, *Proc. Penn. Acad. Sci.*, **27**: 37, 1953.
Lees, H.: Isolation of the nitrifying organisms from soil, *Nature*, **167**: 355, 1951.
— y J. H. Quastel: Biochemistry of nitrification in soil. I. Kinetics of, and the effects of poisons on, soil nitrification as studied by a soil perfusion technique, *Biochem. J.*, **40**: 803, 1946.

Le Page, G. A.: The biochemistry of autotrophic bacteria. The metabolism of *Thiobacillus thiooxidans* in the absence of oxidizable sulfur, *Arch. Biochem.*, **1**: 255, 1942.
Levinson, H. S., G. R. Mandels, y E. T. Reese: Products of enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivatives, *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**: 351, 1951.
Little, H. N., y R. H. Burris: Activity of the red pigment from leguminous root nodules, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**: 838, 1947.
Lochhead, A. G.: Qualitative studies of soil microorganisms. III. Influence of plant growth on the character of the bacterial flora, *Can. J. Research*, **18**: 42, 1940.
—: The bacterial equilibrium in soil in relation to plants, Specialist Conference in Agriculture, Australia, 1949.
— y F. E. Chase: Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requiriments of the predominant bacteria flora, *Soil Sci.*, **55**: 185, 1943.
— y R. H. Thexton: Qualitative studies of soil microorganisms. X. Bacteria requiring vitamin B_{12} as growth factor, *J. Bact.*, **63**: 219, 1952.
McBee, R. H.: The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermentisg bacterium, *J. Bact.*, **56**: 653, 1948.
—: The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria, *Bact. Rev.*, **14**: 51, 1950.
McCalla, T. M.: Physico-chemical behavior of soil bacteria in relation to the soil colloid, *J. Bact.*, **40**: 33, 1940.
—: Influence of microorganisms and some organic substances on soil structure, *Soil Sci.*, **59**: 287, 1945.
—: The biology of soil structure, *J. Soil Water Conservation*, **1**: 71, 1946*a*.
—: Influence of some microbial groups on stabilizing soil structure against falling water drops, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **11**: 260, 1946*b*.
—: The stability of soil structure against falling water drops containing different dissolved materials, *Trans. Kans. Acad. Sci.*, **50**: 349, 1947.
—: Studies on the effect of microorganisms on rate of percolation of water through soils, *Soil. Sci. Soc. Am., Proc.*, **15**: 182, 1951.
— y T. H. Goodding: Microorganisms and their effects on crops and soils, *Nebraska Agr. Exp. Sta., Circ.*, 90, 1951.
Malmgren, B., y C. G. Heden: Studies on the nucleotide metabolism of bacteria. III. The nucleotide metabolism of the gram-negative bacteria, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **24**: 448, 1947.
Martin, W. P., T. F. Buherer, y A. B. Caster: Threshold pH for the nitrification of ammonia in desert soils, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **7**: 223, 1942.
Meiklejohn, J.: The isolation of *Nitrosomonas europaea* in pure culture, *J. Gen. Microbiol.*, **4**: 185, 1950.
—: The nitrifying bacteria: a review, *J. Soil Sci.*, **4**: 59, 1953.
Morse, M. L., y C. E. Carter: The synthesis of nucleic acids in cultures of *Escherichia coli*, strains B and B/R, *J. Bact.*, **58**: 317, 1949.
Newton, J. W., y P. W. Wilson: Nitrogen fixation and photoproduction of molecular hydrogen by *Thiorhodaceae, Antonie van Leeuwenhoek*, **19**: 71, 1953.
Niss, H. F., y P. W. Wilson: Hemoprotein from root nodules and nitrogen fixation by *Rhizobium, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**: 233, 1947.
Novak, R., y P. W. Wilson: The utilization of nitrogen in hydroxylamine and oximes by *Azotobacter vinelandii*, *J. Bact.*, **55**: 517, 1948.
Nutman, P. S.: Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover, *Ann. Botany (London)*, n. s., **12**: 81, 1948.
—: Studies on the physiology of nodule formation. IIII. Experiments on the excision of root-tips and nodules, *Ann. Botany (London)*, n. s., **16**: 79, 1952.
—: Studies on the physiology of nodule formation. IV. *ibíd.*, n. s., **17**: 95, 1953.
Olsen, E., y W. Szybalski: Aerobic microbiological corrosion of water pipes. I-II. *Acta Chem. Scand.*, **3**: 1094, 1106, 1949.
Parker, C. D.: Species of sulphur bacteria associated with the corrosion of concrete. *Nature*, **159**: 439, 1947.
Parker, D. T., O. N. Allen, y H. L. Ahlgren: Legume bacteria—only the right kind do the job, *Crops and Soils*, abril-mayo 1949.

Preece, I. A.: The plant cell wall, cytolysis, and malting, *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**: 119, 1948.
Price, W. C.: The stimulatory action of certain fractions from bacteria and yeast on the formation of a bacterial virus, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **34**: 317, 1948.
Pringsheim, E. G.: Iron bacteria, *Biol. Rev.*, **24**: 200, 1949.
Quastel, J. H., y P. G. Scholefield: Biochemistry of nitrification in soils, *Bact. Rev.*, **15**: 1, 1951.
Rosenblum, E. D., y P. W. Wilson: Fixation of isotopic nitrogen by *Clostridium*, *J. Bact.*, **57**: 413, 1949.
— y —: Molecular hydrogen and nitrogen fixation by *Clostridium*, *ibíd.*, **59**: 83, 1950.
Russell, E. J., y H. B. Hutchinson: The effect of partial sterilization of soil on the production of plant food, *J. Agr. Sci.*, **3**: 111, 1909; **5**: 152, 1913.
Segal, W., y P. W. Wilson: Hydroxylamine as a source of nitrogen for *Azotobacter vinelandii*, *J. Bact.*, **57**: 55, 1949.
Sijpesteijn, A. K.: Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle, *J. Microbiol. Serol.*, **15**: 49, 1949.
Singh, B N.: Studies on soil *Acrasieae*. I. Distribution of species of *Dictyostelium* in soils of Great Britain and the effect of bacteria on their development, *J. Gen. Microbol.*, **1**: 11, 1947*a*; II. The active life of species of *Dictyostelium* in soil and the influence thereon of soil moisture and bacterial food, *ibíd.*, **1**: 361, 1947*b*.
Skinner, F. A., P. C. T. Jones, y J. E. Mollison: A comparison of a direct-and a plate-counting technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms, *J. Gen. Microbiol.*, **6**: 261, 1952.
Spiegelman, S.: Differentiation as the controlled production of unique enzyme patterns, *Symposia Soc. Exp. Biol. (Great Britain)*, **2**: 286, 1948.
Stanier, R. Y.: Are there obligate cellulose-decomposing bacteria? *Soil Sci.*, **53**: 479, 1942*a*.
—: The *Cytophaga* group: A contribution to the biology of Myxobacteria, *Bact. Rev.*, **6**: 143, 1942-*b*.
Starkey, R. L.: Precipitation of ferric hydrate by iron bacteria, *Science*, **102**: 532, 1945.
Stuart, C. A., E. Van Stratum y R. Rustigian: Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms, *J. Bact.*, **49**: 437, 1945.
Taylor, C. B.: The nutritional requirements of the predominant bacterial flora of the soil, *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **14**: 101, 1951.
— y G. H. Hutchinson: Corrosion of concrete caused by sulphur-oxidizing bacteria, *J. Soc. Chem. Ind.*, **66**: 54, 1947.
Temple, K. L.: A new method for the preparation of silica gel plates, *J. Bact.*, **57**: 383, 1949.
— y A. R. Colmer: The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*, *ibíd.*, **62**: 605, 1951.
— y J. Kleczkowski: Use of antisera to identify nodules produced by the inoculation of legumes in the field, *Nature*, **166**: 1118, 1950.
Timonin, M. I.: *Azotobacter* preparation (azotogen) as a fertilizer for cultivated plants, *Soil Sci. Soc. Am., Proc.*, **13**: 246, 1948.
— y A. G. Lochhead: Distribution of micro-organisme in the rhizosphere of a root system, *Trans. Roy. Soc. Can.*, **42**: 175, 1948.
Tove, S. R., y P. W. Wilson: Isotopic studies of fixation by rhizobia in presence of hemoprotein, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**: 184, 1948.
—, H. F. Niss, y P. W. Wilson: Fixation of N_2^{15} by excised nodules of leguminous plants, *J. Biol. Chem.*, **184**: 77, 1950.
Umbreit, W. W.: Problems of autotrophy, *Bact. Rev.*, **11**: 157, 1947.
Van Niel, C. B.: The bacteria photosyntheses and their importance for the general problem of photosynthesis, *Advances in Enzymol.*, **1**: 263, 1941.
—: The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria, *Bact. Rev.*, **8**: 1, 1944.
—: The comparative biochemistry of photosynthesis, *Am. Scientist*, **37**: 371, 1949.
Virtanen, A. I.: Symbiotic nitrogen fixation, *Nature*, **155**: 747, 1945*a*.

Virtanen, A. I.: Roter Farbstoff in den Wurzelknöllchen von Hülsenpflanzen, *S. B. Finn. Akad. Wiss. Comm.*, Jan. 12, 1945*b*.
—: The biology and chemistry of nitrogen fixation by legume bacteria, *Biol. Rev.*, **22**: 239, 1947.
—: Biological nitrogen fixation, *Ann. Rev. Microbiol.*, **2**: 485, 1948.
—, J. Jorma, H. Linkola, y A. Linnasalmi: On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules, *Acta Chem. Scand.*, **1**: 90, 1947.
— y T. Laine: Investigations on the root nodule bacteria of leguminous plants. XXII. The excretion products of root nodules. The mechanism of N-fixation, *Biochem. J.*, **33**: 412, 1939.
Vogler, K. G.: The presence of an endogenous respiration in the autotrophic bacteria, *J. Gen. Physiol.*, **25**: 617, 1942*a*.
—: Studies on the metabolism of autotrophic bacteria. II. The nature of the chemosynthetic reaction, *ibíd.*, **26**: 103, 1942*b*.
—: G. A. L. Le Page, y W. W. Umbreit: Studies on the metabolism of autotrophic bacteria. I. The respiration of *Thiobacillus thiooxidans* on sulfur, *ibíd.*, **26**: 89, 1942.
— y W. W. Umbreit: Studies on the metabolism of the autotrophic bacteria. III. The nature of the energy storage material active in the chemosynthetic process, *ibíd.*, **26**: 157, 1942.
Walker, R. H., y P. E. Brown: The nomenclature of the cowpea group of root-nodule bacteria, *Soil Sci.*, **39**: 221, 1935.
Wallace, R. H., y A. G. Lochhead: Qualitative studies of soil microorganisms. VII. Influence of various crop plants on the nutritional groups of soil bacteria, *Soil Sci.*, **67**: 63, 1949.
— y —: Qualitative studies of soil microorganisms. IX. Amino acid requirements of rhizosphere bacteria, *Can. J. Research, C*, **28**: 1, 1950.
West, P. M., y A. G. Lochhead: The nutritional requirements of soil bacteria—a basis for determining the bacterial equilibrium of soils, *Soil Sci.*, **50**: 409, 1940.
Williamson, W. T. H.: The living soil, *Discovery*, **12**: 15, 1951.
Wilson, J. K.: The symbiotic performance of isolates from soybean with species of *Crotalaria* and certain other plants, *Cornell Univ., Agr. Exp. Sta. Mem.* 267, 1945.
—: Symbiotic segregation of strains of the root nodule bacteria by leguminous plants, *ibíd.*, 279, 1948.
Wilson, P. W.: Mechanism of symbiotic nitrogen fixation, *Esgeb. Enzymforsch.*, **8**: 13, 1939.
—: «The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation», Madison, University of Wisconsin Press, 1940.
— y R. H. Burris: The mechanism of biological nitrogen fixation, *Bact. Rev.*, **11**: 41, 1947.
—, J. F. Hull, y R. H. Burris: Competition between free and combined nitrogen in nutrition of *Azotobacter*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **29**: 289, 1943.
Winogradsky, S.: Études sur la microbiologie du sol. Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. *Ann. inst. Pasteur*, **43**: 549, 1929.
Wyss, O., y P. W. Wilson: Mechanism of biological nitrogen fixation. VI. Inhibition of *Azotobacter* by hydrogen, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **27**: 162, 1941.
Zelitch, I., E. D. Rosenblum, R. H. Burris, y P. W. Wilson: Isolation of the key intermediate in biological nitrogen fixation by *Clostridium*, *J. Biol. Chem.*, **191**: 295, 1951.

CAPÍTULO XXV

INFECCIÓN E INMUNIDAD

Infección. Puede definirse la infección como la entrada, el desarrollo y la multiplicación de microorganismos en el cuerpo, que provocan un proceso morboso.

Contaminación. No son sinónimos los términos infección y contaminación, y por ello deben distinguirse. Un objeto está contaminado cuando contiene bacterias, especialmente si son patógenas; una copa puede estar contaminada por bacilos tuberculosos, sin estar infectada, y lo mismo ocurre con las manos.

Se encuentran bacterias en diversas partes del cuerpo. Su presencia no significa siempre que se haya iniciado un proceso patológico. Las hay normalmente en la piel, la boca, los conductos nasales, las vías respiratorias altas, la conjuntiva, el tubo intestinal, etc.; y algunas se hallan constantemente en cada región. Existen micrococos y estafilococos en la piel; el colibacilo *(Escherichia coli)* se alberga en el intestino; el *Corynebacterium xerose* vive sobre la conjuntiva, y en la faringe normal son corrientes estreptococos y neumococos, etc.

Período de incubación. Puede considerarse como período de incubación de una enfermedad infecciosa el que transcurre desde la entrada de los microorganismos hasta su primera manifestación visible, y comprende unas horas, varios días, a menudo semanas, y hasta meses. El de la fiebre tifoidea suele ser de unos diez días. Aunque la duración del período de incubación puede variar, según la virulencia de los gérmenes, nunca se elimina por completo, y en ningún caso se sabe exactamente lo que sucede durante el mismo. En la hidrofobia, el período de incubación corresponde al tiempo que tarde en llegar el virus al sistema nervioso central; cuando más distante de éste se haya producido la mordedura de un animal rabioso, más prolongado será el período de incubación.

Enfermedades comunicables. Son las que se transfieren naturalmente de un individuo a otro. Todas ellas constituyen infecciones producidas por gérmenes microscópicos, agentes productores que pasan de una persona a otra por contacto, al toser o estornudar, y por otros medios. Una enfermedad infecciosa no es forzosamente comunicable; por ejemplo, el tétanos es una enfermedad infecciosa, pero no es comunicable en la verdadera acepción de la palabra, ya que, si bien el microbio infecta las heridas, no dispone de medio natural para llegar a una lesión semejante de otra persona. Sin embargo, lo son la gran mayoría de las enfermedades infecciosas; tal sucede con la tos ferina, la parotiditis, el sarampión, la viruela, la gripe, etc. La mayoría de las enfermedades infecciosas comunicables son aquellas que atacan las vías respiratorias altas, y se transmiten generalmente al toser, estornudar o hablar.

Enfermedades endémicas, epidémicas y pandémicas. Una enfermedad endémica es la que se produce de manera continuada entre la población de una comunidad.

Enfermedad epidémica es la que provoca numerosos casos de infección entre los habitantes de una comunidad en un corto período de tiempo.

Enfermedad pandémica es la de tipo epidémico que alcanza una gran difusión. La extensa gripe de 1917 a 1919 fue primero epidémica, y se hizo luego pandémica, al propagarse por el mundo entero.

Patogenicidad. Un organismo patógeno es el que puede producir una enfermedad. Se han aislado millares de especies bacterianas, pero únicamente algunas de ellas son capaces de provocar enfermedades en el hombre; las hay patógenas para éste, y no para los animales, y otras hacen enfermar a los animales y no al ser humano. La capacidad de un microbio para invadir y producir un proceso morboso en un individuo depende de las especies de que se trate; por eso es necesario nombrar el huésped para poder emplear con propiedad el término «patógeno».

Saprófitos y parásitos. Las bacterias se pueden clasificar en estos dos grupos. Un saprófito es todo organismo que vive a expensas de materia orgánica muerta o en descomposición; los gérmenes saprófitos tienen gran importancia como reductores de la compleja substancia orgánica muerta a sencillos compuestos solubles, que así pueden utilizar de nuevo plantas y bacterias.

En cambio, un parásito es cualquier organismo que encuentra condiciones favorables para desarrollarse en células vivas. Los gérmenes patógenos son parásitos; pero no todos los parásitos son patógenos. El colibacilo, *E. coli*, vive normalmente como parásito inofensivo en el tubo intestinal, y rara vez invade los tejidos para producir una infección.

En ocasiones, un saprófito adquiere la aptitud de invadir tejidos vivos para ocasionar una enfermedad; esto ocurre cuando se debilita el mecanismo de defensa del huésped a causa de una dolencia grave.

Virulencia. Puede definirse la virulencia como el grado de agresividad de un microbio patógeno. Esta condición puede ser muy variable en diversas razas de una misma especie, y aun la misma raza, mantenida en condiciones diferentes, muestra distintos grados de virulencia, según los casos.

Por lo general, un microorganismo patógeno se hace menos virulento al pasar de su ambiente natural a un medio de cultivo artificial; y el mismo efecto producen otras condiciones desfavorables de ambiente. Cuando una cepa o raza ha perdido gran parte de su virulencia, se dice que está atenuada. Ciertos microbios, como los neumococos, por ejemplo, pierden toda su virulencia al pasarlos a un medio nutritivo; este cultivo se califica entonces de no virulento o avirulento. En cambio, otros microorganismos mantienen su potencia agresiva aunque se conserven en medios de cultivo a través de muchas generaciones.

Se aplican varios medios para disminuir la virulencia de un microbio. Además del empleo de medios de cultivo con este propósito, se recurre al pase por animales; por ejemplo, el virus de la vacuna es virus variólico cuya virulencia para seres humanos se ha reducido cultivándolo en los tejidos de vacas o terneras.

Un microbio atenuado mediante pase por una especie animal puede adquirir mayor virulencia al pasarlo por otra especie. Por ejemplo, la virulencia del neumococo se aumenta cultivándolo en ratones; así, una cepa avirulenta puede hacerse tan agresiva, que una millonésima de mililitro de un cultivo de esos gérmenes en caldo baste para matar a un ratón en cuarenta y ocho horas.

Número de microorganismos. El número de gérmenes influye mucho en la producción de una enfermedad infecciosa; unos pocos microorganismos patógenos virulentos pueden ser fácilmente atacados y destruidos, mientras que, en gran número, no los eliminan a veces por completo los mecanismos defensivos del huésped. Esto explica por qué algunos individuos son atacados por un microbio a pesar de haber sido previamente inmunizados contra la misma especie; la inmunización hace frente a unos pocos invasores, pero resulta impotente para contener un ataque en masa. En general, el número de gérmenes necesarios para provocar una enfermedad es inversamente proporcional a su virulencia.

Vías de infección. Las bacterias pueden entrar en el cuerpo por varios puntos. Unas penetran por grietas o erosiones en la piel (a veces, a través de la piel indemne); otras, por las vías respiratorias, y otras, por el tubo digestivo. La puerta de entrada limita o define la capacidad de una bacteria patógena para producir infección: el germen de la fiebre tifoidea puede no ocasionar infecciones al frotarlo sobre la piel herida, pero, ingerido, llega a veces al conducto digestivo y provoca la enfermedad; el microorganismo de la gangrena gaseosa carece de efecto si se ingiere, mientras que frotado sobre la piel puede acarrear una infección mortal. Por consiguiente, las bacterias han de introducirse en el cuerpo por la vía a que están adaptadas. Sin embargo, no es éste el único factor que decide si una infección ha de producirse o no; el hombre y los animales poseen diversos mecanismos defensivos para destruir las bacterias invasoras, y, si estos mecanismos son vigorosos y muy activos, generalmente defenderán al huésped contra los gérmenes patógenos. En cambio, cuando su capacidad es menor de lo normal, y grande la virulencia de los atacantes, puede sobrevenir una infección.

Una vez que las bacterias han invadido los tejidos, pueden atacar al organismo hospedante de muy diversos modos: produciendo una inflamación local, o estacionándose en el hígado, la medula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos, etc., con lo que originan abscesos o focos secundarios de infección, conocidos también por infecciones metastáticas. A veces, los gérmenes patógenos irrumpen en el torrente sanguíneo y ocasionan una bacteriema o septicemia (envenenamiento de la sangre).

Catabolitos bacterianos. Las bacterias producen una gran cantidad de desechos en los medios de cultivo en que se desarrollan. La formación de algunos de esos compuestos depende de la presencia de ciertas substancias previas o precursoras específicas en el medio de cultivo; en cambio, la de otros no depende de la composición del medio, sino que es característica de los propios microorganismos, y aquélla sólo influye en la cantidad en que se obtienen esos compuestos.

En el primer grupo figuran cuerpos tales como tomaínas (aminas), indol, escatol, fenol y sulfuro de hidrógeno. Tiene que haber aminoácidos específicos en la peptona del medio para que se produzcan. El segundo grupo comprende las verdaderas toxinas bacterianas, que son de dos clases: exotoxinas y endotoxinas.

Las exotoxinas son elaboradas por las células bacterianas y vertidas en el medio de cultivo circundante. Pueden recuperarse pasando el cultivo por un filtro apropiado, a fin de separar del medio los cuerpos bacterianos. Sólo unas pocas bacterias patógenas son capaces de descargar auténticas toxinas solubles de gran potencia, causantes principales de los síntomas observados; dicho de otro modo, la inyección de un filtrado desprovisto de células produce síntomas característicos de la enfermedad. Los gérmenes más conocidos de este grupo son *Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, Cl. botulinum, Cl. parabotulinum,* algunos de los anaerobios esporógenos aislados de enfermos de gangrena gaseosa, *Streptococcus pyogenes* y *Micrococcus pyogenes* var. *aureus.*

Las endotoxinas, por el contrario, no se descargan en el medio

circundante, sino que permanecen en el interior de las bacterias hasta que los microorganismos mueren y se disuelven. Este grupo comprende la mayoría de las bacterias. Un ejemplo es la *Salmonella typhosa*, agente productor de la fiebre tifoidea o tifus abdominal. Si se filtra un cultivo joven de este microorganismo, el filtrado apenas será tóxico, pero los gérmenes mismos pueden serlo mucho; los filtrados de cultivos viejos son a veces muy tóxicos, a causa de la muerte y autólisis de muchos de los gérmenes, que dejan así en libertad las endotoxinas.

Algunos microbios son capaces de elaborar exotoxinas y endotoxinas; parecen pertenecer a este grupo los gérmenes del cólera *(Vibrio comma)* y de la disentería *(Shigella dysenteriae)*, si bien producen una cantidad mucho mayor de endotoxinas que de exotoxinas.

Resistencia. El hecho de que entren bacterias en el cuerpo por la boca, los conductos nasales o una herida o excoriación de la piel, no significa que ha de producirse infección forzosamente; si así fuera, el hombre habría desaparecido de la Tierra hace ya mucho tiempo. El poder que tiene un organismo animal para impedir que crezcan y se desarrollen gérmenes que han logrado penetrar en su interior es lo que se llama resistencia. En ella intervienen diversos mecanismos defensivos, que en la mayoría de los casos eliminan rápidamente las bacterias invasoras. A veces, la resistencia a una enfermedad es característica de una especie, y entonces recibe el nombre de inmunidad.

Se ha comprobado que existen varios grados de inmunidad. Una raza puede ser inmune a cierta enfermedad, y sensible a otra, sin que esto quiera decir que en la primera no pueda presentarse la dolencia. Cuando los microbios son pocos, es fácil combatirlos; pero si atacan en gran número suelen sobreponerse a las defensas naturales del cuerpo, y la enfermedad se desarrolla. Los pollos son inmunes al carbunco, porque la temperatura de su cuerpo es demasiado alta para que medre el germen productor; pero si esa temperatura desciende a 37° C, los pollos se hacen sensibles a la enfermedad.

INMUNIDAD NATURAL

Se entiende por inmunidad natural la resistencia heredada por una raza o especie frente a una determinada enfermedad infecciosa.

Inmunidad de especie. Muchos de los microbios que atacan al hombre no atacan a los animales; en éstos no se producen casos de fiebre tifoidea más que después de inoculaciones experimentales masivas con los gérmenes específicos. La lepra humana no se ha transmitido positivamente a animales; tampoco es espontánea en éstos la meningitis, si bien se les puede ocasionar experimentalmente. Muchas enfermedades propias de los animales no se presentan en el hombre con carácter espontáneo.

No se sabe por qué existen diferencias en la sensibilidad de las especies; quizás obedezcan a las de temperatura, metabolismo, dieta, etcétera. Las enfermedades de los animales de sangre caliente no suelen ser transmisibles a los de sangre fría, y viceversa.

Inmunidad de raza. Es probable que sea distinta la resistencia de las diversas razas a la enfermedad, aunque en muchos casos ello pueda ser efecto de desiguales condiciones de vida, de inmunidad adquirida por infección benigna en la infancia o de otros factores. Los negros y los indios americanos son mucho más sensibles a la tuberculosis que el hombre blanco; en cambio, los negros resisten más que éste a la fiebre amarilla y al paludismo.

Inmunidad individual. Los animales de laboratorio de una misma especie, mantenidos en idénticas condiciones de ambiente, presentan sólo ligeras diferencias en su resistencia o sensibilidad a enfermedades experimentales. Estas diferencias son grandes en la sensibilidad del ser humano; por ejemplo, durante una epidemia de gripe, hay siempre algunos individuos que no la contraen aun estando en inmediato contacto con el virus, porque poseen un grado de resistencia superior al de la mayoría de la gente.

INMUNIDAD ADQUIRIDA

Un individuo perteneciente a una especie sensible puede hacerse resistente a una enfermedad infecciosa de modo accidental o artificial, y esto es lo que se llama inmunidad adquirida.

Inmunidad accidental. Muchas de las enfermedades infecciosas, como la fiebre tifoidea, la escarlatina y el sarampión, atacan generalmente al mismo individuo una sola vez. La resistencia del huésped a la enfermedad aumenta así de tal forma, que una nueva exposición al microorganismo específico no suele producir ya efecto. Esta resistencia o inmunidad puede durar cierto tiempo o toda la vida.

Inmunidad artificial. También se puede adquirir inmunidad de modo artificial o provocado, mediante vacunas o por el uso de suero inmunizante. En el primer caso se trata de inmunidad activa, y en el segundo, de inmunidad pasiva.

Inmunidad activa. La inmunidad activa artificial se puede adquirir de varias formas: 1.°, mediante una dosis subletal de un microbio virulento; 2.ª, mediante una dosis subletal de bacterias muertas; 3.ª, por obra de una inyección de cultivo atenuado, y 4.°, por inmunización con productos bacterianos.

1.° Dosis subletal de microorganismos virulentos. Este método se ha empleado experimentalmente con el germen del cólera; no es aplicable a microorganismos muy virulentos, como el *Bacillus anthracis*, agente productor del ántrax.

2.° Dosis subletal de bacterias muertas. La inmunización activa por este medio se practica mucho contra los microbios que producen sólo una cantidad pequeña de toxinas solubles (exotoxinas). El método se ha empleado con éxito contra la fiebre tifoidea, las fiebres paratifoideas, el cólera y, en menor grado, contra infecciones por *Micrococcus* y *Streptococcus*.

Los microorganismos que han de servir para inmunizar se cultivan en un medio sólido o en caldo adecuado. En el primer caso se extraen y suspenden en solución salina. El cultivo en caldo o la suspensión en solución salina se esteriliza aplicando calor o mediante adición de un germicida apropiado. Porciones de la suspensión se trasladan entonces a medios para comprobar la esterilidad de la vacuna, y se preparan cultivos aeróbicos y anaeróbicos. Si la vacuna es estéril, se dosifica o gradúa para que contenga un determinado número de microorganismos por mililitro; este número varía según el germen. La vacuna de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* se suele dosificar a razón de 500 millones a 1 billón de gérmenes por mililitro; la vacuna tífica contiene habitualmente 1 billón de bacterias por mililitro. Se añade un germicida, por ejemplo, tricresol o fenol, para conservar el producto, que se distribuye por igual en ampolletas o frascos esterilizados.

Una vacuna preparada con gérmenes cultivados en un medio sólido contiene sólo el antígeno bacteriano en suspensión; la obtenida a partir de un caldo de cultivo, además de cuerpos bacterianos, consta de diversos productos de excreción de los gérmenes. Si el microorganismo elabora una toxina extracelular, la vacuna de cultivo en caldo será más valiosa como inmunizante que la preparada de un cultivo en medio sólido, pues se desarrollarán cuerpos inmunes contra la toxina extracelular y contra las proteínas bacterianas.

Las vacunas procedentes de cultivos de repuesto de laboratorios se conocen por vacunas correspondientes; son varias las de esta clase que existen en el comercio.

Las vacunas preparadas con dos o más especies bacterianas se denominan mixtas; probablemente, la de uso más general es la del resfriado común. Una vacuna típica anticatarral tiene la siguiente fórmula:

	Millones
Hemophilus influenzae	300
Streptococcus (varias clases)	300
Diplococcus pneumoniae (todos los tipos)	300
Klebsiella pneumoniae	300
Micrococcus catarrhalis	200
Micrococcus pyogenes var. *aureus*	500
Micrococcus pyogenes var. *albus*	500
Total por mililitro	2400

Las vacunas preparadas con varios tipos o cepas de la misma especie se conocen por vacunas polivalentes; ejemplo de preparación comercial de este tipo es la vacuna estreptocócica.

Las que se obtienen con gérmenes recién aislados del paciente a quien se ha de tratar son las llamadas autógenas; han resultado superiores a las preparadas de cultivos permanentes o de repuesto, porque diversas cepas de una misma especie pueden ofrecer alguna variación antigénica, y porque los microbios recién aislados son mucho más virulentos que los mantenidos en cultivos de laboratorio.

Todas estas vacunas constan de bacterias muertas en suspensiones, y por ello se designan a veces más propiamente por bacterianas. En sentido más estricto, el término vacuna se aplica sólo a las preparaciones que contienen microorganismos vivos; sin embargo, con un significado más amplio, se emplea también para productos biológicos compuestos de gérmenes vivos y muertos. Las dos vacunas más importantes que contienen gérmenes vivos (virus) son la variólica y la antirrábica.

3.° Inyección de un cultivo atenuado. Los microorganismos patógenos pierden pronto su virulencia cuando se pasan a medios de cultivo artificiales. Los pases repetidos por algunos animales aumentan la virulencia, mientras que puede suceder lo contrario al pasarlos por otras especies animales.

Pasteur, Chamberland y Roux (1881) redujeron la virulencia del germen del ántrax mediante cultivo a una temperatura de 42° C, en vez de 37° C. Aun cuando los microbios atenuados no eran capaces de producir la enfermedad, inmunizaban satisfactoriamente contra ella. Chamberland y Roux (1883) demostraron que se obtenía igual resultado cultivando los gérmenes en presencia de un germicida diluido (fenol, 1:500); las bacterias perdían su capacidad de producir esporas (se volvían asporógenas), y resultaban avirulentas para el ganado ovino. Sin embargo, servían para inmunizar.

4.° Inmunización con productos bacterianos. Algunos microorganismos excretan substancias solubles en el medio de cultivo circundante, es decir, producen toxinas extracelulares o exotoxinas, las cuales se pueden obtener en estado impuro centrifugando el medio y filtrándolo después debidamente para separar las células bacterianas vivas.

Los síntomas provocados por esta clase de gérmenes son, en gran parte, consecuencia de la acción de los productos solubles que elaboran. La inmunización contra los microorganismos de este grupo se consigue mediante inyección de dosis progresivas del filtrado o toxina; este método se sigue para preparar antitoxinas contra las toxinas de *Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, Cl. botulinum, Streptococcus pyogenes, Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, y de los gérmenes causantes de la gangrena gaseosa. Por desgracia, sólo unos pocos microbios son capaces de elaborar toxinas extracelulares potentes.

Inmunidad pasiva. Es evidente que la inmunización activa requiere algún tiempo para que las células del huésped elaboren anticuerpos suficientes para prevenir la enfermedad. Sólo resulta útil antes de aparecer los síntomas de ésta, pues constituye en esencia un tratamiento profiláctico. En ciertas condiciones, se puede emplear para estimular la producción de anticuerpos en ciertas afecciones crónicas.

En la inmunidad pasiva, por el contrario, puede adquirirse una inmunidad transitoria inyectando en el cuerpo un suero inmunizante obtenido de un animal o una persona inmune. La protección así lograda se debe a las substancias que pasan al paciente con el suero. Este tipo de inmunización está prácticamente limitado a las enfermedades ocasionadas por microorganismos que elaboran exotoxinas potentes. La inmunización activa de un animal después de inyectarle varias dosis de una exotoxina da origen a una substancia inmune conocida por antitoxina; los mejores representantes de este grupo son las antitoxinas diftérica y tetánica, que han adquirido una enorme importancia terapéutica. No obstante, los sueros inmunes preparados contra gérmenes que no producen exotoxinas son útiles en algunas enfermedades. Los anticuerpos contenidos en el suelo de un animal al que se haya inyectado una suspensión de bacterias (vacuna) neutralizan las proteínas de los cuerpos bacterianos; estas substancias inmunes poseen la propiedad de atacar y disolver las bacterias específicas que han intervenido en su formación, y se conocen por sueros antibacterianos, para distinguirlos de los sueros antitóxicos. Las antitoxinas tienen gran valor profiláctico, sobre todo después de aparecer los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, la inmunidad pasiva sólo persiste un tiempo relativamente breve; se ha comprobado que la antitoxina inyectada a seres humanos disminuye de día en día, y puede esperarse que desaparezca de la sangre en un lapso aproximado de dos semanas. Los sueros antibacterianos se emplean antes, al mismo tiempo o inmediatamente después de producirse la infección; la mayoría de ellos carecen de eficacia terapéutica o son de importancia secundaria.

ANTÍGENOS

Puede definirse como antígeno cualquier substancia que, introducida en los tejidos, provoca la formación de anticuerpos. Generalmente, éstos se encuentran en la sangre circulante, y su presencia se revela por medio de ensayos adecuados.

Por lo regular, una substancia no es antigénica sino cuando resulta extraña a la especie que recibe la inyección; esto se refiere sólo a antígenos en circulación. Por ejemplo, la inyección de suero de cobayo a un cobayo no producirá anticuerpos, pero si se aplica a un conejo

la respuesta será una formación enérgica de ellos. Ciertas proteínas del cuerpo que normalmente no pasan a la circulación pueden actuar asimismo como antígenos dentro de la misma especie. La proteína del cristalino de un cobayo resultó antigénica al inyectarla a otro cobayo; se ha comprobado que la caseína de la leche de cabras lactantes es antigénica si se inyecta a las mismas cabras.

Inmunización por vía bucal. El método generalmente empleado para administrar substancias antigénicas es la inyección hipodérmica; sólo por excepción se utiliza la vía bucal.

Se ha demostrado que la administración peroral es menos útil que la inyección subcutánea, pues los antígenos se absorben sólo en parte, y la acción es incierta. Según Dolman (1948),

> Una vez ingeridos, los antígenos quedan expuestos a sucesivos riesgos de su integridad e impedimentos a su absorción. Antes de ponerse en contacto íntimo con la mucosa intestinal, el antígeno se halla a merced del ácido clorhídrico y la pepsina, la bilis, la tripsina y otras enzimas proteolíticas de origen intestinal y aun bacteriano, que puede encontrar a concentraciones e intervalos que dependen de variables tales como la dieta del individuo, la movilidad intestinal y el estado de salud física y psíquica, y acaso también de las condiciones meteorológicas. El conducto está revestido de una capa de mucosidad que constituye a la vez una barrera mecánica y un menstruo en el que los leucocitos pueden perseguir y englobar mejor microorganismos enredados.

Naturaleza de los antígenos. Los antígenos, salvo contadas excepciones, son de naturaleza proteínica. Antes se creía que todos eran proteínas, pero se ha comprobado que algunos no lo son. Han resultado antigénicos varios carbohidratos complejos de origen bacteriano, y algunos compuestos de carbohidratos y lípidos exentos de proteínas. Un cuerpo complejo, consistente en carbohidrato, ácido acético, ácidos grasos y ácido fosfórico, se ha preparado extractando *Salmonella typhimurium* con una solución diluida de ácido tricloracético; esta substancia, no dializable, era opalescente en solución, tóxica y antigénica. De varios otros microorganismos se han aislado complejos similares de carbohidratos.

Por otra parte, no todas las proteínas son antigénicas. Para que una proteína sea capaz de provocar la formación de anticuerpos, ha de ser soluble en el plasma sanguíneo; de no ser así, no puede llegar al sitio de producción de aquéllos. Las proteínas irreversiblemente coaguladas por el calor suelen estar privadas de actividad antigénica. No parece existir relación de ningún género entre la toxicidad de las proteínas y la actividad antigénica; muchas proteínas no son tóxicas, pero provocan enérgicas reacciones de anticuerpos.

No se sabe por qué unas proteínas son antigénicas y otras no. La gelatina es un ejemplo de proteína no antigénica; carece de amino-

ácidos aromáticos, o sea de ácidos con anillos de benceno; no contiene triptófano ni tirosina, y sólo indicios de fenilalanina. De estas observaciones han deducido algunos autores que es necesaria la presencia de ácidos aromáticos para que una proteína sea antigénica, aunque parece ser que existen pruebas de que esto no es estrictamente cierto.

Tamaño molecular de los antígenos. Las proteínas antigénicas suelen ser de carácter coloidal, lo que equivale a decir que están compuestas de grandes moléculas. Son retenidas por membranas de colodión, que dejan pasar moléculas más pequeñas no coloidales. Los cuerpos difusibles de peso molecular relativamente pequeño no provocan la formación de anticuerpos, pues penetran fácilmente en las células, donde son atacados y destruidos con rapidez. Parece evidente que cuanto mayor es la molécula tanto mejor es la respuesta antigénica; una proteína antigénica, al desdoblarse por hidrólisis en unidades menores, como peptonas, péptidos y aminoácidos, deja de serlo.

Haptenos. Los carbohidratos y otros compuestos no proteínicos no son generalmente antigénicos, pero, combinados con proteínas, pueden determinar el carácter específico del anticuerpo que produce la asociación entera y ser capaces de reaccionar solamente con ese anticuerpo. Una substancia de este tipo se denomina antígeno parcial o hapteno. Se han encontrado haptenos en diversos microorganismos, como *Diplococcus pneumoniae, Shigella dysenteriae, Klebsiella pneumoniae, Bacillus anthracis* y *Mycobacterium tuberculosis.*

El neumococo *(Dipl. pneumoniae)* se ha clasificado en 40 tipos serológicos principales a base de la reacción de aglutinación. Por lo que se sabe, todos los tipos contienen las mismas proteínas, y difieren sólo en la composición de los polisacáridos capsulares. Los polisacáridos no son antigénicos, pero, combinados con proteínas, determinan el carácter específico de los anticuerpos producidos contra cada tipo.

Estructura antigénica. Los gérmenes del género *Salmonella* son flagelados en su mayoría. Los antígenos de los flagelos (antígenos flagelares o *H*) son distintos de los del cuerpo (antígenos somáticos u *O*). Los antígenos *H* existen, no sólo en los flagelos, sino también en una delgada capa que envuelve toda la célula. La adición a microorganismos flagelados de un suero inmune que contenga anticuerpos *O* y *H* provoca aglutinación sólo por los últimos, pues los anticuerpos *O* no pueden sensibilizar los antígenos *O* protegidos. Los antígenos flagelares pueden ser destruidos exponiendo los microorganismos a la acción de alcohol o de un ácido débil, y entonces los anticuerpos *O* son capaces de reaccionar con los antígenos somáticos expuestos, para producir aglutinación.

Los antígenos flagelares son de dos tipos: los peculiares de la especie o tipo, o acaso de algunas especies o tipos (específico, o fase 1), y los comunes a un grupo de especies o tipos (menos específico, o fase 2).

En un período de cultivo puede haber antígenos flagelares específicos, y en otro, antígenos comunes de grupo; por consiguiente, el cultivo de un microorganismo puede consistir en una u otra fase, o en una mezcla de ambas. Los antígenos somáticos u *O* se representan por números romanos; los flagelares específicos, por letras minúsculas, y los menos específicos, por números arábigos. En la tabla 39 se exponen los antígenos flagelares y somáticos de algunas especies de *Salmonella.*

Más información se encontrará en Edwards (1950), Ewing y Edwards (1950), y Felsenfeld (1945).

TABLA 39. — ANTÍGENOS FLAGELARES (*H*) Y SOMÁTICOS (*O*) DE ALGUNAS ESPECIES DE *Salmonella*

Grupo	Especies	Antígenos somáticos (*O*)	Antígenos flagelares (*H*)	
			Fase 1 (específica)	Fase 2 (menos específica)
A	*Salmonella paratyphi*	[I],* II, XII	*a*	
B	*Salmonella abortus ovis*	IV, XII	*c*	1, 6
	Salmonella schottmuelleri	[I], IV, [V], XII	*b*	[1, 2]
	Salmonella typhimurium	[I], IV, [V], XII	*i*	1, 2, 3
C_1	*Salmonella choleraesuis*	VI, VII	[*c*]	1, 5
C_2	*Salmonella morbificans*	VI, VIII	*r*	1, 5
D	*Salmonella typhosa*	IX, XII, [*Vi*]	*d*	

* Los paréntesis rectangulares indican que puede faltar este antígeno.

Antígeno Vi. Félix y Pitt (1934) observaron que algunas cepas lisas de *S. typhosa* diferían en su aglutinabilidad por antisuero *O*, y comprobaron que las cepas más virulentas eran en general las menos aglutinables. Más tarde se demostró que esto obedecía a la presencia, en las cepas virulentas, de una substancia antigénica muy lábil, conocida por antígeno *Vi* o de virulencia. Las cepas dotadas de cantidades máximas de antígenos *O* y *Vi* presentaban el grado más intenso de patogenicidad. El antígeno *O* o somático y el antígeno *Vi* se consideran compuestos de complejos de carbohidrato y lípido, pero diferentes uno de otro.

El antígeno *Vi* lo es de superficie; puede percibirse como una erupción continua desde las partes más profundas del germen, que abarca toda la fracción *O*. Este envolvimiento del microorganismo por el antígeno *Vi* puede ser tan completo, que la fracción *O* quede obscurecida; en tales condiciones, el microbio no puede presentar la fracción de antígeno *O*, y por eso no aglutina con el antisuero o anticuerpo *O*.

El antígeno *Vi* desaparece gradualmente a medida que el microorganismo va pasando por medios de laboratorio, hasta perderse por completo; la cepa atraviesa por diversas fases hasta que eso ocurre. En el

primer aislamiento, la cepa no se aglutina por el antisuero *O*; al cabo de algunas resiembras, la cepa adquiere esta aglutinabilidad. Entonces, la cepa no puede estimular la formación de anticuerpos *Vi*, y finalmente se hace incapaz de absorber aglutininas *Vi* del suero inmune.

Exotoxinas. Las exotoxinas se pueden definir como compuestos de elevado peso molecular, generalmente de carácter proteínico, capaces de dañar células animales, y dotadas de antigenicidad, es decir, capaces de elaborar substancias inmunes, conocidas por antitoxinas, cuando se inyectan a animales. Se forman dentro de células bacterianas y se descargan en el medio de cultivo que las rodea. Las exotoxinas son relativamente inestables; las destruyen el calor moderado, la luz ultravioleta y el almacenaje a la temperatura ambiente. El formaldehído las destoxifica y da substancias antigénicas conocidas por toxoides.

Oakley (1943) ha informado que algunas cepas de *Clostridium perfringens* producen siete diferentes exotoxinas, designadas por toxinas α, β, γ, δ, ε, η y θ. Las toxinas α, δ y θ son hemolíticas, es decir, disuelven glóbulos rojos, y no hemolíticas las demás. Turner y Eales (1944) han comprobado también que la toxina δ es hemolítica.

Con pocas excepciones, las exotoxinas son digeridas por enzimas proteolíticas; por eso no son activas cuando se ingieren por la boca. Una excepción es la toxina del *Cl. botulinum,* resistente a las enzimas proteolíticas y capaz de producir su pernicioso efecto cuando se toma por vía bucal. Esto es algo sorprendente, dado que Lamanna, Eklund y McElroy (1946) han logrado cristalizar toxina botulínica y demostrado que era una proteína dotada de las propiedades de solubilidad de una globulina.

En un informe posterior, Buehler, Schantz y Lamanna (1947) hacen un completo análisis de la toxina botulínica cristalina pura, y exponen que es una proteína con punto isoeléctrico a un pH de 5,6, posee las propiedades de una globulina y contiene 19 aminoácidos. Está exenta de carbohidratos, halógenos, hierro, manganeso y magnesio; hay en ella C, H, O, N, S y una pequeña cantidad de P. Los aminoácidos de la toxina botulínica son los siguientes: alanina, arginina, asparagina, cisteína, cistina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

Según Pillemer y otros (1948 *a, b*), la toxina tetánica cristalina en solución al 1 % es de color amarillo pálido. Es muy estable en presencia de glicina, a un pH entre 5 y 6, y relativamente estable en la de sal neutra al mismo pH. Concentraciones de iones hidrógeno inferiores a 6 provocan la conversión espontánea de la toxina en una proteína atóxica floculante. La toxina tetánica da las reacciones usuales de proteínas, y contiene 1 % de azufre e indicios de fósforo; en cambio, no hay en ella carbohidratos. El punto isoeléctrico corresponde a un pH de 5,1 ± 0,1.

Surgalla (1947) ha estudiado la producción de enterotoxina estafilocócica en medios sintéticos compuestos de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa. Se encontró enterotoxina en los líquidos sobrenadantes de cultivos desarrollados en medios que contenían 2 a 16 aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico. El medio más sencillo empleado con éxito contenía los aminoácidos arginina y cistina. La producción de toxina y el desarrollo parecían reducidos en los medios más sencillos, lo cual se atribuye a la cantidad de nitrógeno disponible en ellos. No prosperó en un medio sin glucosa que contenía sólo tres aminoácidos. Se encontró enterotoxina en medios con glucosa a concentraciones entre 0,2 y 20 %.

Se puede obtener toxina diftérica poniendo un medio líquido adecuado en capas delgadas dentro de matraces Erlenmeyer, sembrando en el caldo una cepa toxinógena de *Corynebacterium diphteriae,* e incubando el contenido de los matraces a 37° C durante unos diez días. El proceso puede acelerarse haciendo vegetar los microorganismos en cultivos oscilantes similares a los utilizados para la obtención de antibióticos. El medio contiene toxina, que puede recuperarse después de retirar las células bacterianas por centrifugación. Se emplean procedimientos especiales para aislar y purificar la toxina.

Véase más información sobre exotoxinas en Adams, Hendee y Pappenheimer (1947), Guillaumie y Fabre (1947), Guillaumie, Fabre y Bécoulet (1947), Guillaumie, Kreguer y Fabre (1946 *a, b*), Linggood y Fenton (1947), Pappenheimer y Hendee (1947), Raynaud y Second (1949), Wittler y Pillemer (1948), Woiwood y Linggood (1949), Woodward, Tallman y Perrotta (1951).

Mecanismo de acción de las exotoxinas. Las toxinas bacterianas manifiestan su acción característica produciendo un efecto específico en algún órgano o tejido. Las toxinas del *Clostridium botulinum* y del *Cl. tetani* presentan una afinidad selectiva por el sistema nervioso. Las toxinas de estreptococos hemolíticos denominadas estreptolisina *O* oxigenolábil y estreptolisina *S* oxigenostable atacan y disuelven eritrocitos. Ciertos micrococos producen considerables cantidades de las siguientes toxinas: hemolisina (capaz de disolver glóbulos rojos), leucocidina (que disuelve leucocitos), toxina dermonecrótica y toxina gastroentérica.

Se cree que la toxina produce una unión física o química, o ambas, con el tejido u órgano específico interesado. Las toxinas bacterianas, inyectadas a animales, desaparecen rápidamente de la circulación, lo cual indica que se han unido a los tejidos específicos.

Véase más información en Bernheimer (1948, 1949).

Toxoides. Las propiedades tóxicas de las exotoxinas se pueden destruir tratándolas con formaldehído, sin daño para sus cualidades antigénicas o fijadoras de antitoxinas. Las toxinas así modificadas constituyen las anatoxinas o toxoides.

El toxoide diftérico puro es una proteína termolábil con punto isoeléctrico a un pH de 4,7 ± 0,1. No contiene azufre, fósforo, carbohidratos ni hierro. La adición de glicina permite esterilizar por filtración y almacenar estas preparaciones, durante largos períodos de tiempo, a temperaturas extremas sin que se alteren.

Se han aplicado varios métodos para purificar toxina o toxoide diftérico. Comprenden la precipitación fraccionada con sulfato amónico, la precipitación por ácido, la adsorción en hidróxido de aluminio, con elución subsiguiente, la precipitación con alcohol, acetona o sales metálicas, y el empleo de la ultrafiltración. Añadiendo alumbre al 2 %, aproximadamente, a un filtrado de cultivo, se obtiene un precipitado floculento de la toxina o el toxoide; el precipitado contiene el componente antigénico activo del cultivo.

Más información sobre la materia se encontrará en Holt (1948), Levine y Stone (1951), Levine, Wyman y Edsall (1949), Pillemer, Toll y Badger (1947), Pillemer, Wittler, Clapp y Adam (1948) y Ross (1949).

Endotoxinas. A diferencia de las exotoxinas, las endotoxinas no son excretadas, sino que permaneecn estrechamente ligadas a la célula bacteríana. Quedan en libertad dentro del organismo animal al destruirse la célula por autólisis o por rotura mecánica. La mayoría de las endotoxinas se componen de proteínas; sólo algunas parecen ser complejos de carbohidratos y lípido. Son termoestables a 60° C, no se alteran por almacenaje o exposición a la luz ultravioleta, resisten generalmente a las enzimas proteolíticas y no las destoxica el formaldehído. Las endotoxinas son sólo débilmente antigénicas, y neutralizan anticuerpos que no se forman en cantidad apreciable en animales inmunizados.

ANTICUERPOS Y SU REACCIÓN CON ANTÍGENOS

Los anticuerpos son substancias específicas producidas por un organismo animal en respuesta a la introducción de un antígeno extraño; son obra de ciertas células, que los vierten luego en el torrente sanguíneo. El suero que contienen los anticuerpos se conoce por suero inmunizante o antisuero, y es capaz de reaccionar con el antígeno homólogo *in vitro* e *in vivo*.

Lugares de formación de anticuerpos. Se admite generalmente que la formación de anticuerpos está principalmente limitada al sistema reticuloendotelial.

Jaffé (1931), al pasar revista a la extensa bibliografía dedicada al sistema reticuloendotelial, dedujo que casi todos los testimonios en favor de su participación en la producción de anticuerpos eran de dudosa validez.

McMaster y Hudack (1935), y McMaster y Kidd (1937), inyectaron suspensiones de bacilos tíficos muertos, o hematíes de oveja, o virus vacunal, en orejas de ratón, y vieron que los anticuerpos se producen, ante todo y a concentración máxima, en los ganglios linfáticos que descargan la zona de la inyección. Resultados similares han comunicado Burnet y otros (1941), Ehrich y Harris (1942).

Oakley, Warrack y Batty (1949) han comprobado que, después de estimulación secundaria de caballos, conejos y cobayos mediante inyección subcutánea de toxoide diftérico o tetánico precipitado con alumbre, se producía antitoxina en los ganglios linfáticos que evacuan la zona inyectada. No encontraron indicios de que se formaran en otro lugar, aun cuando no puede descartarse tal posibilidad.

Véase más información en Ehrich, Harris y Mertens (1946).

La presencia de anticuerpos en un suero inmune se puede probar de diversos modos, según la naturaleza del antígeno. Tales demostraciones permiten identificar cinco clases de anticuerpos, al parecer distintos: antitoxinas, aglutininas, precipitinas, lisinas y opsoninas.

Antitoxinas. Las antitoxinas pueden definirse como cuerpos inmunes elaborados por células vivas al inyectar filtrados bacterianos que contengan toxinas o exotoxinas solubles. Los cuerpos bacterianos no toman parte en la reacción, excepto para elaborar las substancias antigénicas solubles.

Una antitoxina se prepara generalmente inyectando a un animal dosis gradualmente mayores de toxina, hasta que el suero presente una elevada concentración de anticuerpos. Luego, se desangra por completo al animal, o se le extrae la sangre sin matarlo; en este último caso, es posible reinmunizarlo varias veces. Cuando la sangre se ha coagulado, se deja en reposo hasta que del coágulo escurre un líquido transparente de color pajizo (suero); este suero contiene los anticuerpos, y se llama «antitoxina».

La inyección de una antitoxina específica a un individuo atacado de cualquier enfermedad producida por un microbio toxinógeno da por resultado la neutralización de la toxina, sin destrucción de ninguna de las dos substancias; éstas pueden disociarse mediante ácidos, dilución intensa o por otros medios. Se han propuesto varias teorías para explicar el mecanismo de la reacción.

Arrhenius (1907) intentó explicar la neutralización de la toxina por la antitoxina en términos puramente químicos, a la manera de una reacción entre un ácido débil y una base para obtener una sal. Creía que se llegaba a un equilibrio, en el que había presentes toxina y antitoxina libres, con algo de toxina-antitoxina en combinación, y que las cantidades respectivas dependían de las proporciones relativas de cada

componente en la mezcla, de acuerdo con la ley de acción de masas:

$$\text{Toxina } (T) + \text{antitoxina } (AT) \rightleftharpoons \text{toxina-antitoxina } (TAT)$$

$$\frac{(T)\ (AT)}{(TAT)} = K$$

Bordet (1909) opinaba, por el contrario, que la reacción se hace comprensible como fenómeno de adsorción. A su juicio, la toxina y la antitoxina no se unen en proporciones definidas, como en una reacción química, sino que la neutralización es puramente física. Una objeción grave

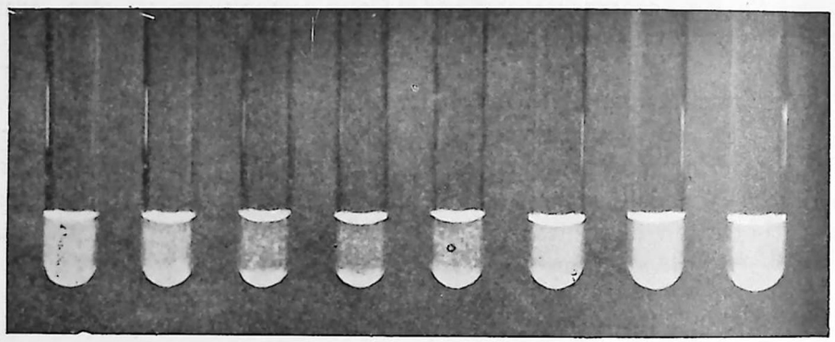


Fig. 213. — Aglutinación. Con una suspensión de *Salmonella typhosa* se han mezclado varias diluciones de antisuero tifoideo. Las diluciones de suero inmune aumentan de izquierda a derecha. El tubo 1.º no muestra aglutinación (fenómeno de la prozona); los tubos 2.º a 6.º inclusive presentan aglutinación; el 7.º no contiene anticuerpos en número suficiente para aglutinar el antígeno; el tubo 8.º sirve de contraste.

a la teoría de la adsorción es que no pone en claro la especificidad de la reacción; algunos autores entienden que la neutralización no es enteramente física ni química, sino una combinación de ambas.

Aglutininas y precipitinas. Según Gruber y Durham (1896), al mezclar bacterias (antígeno) con un suero específico, se produce una aglomeración o reunión de aquéllas. Tal aglomeración obedece a la presencia, en el suero inmune, de anticuerpos conocidos por aglutininas. Los antígenos (suspensiones bacterianas) se denominan aglutinógenos (figura 213).

Posteriormente, Kraus (1897) observó que los filtrados bacterianos producen precipitados al mezclarlos con suelo inmune específico. Los anticuerpos del suero causantes de tal precipitación son precipitinas, y precipitógenos los antígenos solubles (fig. 214).

Se supone que la aglutinación y la precipitación son obra de los mismos anticuerpos. En el primer caso (aglutinación), el antígeno consiste en partículas (bacterias u otras células); en el segundo, está en solución. Las dos substancias inmunes se pueden demostrar en el mismo

antisuero; por ejemplo, un antisuero tifoideo no solamente aglutinará microorganismos tifógenos, sino que producirá también precipitados con filtrados de cultivos, aun tratándose de un suero obtenido de un animal previamente inmunizado contra el tifus abdominal, o de un filtrado de cultivos.

La aglutinación y la precipitación son análogas a la neutralización de una toxina con antitoxina por entrar en la reacción sólo dos compo-

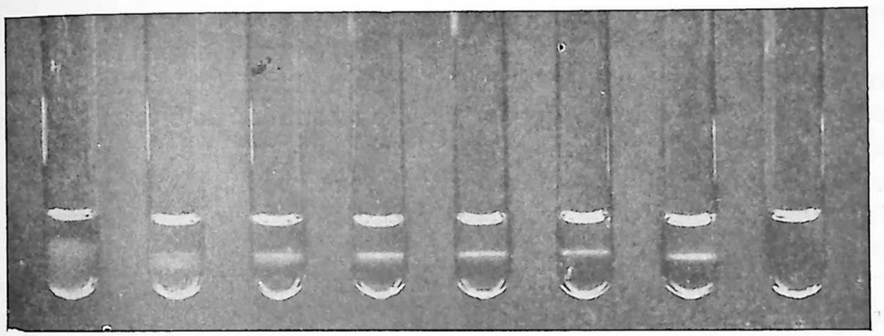


Fig. 214. — Precipitación. Diversas diluciones de antisuero equino se mezclaron con suero equino. El primer tubo de la izquierda contenía el antisuero más concentrado; nótese la precipitación en el punto de contacto de las dos soluciones. El último tubo, a la derecha, es el de contraste.

nentes: el antígeno (glutinógeno o precipitógeno) y las substancias inmunes (aglutininas o precipitinas).

Según Pauling (1940) y otros autores, una molécula de anticuerpo puede combinarse, al parecer, con más de una partícula de antígeno, y viceversa, para formar una armazón de estas últimas, lo cual da origen a un complejo antígeno-anticuerpo.

Fenómeno de la prozona. Si se diluye un suero inmune lo bastante, ya no aglutina la suspensión de células. Esto puede ocurrir asimismo aunque la dilución de antisuero contenga un número suficiente de cuerpos inmunes para aglutinar el antígeno.

En la serie de tubos de ensayo, representada en la figura 213, las diluciones de suero inmune aumentan de izquierda a derecha. No se produce aglutinación en el tubo 1.º de la izquierda, donde es máxima la concentración; ésta es la llamada «prozona». Se ha demostrado que el suero contiene una substancia inhibitoria, probablemente una globulina, que dificulta la aglutinación, pero que deja de actuar cuando se diluye más el antisuero. La aglutinación alcanza su punto culminante en el tubo 3.º, y no se presenta en el tubo 7.º, donde la concentración de antisuero es demasiado baja para que las células se aglutinen.

Aglutininas y precipitinas normales. Los sueros normales del hombre y de los animales poseen a menudo la facultad de precipitar o aglutinar

el antígeno específico homólogo, siempre que no se diluyan demasiado. No se sabe si estas aglutininas y precipitinas normales son lo mismo que los cuerpos inmunes correspondientes, o sea los producidos tras una inmunización.

El formol (solución de formaldehído), el calor, los rayos ultravioleta, las substancias químicas, etc., a concentraciones justamente fuertes para matar bacterias, no destruyen los anticuerpos aglutinantes o precipitantes. Sin embargo, la mayoría de los sueros inmunes dejan de aglutinar o precipitar a temperaturas entre 60 y 65° C.

Presencia de electrólitos. Bordet (1899) observó el primero que no hay aglutinación en ausencia absoluta de un electrólito, como el cloruro sódico, pero que basta añadir una diminuta cantidad de electrólito a una mezcla rebelde de antígeno y aglutinina para provocar una aglutinación en el acto. Se ha comprobado que esto ocurre, no sólo con bacterias, sino también con células de otras clases. Se supone que la aglutinación se desarrolla en dos tiempos: 1.º, fijación del anticuerpo al antígeno, y 2.º, aglomeración de las células en presencia de un electrólito; es decir, una reacción análoga a la de precipitación electrolítica de coloides. La unión de antígeno y anticuerpo acarrea la formación de una suspensión coloidal anfótera, que precipita fácilmente por electrólitos, de los que se requieren cantidades muy pequeñas.

Hardy (1900) fue el primero en señalar que la precipitación de partículas coloidales viene determinada por el ion del electrólito añadido que tenga una carga eléctrica de signo contrario a la de tales partículas. Como las bacterias sustentan una carga eléctrica negativa, los iones positivamente cargados del electrólito provocan la aglutinación de los microorganismos. Cuanto mayor sea la carga positiva, menor será la cantidad de electrólito necesaria para aglutinar.

Véase una exposición de la naturaleza de las fuerzas actuantes entre antigeno y anticuerpo, y de la reacción de aglutinación, en Pauling, Campbell y Pressman (1943).

Lisinas. Nuttall (1888) observó que, si se mezcla sangre normal con tejidos cargados de gérmenes de ántrax, y se incuba durante cierto tiempo, disminuye el número de bacterias; en otras palabras, que la sangre fresca desarrolla una acción bactericida. Buchner (1889 *a, b*) descubrió que la acción bactericida del suero sanguíneo normal quedaba anulada calentándolo a 56° C durante treinta minutos; por su semejanza con enzimas, dio a esta substancia termolábil el nombre de «alexina» (substancia de defensa que destruye bacterias). Más tarde, Pfeiffer e Issaeff (1894 *a, b*) advirtieron que, inyectando gérmenes de cólera en la cavidad peritoneal de un cobayo inmunizado previamente contra el mismo agente patógeno, éste pierde su movilidad, se divide en gránulos y acaba por disolverse. Asimismo demostraron que la inyección de una

mezcla de microbios de cólera y suero inmune a un cobayo normal provocaba la disolución de las bacterias (bacteriólisis). Según Bordet, la reacción ocurre no sólo en presencia de suero inmune sin calentar, sino también cuando se calienta antes el suero a 56° C durante treinta minutos y se mezcla con una pequeña cantidad de suero normal. Estas observaciones ponen de manifiesto que en el fenómeno de la bacteriólisis intervienen dos factores: una substancia termolábil, que existe en el suero sanguíneo normal e inmune, y las substancias inmunes producidas en el curso de la inmunización. Los cuerpos inmunes son específicos, y no lo es la substancia termolábil.

Pueden prepararse sueros inmunes líticos específicos, no sólo contra bacterias (bacteriolisinas), sino igualmente contra otros cuerpos celulares, como eritrocitos (hemolisinas) y células de los tejidos (citolisinas).

Calentando un suero bacteriano a 56° C durante treinta minutos, pierde la facultad de disolver el antígeno específico: el calor destruye la substancia termolábil conocida por alexina o complemento; pero la adición de una pequeña cantidad de suero normal restaura el poder bacteriolítico del suero inmune. Hay complemento en todos los sueros animales, y no aumenta durante la inmunización. El otro componente (conocido por cuerpo o substancia inmune, amboceptor o sensibilizador) no se destruye al calentar el suero a 56° C durante treinta minutos, y aumenta en el curso de la inmunización.

Este grupo de anticuerpos requiere tres componentes para actuar: antígeno, anticuerpo y complemento. El anticuerpo reacciona primero con el antígeno; si no hay complemento, el antígeno no se disuelve, y, si lo hay, las células se disuelven. En cambio, las reacciones de aglutinación, precipitación y antitóxica inmune sólo necesitan dos componentes: antígeno y anticuerpo.

Naturaleza química y función del complemento. Como ya se ha dicho, los anticuerpos son específicos para el antígeno inmunizante; por el contrario, el complemento es inespecífico y no aumenta al inmunizar. Los antígenos (eritrocitos, bacterias, etc.), se disuelven por obra de dos factores contenidos en el suero: el anticuerpo específico, relativamente termoestable, y el complemento inespecífico, termolábil. Primero se une el anticuerpo con el antígeno homólogo, haya o no complemento; éste no se combina con el antígeno o el anticuerpo sino después de unirse ambos. Sólo entonces se fija el complemento y, en condiciones adecuadas, el antígeno se disuelve.

El complemento del cobayo consta de cuatro componentes de función distinta, designados por los símbolos *C'*1 (segmento medio), *C'*2 (segmento terminal), *C'*3 (tercer componente), *C'*4 (cuarto componente). La fracción *C'*1 es termolábil, precipita del suero con dióxido de carbono o ácido diluido, y se caracteriza como euglobulina; la fracción C'2 permanece disuelta después de precipitar la anterior, es también termolábil

y se presenta como mucoeuglobulina; la fracción *C'3* se inactiva con levadura o cimina, y es termostable; y la fracción *C'4* se inactiva con amoníaco diluido o hidracina, es termostable y constituye asimismo una mucoeuglobulina.

Los componentes *C'1*, *C'2* y *C'3* del complemento reaccionan primero con la combinación antígeno-anticuerpo, y el antígeno queda luego sensible a la acción de *C'3*, que funciona como si fuese un catalizador, y provoca la disolución del antígeno.

Ecker y Seifter (1945) han demostrado que, en condiciones adecuadas de concentración, todas las fracciones correspondientes del complemento del cobayo se substituyen mutuamente; y lo mismo se ha descubierto respecto a los complementos del hombre y del conejo.

Véase más información en Heidelberger (1951), Pillemer (1943), Pillemer, Ranoff, Blum y Lepow (1953).

Reacción de fijación o desviación del complemento. Con este nombre se conoce una importante reacción inmunológica descubierta por Bordet y Gengou (1907). Estos investigadores observaron que, al mezclar el suero de un paciente restablecido de la peste bubónica con el antígeno específico (bacilos de la enfermedad), se liga o fija el complemento del suero, y los microorganismos se disuelven. Como en el suero no queda complemento libre, designaron la reacción por «fijación del complemento».

Su desarrollo es el siguiente:

1.° Antígeno y anticuerpo han de unirse para que el complemento pueda disolver las células.

2.° Sólo el anticuerpo específico puede ligar el antígeno.

3.° Unidos ya el antígeno y el anticuerpo (antígeno sensibilizado), se fija el complemento del suero.

4.° La falta de complemento libre en el suero indica que lo ha fijado la unión antígeno-anticuerpo.

5.° La presencia o ausencia de complemento libre en el suero se comprueba añadiendo al complejo antígeno-anticuerpo una mezcla de hematíes de carnero y suero de conejo con substancias inmunes a eritrocitos de carnero o suero anticarnero (previamente calentado a 56° C, durante treinta minutos, para destruir el complemento). Si hay complemento libre se disolverán las células de carnero; si no lo hay, no se producirá hemólisis, lo cual indica que el complemento ha sido fijado por el complejo antígeno-anticuerpo.

La reacción es útil para diagnosticar la presencia de gérmenes patógenos en pacientes, o para identificar ciertos antígenos por medio de sueros específicos. Tal como la practicaban Bordet y Gengou, puede bosquejarse como sigue:

A	*B*
Antígeno (suspensión de gérmenes patógenos) + Anticuerpo (suero inmune a la peste, calentado a 56° C por 30 min.) + Complemento (suero fresco normal)	Antígeno (suspensión de gérmenes patógenos) + Suero normal (calentado a 50° C por 30 min.) + Complemento (suero fresco normal)

A las cinco horas se añadía a *A* y *B*:
Suero inmune a eritrocitos de carnero
(calentado a 56° C durante 30 min.)
+
Suspensión de glóbulos rojos de carnero

Resultados:

A. No hubo hemólisis.

B. Hemólisis.

Opsoninas. Los fenómenos inmunológicos ya reseñados implican reacciones entre bacterias, productos bacterianos de excreción (toxinas) y otros antígenos con humores orgánicos. Éstas fueron las primeras reacciones inmunológicas conocidas. Más tarde, Mechnikov (1901) y otros autores demostraron que también intervienen en los mecanismos defensivos del cuerpo ciertas células somáticas.

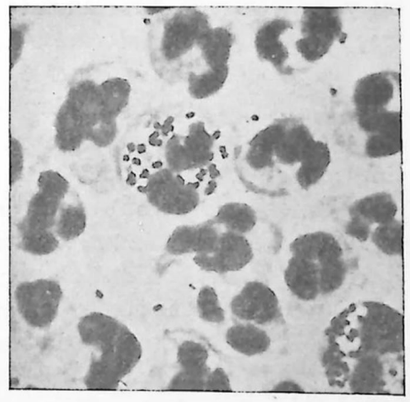


Fig. 215
Fagocitosis de *Neisseria gonorrhoea* por leucocitos polimorfonucleares.

Las células que principalmente participan en la reacción son los glóbulos blancos llamodos leucocitos polimorfonucleares o fagocitos, capaces de acudir al sitio de la infección, englobar bacterias, fragmentos de tejidos, etc., y retirarlos de la zona infectada (fig. 215). Por el nombre de las células que intervienen sobre todo en la reacción, el proceso suele denominarse fagocitosis. Los leucocitos actúan como células depuradoras, puesto que eliminan bacterias y desechos, y muchos de ellos perecen en la lucha contra los gérmenes invasores.

La aptitud fagocítica no se limita a los leucocitos polimorfonucleares; la poseen otras varias células, algunas de ellas fijas en los tejidos, y otras móviles. Las primeras comprenden las del endotelio que reviste capilares y senos en el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos y otras células del sistema reticuloendotelial; entre las segundas se

cuentan los grandes elementos mononucleares conocidos por macrófagos.

Se ha observado que, lavando leucocitos para eliminar el suero, y mezclándolos con bacterias, no hay fagocitosis; pero si se añade un poco de suero normal a una mezcla de leucocitos y bacterias, se restablece la fagocitosis activa. Los sueros que preparan bacterias para este proceso contienen anticuerpos denominados bacteriotropinas u opsoninas, que ya existen en el suero normal, pero aumentan en el curso de la inmunización.

Para más información, véanse Berry y Spies (1949), Burnet y Fenner (1949).

SEROLOGÍA DE LA SÍFILIS

Para el serodiagnóstico de la sífilis se emplean diversas pruebas, algunas de ellas basadas en la técnica de la fijación del complemento, y otras, en la floculación. Entre las más importantes se cuentan la reacción de Wassermann y sus muchas modificaciones, la de Kahn y la de Kline.

Reacción de Wassermann. Este autor propuso una reacción de fijación del complemento en la que el antígeno era un extracto acuoso de feto sifilítico. Más tarde se vio que tal extracto podía substituirse por un antígeno preparado mediante extracción con alcohol de corazón de buey, pulverizado, previamente extractado con éter, y agregando al extracto alcohólico colesterina o una mezcla de colesterina y lecitina.

La suspensión de lipoides no constituye un antígeno en sentido estricto, pues no es capaz de provocar la formación de cuerpos inmunes cuando se inyecta a un animal. Sin embargo, por fijar anticuerpos sifilíticos en el suero del paciente, suele mencionarse como antígeno.

Una especie de anticuerpo se desarrolla a consecuencia de infección por *Treponema pallidum,* agente productor de la sífilis; como no se sabe si es un verdadero anticuerpo, generalmente se le da el nombre de reagina. Puede reaccionar con el antígeno lipoideo preparado de corazón de buey y reforzado con colesterina y lecitina.

Cardiolipina. Así se ha denominado un fosfolípido complejo, aislado primeramente por Pangborn (1941), de corazón de buey, en forma químicamente pura en lo esencial. Es una substancia sencilla, y por hidrólisis alcalina da ácidos oleico y linoleico, un poliéster del ácido glicerofosfórico y glicerina.

La cardiolipina, la lecitina purificada y la colesterina purificada no son antigénicas por sí solas, pero ciertas mezclas de las tres funcionan bien como antígenos en la reacción de fijación del complemento para la sífilis. De distintos lotes de estas substancias se pueden preparar mezclas reproducibles con suma exactitud.

La cardiolipina, reforzada con lecitina y colesterina, parece ser superior, en general, por lo que atañe a sensibilidad y especificidad, a la suspensión lipoidea obtenida extractando, primero con éter, y luego con alcohol, corazón de buey, en polvo, y añadiendo al extracto alcohólico lecitina o una mezcla de lecitina y colesterina.

Véase más información en Andújar, Anderson y Mazurek (1948), Giordano, Culbertson y Higginbotham (1948), Kline (1947 *a*), Kolmer y Lynch (1948 *a, b, c*).

Reacción de Kahn. Durante los últimos años ha aumentado la popularidad de las pruebas de precipitación para el diagnóstico de la sífilis. El primer procedimiento práctico de este tipo es la reacción de Kahn, la más frecuentemente empleada hoy con ese objeto.

El antígeno de Kahn se prepara extractando corazón de buey, desecado primero con éter y luego con alcohol, y añadiendo colesterina al extracto alcohólico. A continuación se mezcla con solución salina, a fin de obtener una suspensión inestable de antígeno, que contiene agregados de lípidos, los cuales se dispersan en contacto con suero. Entonces, en el suero sifilítico aparecen nuevos grumos en forma de precipitado, mientras que no ocurre lo propio en un suero no sifilítico.

La agitación influye apreciablemente en la formación de precipitados en el suero sifilítico con suspensión de antígeno. Así como un suero fuertemente positivo dará floculación tan pronto como se mezcle con una cantidad adecuada de tal suspensión, el menos positivo requiere ser agitado varios minutos para que se forme un precipitado.

Más información se encontrará en Kahn (1947, 1948), Kahn y McDermott (1948 *a, b, c*), McDermoth y Kahn (1949).

Reacción de Kline. Es una reacción microscópica, y se efectúa del modo siguiente:

Con una pipeta se pone 0,5 ml. de suero calentado en un círculo marcado sobre un portaobjetos.

Se añade al suero una gota (0,008 ml) de emulsión de antígeno.

Se hace girar el porta durante cuatro minutos.

Se examina al microscopio con un aumento de 100 diámetros, a fin de descubrir grumos (fig. 216).

Los resultados se anotan como negativos, débilmente positivos (± y +), positivos (++ y +++) y fuertemente positivos (++++), según el grado de agregación y el tamaño de los grumos.

El antígeno inicialmente empleado por Kline se preparó con la fracción de hígado de buey, soluble en alcohol e insoluble en acetona, concentrada por evaporación a 50° C.

Kline recomienda actualmente un antígeno de cardiolipina reforzada con lecitina, en vez de la fracción de corazón de buey, soluble en alcohol e insoluble en acetona. Este antígeno da resultados más espe-

cíficos y es más sensible que la preparación primitiva, por lo que se aconseja como antígeno normal para la microrreacción de Kline.

Las reacciones de Kahn y de Kline son más sencillas de ejecución que la antigua de Wassermann y sus diversas modificaciones; por eso se van adoptando poco a poco en vez de ellas, y parece sólo cuestión de tiempo que lleguen a sustituirlas por completo.

Véase más información en Kline (1947, 1948), Levine, Kline y Suessenguth (1948), y Mazzini (1951).

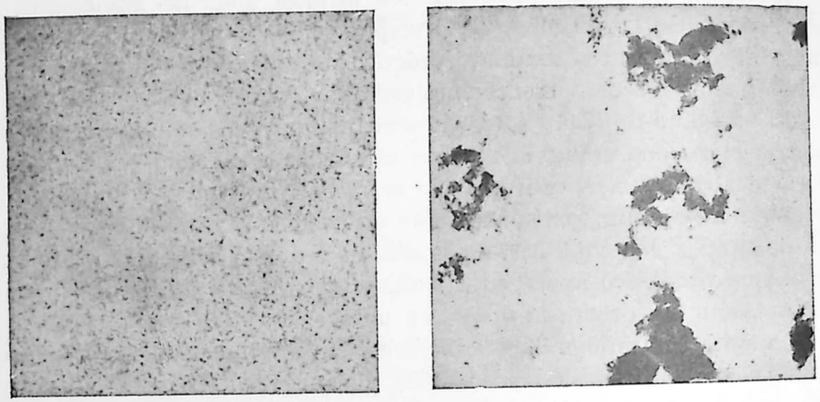


Fig. 216. — Microrreacción de Kline para el diagnóstico de la sífilis. Izquierda, reacción negativa; el antígeno no se ha aglomerado, sino que aparece en suspensión homogénea. Derecha, reacción positiva: el antígeno forma agregados que flotan en un líquido transparente.

HIPERSENSIBILIDAD

El término «alergia» comprende todos los tipos de reacciones de hipersensibilidad, excepto la anafilaxis; el antígeno puede ser proteína o no proteína. En el hombre hay escasa propensión al shock generalizado; se ha observado a veces el shock anafiláctico típico, pero las manifestaciones tienden a localizarse, especialmente en las vías respiratorias, el conducto gastrointestinal y la piel. Los estados alérgicos típicos incluyen la fiebre del heno, el asma, la dermatitis atópica, la urticaria, el edema angioneurótico, la alergia medicamentosa, la dermatitis por contacto, la jaqueca y la alergia bacteriana.

La palabra «anafilaxis» se suele emplear con cierta vaguedad, pero en sentido estricto se define como hipersensibilidad frente a substancias antigénicas o sea capaces de estimular la producción de anticuerpos cuando se inyectan en el cuerpo.

Se puede inocular a un cobayo una dosis grande de antígeno extraño sin que se advierta ningún efecto nocivo, y se dice que el animal queda sensibilizado. Si, al cabo de diez o más días, se le inyecta una cantidad muy pequeña del mismo antígeno (dosis de intoxicación), pueden presentarse síntomas violentos que acarreen su muerte. Si el animal se repone, suele ser refractario a otra inyección del mismo antígeno. Aplicando a un cobayo dosis repetidas de un antígeno extraño, a intervalos breves, de siete días o menos, no queda hipersensibilizado, y generalmente muestra sólo una reacción leve; se dice entonces que está desensibilizado a ulteriores inyecciones del antígeno de referencia.

No todas las especies animales tienen igual sensibilidad a la anafilaxia. Los cobayos son más sensibles que cualquiera otro animal de laboratorio; la muerte proviene de un espasmo bronquial, seguido de asfixia aguda. En cambio, el hombre sólo presenta generalmente lesiones cutáneas (sarpullido).

Los cuerpos inmunes causantes de anafilaxis son probablemente idénticos a la precipitina y a los anticuerpos fijadores del complemento. Se supone que la anafilaxis es una reacción celular, que tiene efecto en el interior de las células donde se ha fijado el anticuerpo. Algunos anticuerpos se desprenden de las células y pueden descubrirse en la sangre. Hay muchos indicios que confirman el aserto de que la dosis de intoxicación va seguida de liberación de histamina, heparina y tal vez colina, causantes de los síntomas del shock anafiláctico.

Los síntomas se deben a una contracción del tejido muscular de fibra lisa, o no estriada. Esto se comprueba cortando un trozo de músculo liso de cobayo sensibilizado, y poniéndolo en una solución del antígeno específico; inmediatamente se contrae el músculo.

La anafilaxis es esencialmente un fenómeno de laboratorio. Los cobayos se matan con suma facilidad en condiciones de anafilaxis, pero no es muy probable que mueran nunca, en condiciones naturales, de shock anafiláctico. En el laboratorio se establecen condiciones artificiales que no suelen presentarse en la Naturaleza.

Antihistaminas. Existe una estrecha semejanza entre la acción fisiológica de la histamina y las manifestaciones de anafilaxis. Al parecer, el mecanismo fundamental en este caso es la reacción producida cuando un antígeno se pone en contacto con un anticuerpo en un organismo vivo. En esta reacción de antígeno-anticuerpo se desprende histamina, o una substancia muy afín, que se considera como el agente responsable de muchos de los síntomas de alergia. Algunos investigadores han demostrado que la aparición de síntomas alérgicos coincide con el aumento del índice de histamina en la sangre y los tejidos sensibles.

Las antihistaminas son agentes opuestos a la acción de la histamina. Estas substancias poseen actividades fisiológicas contrarias en absoluto a las de la histamina.

La histamina ocasiona constricción bronquial, reduce la presión sanguínea y estimula el intestino. En cambio, las antihistaminas relajan la musculatura bronquial, aumentan la presión sanguínea y detienen la movilidad del intestino.

Son muchas las antihistaminas sintetizadas y adaptadas a usos terapéuticos; entre ellas figuran las siguientes: Antergán, Benadril, Cloroten, Decapryn, Histadyl, Neoantergán, Neohetramina, Fenergán, Piribenzamina y Teoforina.

Cutirreacción de alergia. Pueden emplearse cutirreacciones para determinar si una persona es sensible a ciertos alimentos, pólenes u otras proteínas. La prueba se efectúa introduciendo extractos de las diversas substancias proteínicas en la piel del brazo y observando los resultados; cuando la reacción es positiva, aparece una extensa zona inflamada, localizada o habón de urticaria, alrededor del sitio de la inyección. Pueden ensayarse diferentes extractos al mismo tiempo, y la reacción se hace perceptible a los pocos minutos.

Véase más información en Dragstedt (1941, 1945), Maietta (1949) y Mayer (1949).

GRUPOS SANGUÍNEOS

Landsteiner (1900) descubrió que cuando los eritrocitos de ciertos individuos se mezclan con el suero de otros, aquéllos se aglutinan, lo cual constituye un ejemplo de isoaglutinación. Comprobó que en este caso coincidían dos componentes antigénicos, A y B, en los hematíes, y otros dos en el suero aglutinante; y, en consecuencia, se demostró que la sangre humana podía clasificarse en cuatro grupos, a base de la presencia o ausencia de los componentes A y B en los eritrocitos.

Según Landsteiner, los cuatro grupos sanguíneos pueden representarse como muestra la tabla 40. En ella se ve que los eritrocitos del primer grupo no tienen ninguno de los componentes A y B; los del segundo contienen sólo el A; los del tercero, únicamente el B, y los del cuarto, los dos componentes A y B. Las personas del grupo A no tienen anticuerpos en el suero capaces de aglutinar células A, pero sí células B; las del grupo B carecen de anticuerpos que aglutinen células B, pero los tienen que aglutinan células A; los del grupo AB no tienen ningún tipo de anticuerpos, y los del grupo O tienen anticuerpos de ambos tipos.

TABLA 40. — LOS CUATRO GRUPOS SANGUÍNEOS DE LANDSTEINER

Grupo	Antígeno celular	Aglutinina en el suero	Reacción* con suero de tipo				Frecuencia proporcional en adultos, en los Estados Unidos %
			O	A	B	AB	
O	—	Anti-*A* + Anti-*B*	—	—	—	—	45
A	*A*	Anti-*B*	+	—	+	—	39
B	*B*	Anti-*A*	+	+	—	—	12
AB	*AB*	—	+	+	+	—	4

* + = aglutinación.

En transfusiones sanguíneas conviene proporcionar sangre del mismo tipo; de no encontrarla, la de tipo O suele ser compatible y satisfactoria, y por eso los individuos con sangre O se consideran como donadores universales. El suero de un donador O contiene anticuerpos A y B, pero éstos se diluyen mediante administración lenta, sin provocar lisis de los hematíes de un receptor de tipo A, B o AB. En cambio, los individuos del grupo O no pueden recibir sangre más que de donadores O, porque esta sangre contiene anticuerpos A y B, que reaccionan inmediatamente con hematies de donadores de los tipos A, B y AB. De manera análoga, los individuos del tipo AB son receptores universales, porque su suero no contiene anticuerpos.

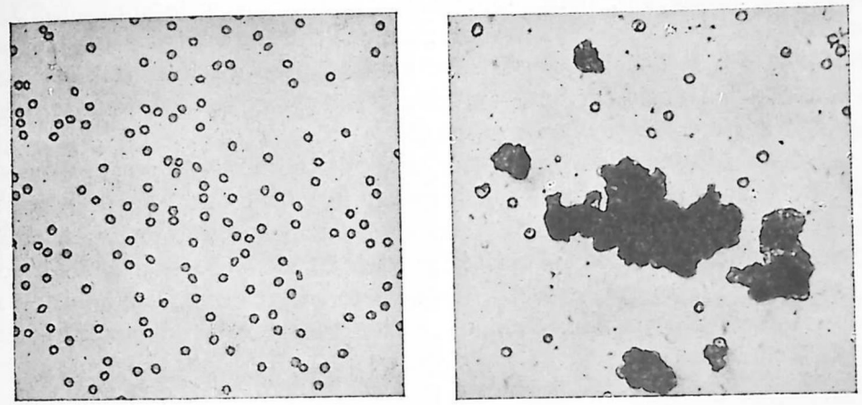


Fig. 217. — Grupos sanguíneos. Izquierda, células de sangre del grupo *A* mezcladas con suero clasificador de tipo *A*; no hay aglutinación, lo que indica compatibilidad. Derecha, células de sangre del grupo *A* mezcladas con suero clasificador del tipo *B*; hay aglutinación, señal de incompatibilidad.

Clasificación de la sangre. Para clasificar la sangre sólo se necesitan antisueros de los grupos A y B. Se limpian tres portaobjetos y se marcan con las letras A, B y C (contraste). Se pone una gota de suero A en el centro del porta A, una gota de suero B en el centro del porta B y una gota de solución salina normal en el centro del porta C; a cada porta se agrega un volumen igual de suspensión de células de la sangre desconocida (suspensión de sangre en solución salina al 5 %). Se balancean los portas durante unos cinco minutos y se examinan luego a través de un objetivo de poco aumento.

Si no se produce aglutinación en los portaobjetos A y B, la sangre es del grupo O; si la hay en ambos portas A y B, la sangre es del grupo AB; si la hay en A, pero no en B, la sangre es del grupo B, y si la hay en el B, pero no en A, la sangre es del grupo A (fig. 217).

Estos cuatro grupos son de suma importancia para transfusiones de sangre, en casos de paternidad dudosa, y para identificar a personas.

Véase más información en Kabat (1949).

FACTOR Rh

Landsteiner y Wiener (1941) descubrieron en la sangre otro antígeno, al que denominaron factor Rh, por haberse encontrado primero en los eritrocitos de monos rhesus. Los individuos que presentan este antígeno se designan por Rh positivos, y los que carecen de él, por Rh negativos. Alrededor del 85 % de los americanos blancos son Rh positivos. Como el factor es antigénico, tiene importancia por su poder inmunizante. Los anticuerpos producidos contra el antígeno Rh provocan reacciones en personas Rh negativas que han recibido anteriormente transfusiones de sangre Rh positiva; una segunda transfusión puede producir aglutinación y hemólisis de los eritrocitos.

Durante el embarazo, un factor Rh negativo materno y otro Rh positivo paterno pueden dar origen a una enfermedad fatal en la criatura, que puede morir en el útero; esta enfermedad se llama eritroblastosis. El feto hereda el factor del padre; la madre queda entonces inmunizada frente al antígeno Rh contenido en su feto Rh positivo; las aglutininas inmunes anti-Rh pasan a través de la placenta, y producen la enfermedad en la mayoría de los casos.

REFERENCIAS

Adams, M. H., E. D. Hendee, y A. M. Pappenheimer: Factors involved in production of *Clostridium welchii* alpha toxin, *J. Exp. Med.*, **85**: 701, 1947.

Andújar, J. J., M. M. Anderson, y E. E. Mazurek: Cardiolipin blood tests in syphilis, *Am. J. Clin. Path.*, **18**: 199, 1948.

Arrhenius, S.: «Inmunochemistry», Nueva York, The Macmillan Company, 1907.

Bernheimer, A. W.: Properties of certain rapidly acting bacterial toxins as illustrated by streptolysins *O* and *S*, *Bact. Rev.*, **12**: 195, 1948.

—: Formation of a bacterial toxin (streptolysin *S*) by resting cells, *J. Exp. Med.*, **90**: 373, 1949.

Berry, L. J., y T. D. Spies: Phagocytosis, *Medicine*, **28**: 239, 1949.

Bordet, J.: Le méchanisme de l'agglutination, *Ann. inst. Pasteur*, **13**: 225, 1899.

— y F. P. Gay: «Studies in Immunity» Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1909.

— y O. Gengou: Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens, *Ann. inst. Pasteur*, **20**: 289, 1901.

Buchner, H.: Über die bakterientödtende Wirkung des zellenfreien Blutserums, *Centr. Bakt.*, **6**: 1, 1889*a*.

—: Über die nähere Natur des bakterientödtenden Substanz im Blutserum, *ibid.*, **6**: 561, 1889*b*.

Buehler, H. J., E. J. Schantz y C. Lamanna: The elemental and amino acid composition of crystalline *Clostridium botulinum* type *A* toxin, *J. Biol. Chem.*, **169**: 295, 1947.

Burnet, F. M., y F. Fenner: «The Production of Antibodies», Nueva York, The Macmillan Company, 1949.

Chamberland, C., y E. Roux: Sur l'atténuation de la virulence de la bactéridie charbonneuse sous l'influence des substances antiseptiques, *Compt, rend.*, **96**: 1088, 1883.

Dolman, C. E.: Oral immunization, *Am. J. Med. Sci.*, **215**: 327, 1948.

Dragstedt, C. A.: Anaphylaxis, *Physiol. Rev.*, **21**: 563, 1941.

—: The significance of histamine in anaphylaxis, *J. Allegy*, **16**: 69, 1945.

Ecker, E. E., y S. Seifter: The interrelation of corresponding complement components of man and guinea pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **58**: 359, 1945.

Edwards, P. R.: Simplified serologic identification of *Salmonella* cultures, Public Health Service, Communicable Disease Center, Atlanta, Ga., 1950.

Ehrich, W. E., y T. N. Harris: Formation of antibodies in popliteal lymph node in rabbits, *J. Exp. Med.*, **76**: 335, 1942.

—, —, y E. Mertens: Absence of antibody in macrophages during maximum antibody formation, *ibid.*, **83**: 373, 1946.

Ewing, W. H., y P. R. Edwards: Selection of *Salmonella* and *Shigella* cultures for serological classification, Public Health Service, Communicable Disease Center Atlanta, Ga., 1950.

Felix, A., y R. M. Pitt: New antigen of *B. typhosus*; its relation to virulence and to active and passive immunisation, *Lancet*, **2**: 186, 1934.

Felsenfeld, O.: The *Salmonella* problem, *Am. J. Clin. Path.*, **15**: 584, 1945.

Giordano, A. S., C. S. Culbertson, y M. W. Higginbotham: Cardiolipin antigen in serologic tests for syphilis, *Am. J. Clin. Path.*, **18**: 193, 1948.

Gruber, M., y H. E. Durham: Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Choleravibrio und des Typhusbacillus, *Münch. med. Wochschr.*, **43**: 285, 1896.

Guillaumie, M., y M. Fabre: Influence du calcium sur les résultats des titrages *in vivo* de différentes préparations de toxine perfringens, *Compt. Rend. soc. biol.*, **141**: 1168, 1947.

—, —, y G. Bécoulet: Activité de la toxine perfringens additionée de cystéine ou de calcium, *ibid.*, **141**: 647, 1947.

—, A. Kreguer, y M. Fabre: Propriétés et composition de la toxine de *Welchia perfringens*. I. Action hémolytique, *Ann. inst. Pasteur*, **72**: 12, 1946*a*; II. Action léthale —effect nécrosant— activité enzymatique, *ibid.*, **72**: 384, 1946*b*.

Heidelberger, M.: National Academy of Sciences conference on complement, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **37**: 185, 1951.

Holt, L. B.: The preparation of purified and concentrated diphtheria toxoid from a semi-synthetic medium, *British J. Exp. Path.*, **29**: 335, 1948.

Jaffé, R. H.: Reticulo-endothelial system in immunity, *Physiol. Rev.*, **11**: 277, 1931.

Kabat, E. A.: Immunochemical studies on blood group substances, *Bact. Rev.*, **13**: 189, 1949.

Kahn, R. L.: Universal serologic reactivity with lipid antigens, *Am. J. Pub. Health*, **37**: 283, 1947.

—: Twenty-five years of precipitation studies in syphilis, *J. Mich. State Med. Soc.*, **47**: 1089, 1948.

— y E. B. McDermott: Kahn reactions with cardiolipin antigen compared with Kahn antigen. II, *Am. J. Clin. Path.*, **18**: 364, 1948*a*.

— y —: The specificity of the Kahn reaction, *J. Mich. State Med. Soc.*, **47**: 1095, 1948*b*.

— y —: Studies on cardiolipin antigen. IV. Variations in sensitivity of different lots of purified lecithin, *J. Lab. Clin. Med.*, **33**: 1220, 1948*c*.

Kline, B. S.: Cardiolipin lecithin antigen, *Am. J. Clin. Path.*, **17**: 874, 1947*a*.

—: Cardiolipin-lecithin antigen, *Arch. Dermatol. Syphilol.*, **55**: 514, 1947*b*.

—: Development of a single standard slide test for syphilis, *Am. J. Clin. Path.*, **18**: 185, 1948.

Kolmer, J. A., y E. R. Lynch: Cardiolipin antigens in the Kolmer complement fixation test for syphilis, *J. Venereal Disease Inform.*, **29**: 166, 1948*a*.

— y —: Cardiolipin and Kolmer antigens in the complement fixation test for syphilis, *Texas State J. Med.*, **44**: 312, 1948.

— y —: An improved antigen for ther Kolmer complement-fixation test for syphilis, *Am. J. Clin. Path.*, **18**: 731, 1948.

Lamanna, C., H. W. Eklund, y O. E. McElroy: Botulinum toxin (Type *A*); including a study of shaking with chloroform as a step in the isolation procedure. *J. Bact.*, **52**: 1, 1946.

Landsteiner, K.: Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe, *Centr. Bakt.*, **27**: 357, 1900.
Levine, B., B. S. Kline, y H. Suessenguth: Clinical and serologic evaluation of 27.103 consecutive slide tests with cardiolipin-lecithin antigen and Kline antigen, *Am. J. Clin. Path.*, **18**: 212, 1948.
Levine, L., y J. L. Stone: The purification of tetanus toxoid by ammonium sulfate fractionation, *J. Immunol.*, **67**: 235, 1951.
—, L. Wyman, y G. Edsall: Chemical and immunological properties of diphtheria toxoid purified by ammonium sulfate fractionation, *ibid.*, **63**: 219, 1949.
Linggood, F. V., y E. L. Fenton: The production of diphtheria toxin by submerged culture in shaking flasks, *Brit. J. Exp. Path.*, **28**: 354, 1947.
McDermott, E. B., y R. L. Kahn: Differences in specificity of cardiolipin and Kahn antigens in 1949 National Serologic Evaluation Survey, *Univ. Hosp. Bull., Univ. Mich.*, **15**: 93, 1949.
McMaster, P. D., y S. S. Hudack: Formation of agglutinins within lymph nodes, *J. Exp. Med.*, **61**: 783, 1935.
— y J. G. Kidd: Lymph nodes as source of neutralizing principle for vaccinia, *ibid.*, **66**: 73, 1937.
Maietta, A. L.: Unusually good results in pollinosis with combined antigen-antihistamine therapy, shortening the treatment of hay fever, *Ann. Allergy*, **7**: 789, 1949.
Mayer, R. L.: The experimental basis of antihistamine therapy, *Intern. Rev. Otolaryngol.*, **11**: 17, 1949.
Mazzini, L. Y.: Mazzini cardiolipin microflocculation test for syphilis, *J. Immunol*, **66**: 261, 1951.
Metschnikoff, E.: «L'Immunité dans les maladies infectieuses», Paris, Masson et Cie., 1901.
Nuttall, G.: Experimente über die bakterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers, *Z. Hyg.*, **4**: 353, 1888.
Oakley, C. L.: The toxins of *Clostridium welchii, Bull. Hyg.*, **18**: 781, 1943.
—, G. H. Warrack y I. Batty: Sites of antibody production, *J. Path. Bact.*, **61**: 179, 1949.
Pangborn, M. C.: A new serologically active phospholipid from beef heart, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **48**: 484, 1941.
Pappenheimer, A. M., y E. D. Hendee: Diphtheria toxin. IV. The iron enzymes of *Corynebacterium diphtheriae* and their possible relation to diphtheria toxin, *J. Biol. Chem.*, **171**: 701, 1947.
Pasteur, L., C. Chamberland, y E. Roux: De l'atenuation des virus et de leur retour à la virulence, *Compt. rend.*, **92**: 429, 1881.
Pauling, Linus: A theory of the structure and process of formation of antibodies, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**: 2643, 1940.
—, Dan H. Campbell, y D. Pressman: The nature of the forces between antigen and antibody and of the precipitation reaction, *Physiol. Rev.*, **23**: 203, 1943.
Pfeiffer, R., y Issaeff: Über die spezifische Bedeutung der Choleraimmunität, *Z. Hyg.*, **17**: 355, 1894*a*.
— y —: Über die Spezifizatät der Choleraimmunisierung, *Deut. med. Wochschr.*, **20**: 305, 1894*b*.
Pillemer, L.: Recent advances in the chemistry of complement, *Chem. Rev.*, **33**: 1, 1943.
—, A. M. Pappenheimer, Jr., D. T. Fraser, y H. S. Lawrence: Section on microbiology, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **24**: 329, 1948.
—, O. D. Ratnoff, L. Blum, y I. H. Lepow: The inactivation of complement and its components by plasmin, *J. Exp. Med.*, **97**: 573, 1953.
—, D. Toll, y S. J. Badger: The immunochemistry of toxins and toxoids. III. The isolation and characterization of diphtherial toxoid, *J. Biol. Chem.*, **170**: 571, 1947.
—, R. G. Wittler, J. I. Burrell, y D. B. Grossberg: The immunochemistry of toxins and toxoids. VI. The crystallization and characterization of tetanal toxin, *J. Exp. Med.*, **88**: 205, 1948.

Pillemer, L., R. G. Wittler, F. L. Clapp, and J. N. Adam, Jr.: Immunochemistry of toxins and toxoids. IV. The preparation of purified diphtherial toxoid for clinical use, *J. Immunol.*, **78**: 223, 1948.
Raynaud, M., y L. Second: Extraction des toxines botuliniques a partir des corps microbiens, *Ann. inst. Pasteur*, **77**: 316, 1949.
Ross, V.: A method for purifying diphtheria toxoid and combining it with protamine, *J. Immunol.*, **63**: 183, 1949.
Surgalla, M. J.: A study of the production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined medium, *J. Infectious Disease*, **81**: 97, 1947.
Turner, A. W., y C. E. Eales: The δ-hemolysin of *Clostridium welchii* type C. I., *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **22**: 215, 1944.
Wittler, R. G., y L. Pillemer: The immunochemistry of toxins and toxoids. V. The solubility of staphylococcal toxin in methanol-water mixtures under controlled conditions of pH, ionic strength, and temperature, *J. Biol. Chem.*, **174**: 23, 1948.
Woiwood, A. J., y F. V. Linggood: Amino-acid constitution of diphtheria toxin and toxoid, *Nature*, **163**: 218, 1949.
Woodward, C. R., Jr., A. W. Tallman, y J. Perrotta: Further observations on the production of diphtheria toxin in shake cultures by *C. diphtheriae*, *Can. J. Pub. Health.*, **42**: 62, 1951.

CAPÍTULO XXVI

ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL HOMBRE

Las enfermedades del hombre y de los animales son producidas no solamente por bacterias, sino también por otras clases de microorganismos, tales como protozoos, levaduras, mohos, virus y rickettsias.

Bacterias. Se han estudiado millares de especies bacterianas, pero es muy reducido el número de las que pueden ocasionar infecciones en el hombre y en los animales; probablemente no exceden mucho de cien especies. Algunos gérmenes son específicos en absoluto, pues sólo atacan a un huésped; otros lo son menos, y son capaces de infectar naturalmente a más de un huésped. La escarlatina no se produce de modo natural más que en el hombre; en cambio, el microbio productor del muermo equino ataca también a cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayos y al hombre. El germen del ántrax es patógeno para el hombre, además de serlo para el ganado vacuno, ovino y caballar.

Protozoos. Son muchas las enfermedades del hombre y los animales producidas por protozoos. Entre ellas se cuentan el paludismo, provocado por *Plasmodium vivax, Pl. malariae* y *Pl. falciparum*; la enfermedad del sueño africana, causada por el *Tripanosoma gambiense* y el *T. rhodesiense*; la disentería amébica, cuyo agente causal es la *Endamoeba histolytica*; el kala-azar, producido por la *Leishmania donovani*, y la esquistosomiasis, causada por no menos de tres especies de *Schistosoma*.

Levaduras. Unas pocas especies de levaduras o microorganismos similares se conocen como parásitos del hombre y los animales. La *Candida albicans* ocasiona generalmente ulceraciones en la boca y la garganta, las cuales se localizan luego en algún órgano interno, como el pulmón, o producen una infección generalizada. Cuando la enfermedad se circunscribe a las membranas mucosas de la boca y la garganta, se conoce por «aftas» o erupción aftosa.

La blastomicosis americana es una infección ulcerativa de la piel y los tejidos subcutáneos causada por el *Blastomyces dermatitidis*, que a veces invade los órganos internos (pulmones, bazo y riñones) y los huesos.

El granuloma coccidioides es obra del microorganismo *Coccidioides*

immitis, semejante a las levaduras. La dolencia se manifiesta en tantas formas que no es posible dar una descripción general de ella. Casi siempre se presentan lesiones bronquiales o pulmonares, y asimismo suele afectar a la piel y los tejidos subyacentes; las lesiones consisten en nódulos firmes o blandos, abscesos, úlceras, infecciones de los senos, etcétera. También pueden ser atacados huesos y articulaciones. Los gérmenes aparecen en los tejidos como células grandes, redondas o esféricas, rodeadas de una gruesa membrana, y por eso se denominan a veces cuerpos de doble contorno; las células mayores contienen esporas, que dejan en libertad al madurar. Cada espora crece hasta alcanzar su tamaño máximo, y el ciclo se repite.

Mohos. Los mohos y los microorganismos similares producen en el hombre varias infecciones muy graves.

Probablemente, los mohos parásitos mejor conocidos son los que producen en la especie humana la dermatofitosis, en la que intervienen diversos géneros y especies. Estos gérmenes dan origen a infecciones superficiales de la epidermis queratinizada, el cabello, sus vainas, las uñas y la piel. Las infecciones por este grupo de mohos se conocen generalmente por tiñas; cuando se limitan a los pies, se denominan «pie de atleta». Los géneros que suelen producir estas enfermedades son principalmente *Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton* y *Achorion*.

El agente causal de la esporotrocosis es el moho *Sporotrichum schenckii*, que origina cuatro tipos de enfermedades humanas: linfangítico, diseminado, localizado y alérgico. El primero se manifiesta por un granuloma cutáneo conocido por chancro esporotricótico, del cual se desarrollan luego en cadena nódulos cutáneos y subcutáneos a lo largo de las vías linfáticas regionales; su curso es benigno. El tipo diseminado ocasiona nódulos subcutáneos a modo de gomas, que se desarrollan en zonas dispersas del cuerpo; los nódulos suelen estallar y ulcerarse, y a veces sobrevienen grandes abscesos. El tipo localizado se encuentra con más frecuencia en las articulaciones, los huesos y las vainas tendinosas. El tipo alérgico se presenta en forma de pápulas cutáneas resultantes de una sensibilización.

BACTERIAS PATÓGENAS PARA EL HOMBRE Y LOS ANIMALES

El número de bacterias patógenas es tan crecido, que rebasa el marco de una obra elemental el ofrecer una exposición detallada de cada dolencia y su agente etiológico específico. Por ello nos limitamos a esbozar las enfermedades más importantes que en el hombre y los animales ocasionan las bacterias. Al final de esta sección se relacionan varios excelentes tratados sobre microorganismos patógenos, para que puedan consultarlos quienes se interesen por más pormenores.

ACTINOMYCES

Los *Actinomyces* son miembros del orden *Actinomicetales*, de características comprendidas entre las de bacterias genuinas y mohos. Producen un verdadero micelio; el micelio vegetativo se divide en elementos de tamaño regular, y pueden presentar ramificación angular. No forman conidios, no resisten a los ácidos y son anaerobios a microaerófilos.

Dos especies identificadas de *Actinomyces* son patógenas para el hombre y los animales. El *A. bovis* es el agente de la actinomicosis bucal bovina, y a veces humana. El *A. israeli* se ha aislado de un caso de tumor retromaxilar y de otro de actinomicosis del pulmón y de la glándula mamaria; aquí sólo se estudia el primero, por ser de mayor importancia.

Actinomyces bovis. Este microorganismo produce un micelio que no tarda en fraccionarse; no es corriente una ramificación extensa. Hifas de menos de 1 μ de diámetro. En el pus, el *A. bovis* se presenta en forma de pequeños cuerpos granulares, de color gris o amarillo pálido, como corpúsculos de azufre, dispuestos en rosetas, con centros opacos densos, compuestos de una tupida red de filamentos. En los cuerpos claviformes característicos se aprecian estriaciones radiales alrededor de los márgenes. No son móviles ni acidorresistentes; anaerobios a microaerófilos, grampositivos.

Enfermedad producida. Ocasionan actinomicosis en el hombre. Es una infección supurativa local o general, aguda o crónica, de los maxilares, los órganos torácicos, el intestino o de la piel, combinada con el desarrollo de tejido conectivo, y que se caracteriza por la presencia de colonias de *A. bovis* en las lesiones. El microorganismo se puede identificar por examen microscópico de excreciones de las lesiones.

Focos de infección. No se conocen, pero se cree que sean granos, hierbas aire, saliva, pus y excreciones nasales.

Modo de transmisión. En el ganado vacuno, principalmente por granos, hierbas y otros forrajes, camas de establo contaminadas con descargas de lesiones; los gérmenes irrumpen a través de erosiones o heridas de la cavidad bucal y la superficie del cuerpo. La enfermedad se puede transmitir de los animales al hombre, pero sólo excepcionalmente y por vía indirecta, mediante infección de heridas cutáneas por substancias contaminadas.

Período de incubación. Variable.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad es general en el hombre y los animales. El restablecimiento no va seguido de inmunidad adquirida, y la inmunidad artificial no es factible.

Frecuencia. No es frecuente en la especie humana.

Prevención y tratamiento. Higiene de la cavidad bucal. Inspección de la carne y exclusión de las reses infectadas. Destrucción de focos infecciosos. Desinfección de derrames de lesiones; abstención de todo contacto con éstas. No se conoce tratamiento específico.

BACILLUS

El germen del ántrax pertenece al género *Bacillus*, cuyos miembros tienen la facultad de formar esporas termorresistentes. Casi todas las especies toman el gram. Con excepción del bacilo del ántrax, todos los miembros son saprófitos, y generalmente no patógenos. Se sabe que el *B. subtilis* se vuelve patógeno a veces, pero esto es más bien excepcional. Estos bacilos son típicamente aerobios, pero algunos pueden desarrollarse en ausencia total de oxígeno.

No producen esporas en condiciones anaeróbicas; en cambio, las especies anaerobias esporíparas forman esporas en ambiente anaeróbico, y esto sirve para distinguir las formas esporógenas aerobias de las anaerobias. Aplicando calor a un cultivo mixto se destruyen las células vegetativas, y quedan sólo las esporas anaeróbicas, capaces de germinar y convertirse en células vegetativas en condiciones favorables.

Los miembros del género *Bacillus* están universalmente difundidos en el suelo y el agua. Las esporas y las células vegetativas de tales especies son fácilmente arrastradas al aire por débiles corrientes. Esto explica por qué hay esporas viables de tales microorganismos en todo el aire, y causan muchas contaminaciones de medios nutritivos y cultivos en los laboratorios.

El género *Bacillus* comprende treinta y tres especies reconocidas. Varios centenares más no se han clasificado aún. Algunas de las especies mejor estudiadas, aparte el *B. anthracis*, son *B. subtilis, B. cereus, B. polymyxa y B. megatherium.*

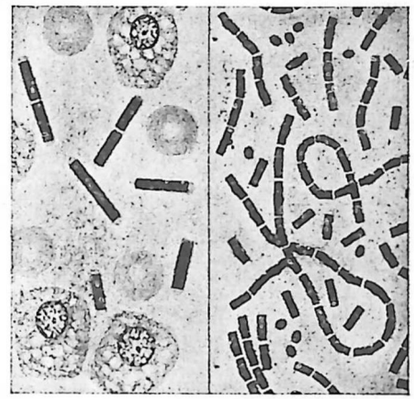


Fig. 218. — *Bacillus anthracis.* Izquierda, frotis del hígado de un cobayo inoculado experimentalmente; derecha, frotis de un cultivo de 72 horas en agar inclinado. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Bacillus anthracis. Células bacilares, de 1 a 1,3 por 3 a 10 μ, con extremos cuadrados o cóncavos, dispuestas en largas cadenas. Esporas elipsoidales de 0,8 a 1 por 1,3 a 1,5 μ, centrales o paracentrales, a menudo en cadenas; no ocasionan bultos en la célula, y se forman sólo en ambiente aeróbico. No se producen en el organismo animal. Germinación polar; móviles, grampositivas.

Enfermedad producida. Dan origen al carbunco, afección específica aguda del ganado vacuno, ovino y de cerda, y que a veces se presenta en el personal que maneja lana y pieles de animales enfermos (fig. 218). Habitualmente sobreviene como enfermedad febril de los animales, con curso rápido que termina en septicemia. El coeficiente de mortalidad puede llegar a 80 %. La infección ocasiona una pronunciada hipertrofia del bazo, donde a veces se encuentran bacilos en enorme número.

En el hombre se conocen dos formas: cutánea (pústula maligna) y ántrax interno. El ántrax cutáneo proviene de inoculación directa a través de una cortadura o erosión de la piel; este tipo alcanza su máxima frecuencia en personas que trabajan con ganado, y se caracteriza por la aparición de un pequeño furúnculo al cabo de 12 a 24 horas de la penetración de los gérmenes. El furúnculo se ulcera y vierte un exudado seropurulento, que puede remitir y desaparecer, o bien sobreviene gangrena, seguida de septicemia; ésta suele terminar fatalmente en unos cinco días.

El tipo interno o pulmonar se contrae por inhalación o deglución de esporas de *B. anthracis.* Se caracteriza por una neumonía de desenlace generalmente infausto. Antes de la muerte es posible aislar el microorganismo del esputo, y también se obtiene de la sangre y del líquido cefalorraquídeo.

Diagnóstico. En la pústula maligna se pueden preparar extensiones del exudado seropurulento, las cuales se tiñen con colorante de Gram. La pre-

sencia de gérmenes grandes, grampositivos, encapsulados y sin esporas es señalada prueba de que se trata del *B. anthracis*, y se puede confirmar mediante inoculación a cobayos; estos animales mueren de septicemia al cabo de doce horas a tres días.

En el tipo neumónico se examinan esputos y sangre por el método de Gram. Pueden prepararse cultivos sembrando sangre en caldo y buscando gérmenes característicos tras un período de incubación de veinticuatro horas. Se puede hacer un ensayo de confirmación inoculando a cobayos, como en el caso anterior.

Focos de infección. Pelos, pieles, lana, carne y heces de animales infectados y de sus productos manufacturados.

Modo de transmisión. Inhalación de esporas, ingestión de carne insuficientemente cocinada; mecánicamente, por mediación de moscas; inoculación accidental por heridas o arañazos.

Período de incubación. No más de siete días, generalmente menos de cuatro. En casos pulmonares puede no durar más de veinticuatro horas.

Sensibilidad e inmunidad. El hombre es menos sensible a la enfermedad que los animales herbívoros, pero más que los carnívoros. Puede desarrollarse inmunidad después del restablecimiento. Se proporciona inmunidad artificial a los animales por medio de una vacuna, que no es aplicable a seres humanos.

Frecuencia. Es insólita en la especie humana y va asociada a la frecuencia del mal en animales, o a la manipulación de pieles, pelos y otros productos de reses infectadas. Se presentan epizootias en el ganado vacuno y el ovino.

Prevención y tratamiento. Destrucción de los animales notoriamente atacados; los amenazados deben inmunizarse con vacuna. No debe consumirse la leche procedente de reses infectadas. Desinfección de derrames de lesiones y de artículos contaminados por ellos, así como de pelos, lana y cerdas de focos que no se consideren exentos de carbunco. Las personas que manejen pieles, lana o pelo deben comunicar en el acto cualquier erosión cutánea. Ha ocasionado infecciones el uso de brochas de afeitar y cepillos de dientes fabricados con cerdas no esterilizadas. Las esporas, muy resistentes, se destruyen en el autoclave a temperaturas superiores a 120° C.

Aislamiento de personas infectadas hasta que curen las lesiones. Desinfección de derrames de lesiones y artículos contaminados por ellos. La enfermedad se puede tratar con antibióticos adecuados.

BORRELIA

Los miembros de este género se clasifican dentro del orden *Espiroquetales*, de características comprendidas entre las bacterias genuinas y los protozoos. Estos microorganismos son filamentos espirales pequeños, flexibles, que miden 8 a 16 μ de longitud, algunos con ángulos obtusos. Parásitos en muchas formas de vida animal; algunos son patógenos para el hombre y otros para animales y aves. Generalmente hematófitos, y se encuentran en membranas mucosas; algunos se transmiten por mordeduras de artrópodos.

Borrellia duttoni. Células espirales de 0,35 a 0,5 por 8 a 16 μ, con extremos apuntados; amplitud de las espiras, 1,5 μ. Espirales largas, onduladas, inconstantes, en número aproximado de cinco, con filamentos terminales en espiral fina. Movimiento activo a modo de sacacorchos, sin polaridad; gramnegativas.

Enfermedad producida. Son causa de la fiebre recurrente de África Central y Meridional (fig. 219). Patógenos para ratones y ratas.

La enfermedad se caracteriza por paroxismos febriles cortos, que duran dos o tres días, y alternan con períodos afebriles de tres o cuatro días. Erupción generalizada; promedio de recidivas, 6 a 7.

Diagnóstico. Por demostración del microorganismo en extensiones de sangre extraída en el curso del segundo ataque de fiebre, o de sangre de ratones o ratas previamente inoculados con la del paciente.

Focos de infección. Una infección de roedores salvajes, transmitida por garrapatas del género *Ornithodorus*. En Tejas y Kansas, el vector es el *O. turicata*; en California, Colorado e Idaho, el *O. hermsi*; en Montana, el *O. parkeri*; en Panamá y América Central y Meridional, el *O. talaje*; y en África tropical, el *O. moubata*.

Modo de transmisión. La enfermedad se transmite por mordedura de una garrapata.

Período de incubación. De tres a seis días; a veces dos días, o hasta doce.

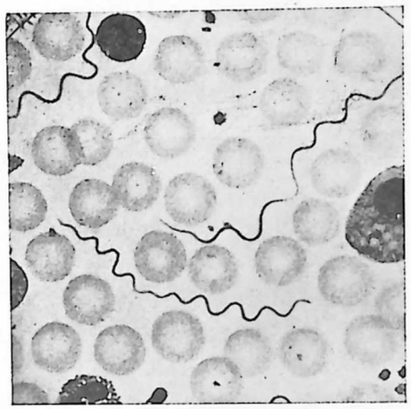


Fig. 219. — *Borrelia duttoni.* Frotis de sangre de un caso de fiebre recurrente centroafricana. A veces se denomina fiebre de las garrapatas africanas. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad es general. Inmunidad activa durante el curso de la dolencia, que domina la infección sanguínea y hace desaparecer los espiroquetas de la circulación. La inmunidad no dura probablemente más de dos años a partir del restablecimiento.

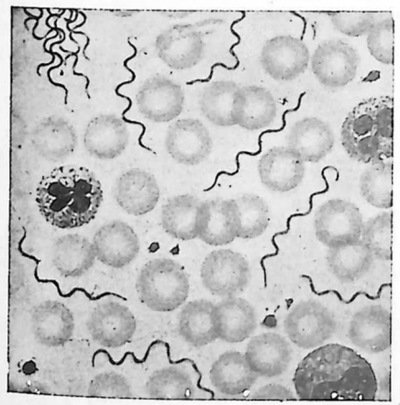


Fig. 220. — *Borrelia recurrentis.* Frotis de sangre de un enfermo de fiebre recurrente europea. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Frecuencia. Difundida por todo el África tropical. Se ha observado también en España, Sudáfrica, Arabia, Irán, India y otras partes de Asia Central, América del Norte y del Sur. En los Estados Unidos se han comunicado casos de 13 estados muy distantes entre sí.

Prevención y tratamiento. Evitar las comarcas infestadas de garrapatas, que pueden vivir y mantenerse infecciosas durante años enteros. Empleo de un producto repelente, o de pantalones y medias.

La enfermedad se cura inyectando salvarsán o tartrato de bismuto sódico-potásico.

Borrelia recurrentis. Microorganismos cilíndricos o ligeramente aplanados, de 0,35 a 0,5 por 8 a 16 μ, con extremos apuntados; amplitud de las espiras, 1,5 μ. Espirales grandes, onduladas, inconstantes, en número de cinco,

con filamentos terminales en espiras finas. Movimiento helicoidal, sin polaridad; no temen el gram.

Enfermedad producida. Es causa de la fiebre recurrente europea, transmisible a monos, ratones y ratas (fig. 220).

La afección se caracteriza por breves accesos de fiebre, que duran dos a tres días, alternando con períodos afebriles de tres o cuatro días. Erupción generalizada; una a diez recidivas, generalmente no más de dos. Duración de la dolencia, 13 a 16 días.

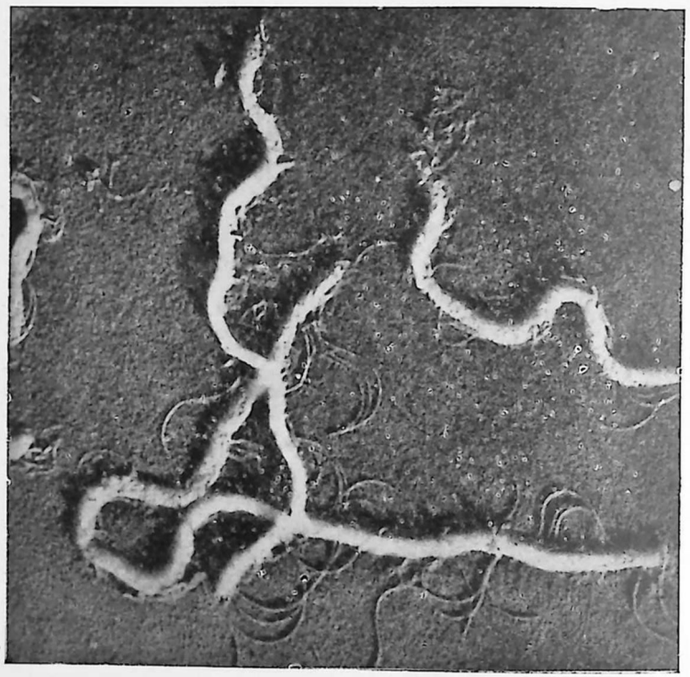


Fig. 221. — Micrografía electrónica de *Borrelia vincentii*, 1:11.000 (Según Hampp, Scott y Wyckoff.)

Diagnóstico. Se establece demostrando la presencia de gérmenes en preparaciones de sangre fresca, sobre campo oscuro, o inoculando a ratas 15 a 25 mm de sangre del paciente.

Focos de infección. No se conoce el origen natural de la infección. Los piojos se vuelven infecciosos en unos 16 días después de haber picado a una persona infectada, y permanecen así toda su vida.

Modo de transmisión. Probablemente por picadura de un piojo y penetración de sus excrementos en la erosión de la piel.

Período de incubación. Habitualmente siete días y hasta doce.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad es general. Se produce inmunidad activa en el curso de la afección; después del restablecimiento no persiste probablemente más de dos años.

Frecuencia. La enfermedad es corriente en pueblos primitivos infestados de piojos. Se encuentra en partes de Europa, Asia, África del Norte y del Sur y América Central. No se ha observado en Estados Unidos.

Prevención y tratamiento. Aplicación de insecticida, a intervalos adecuados, a gentes que vivan en condiciones miserables, antihigiénicas. Mejora de las condiciones de vida, con baños frecuentes y lavados de ropas.

Despiojamiento de las ropas del enfermo y del dormitorio. Aplicación de insecticida a todas las personas que rodean a individuos infectados.

Borrelia vincentii. Los gérmenes miden 0,3 × 8 a 12 μ, con tres a ocho espiras poco amplias; gramnegativos.

Las células se pueden cultivar en condiciones anaeróbicas; a veces, formas largas con un simple movimiento de torsión (fig. 221).

Enfermedad producida. La *B. vincentii* se presenta asociada al *Fusobacterium plauti-vincentii* en la angina de Vincent, infección aguda de las amígdalas o tejidos adyacentes, y se caracteriza por la presencia de una inflamación seudomembranosa seguida de úlceración. Se denomina también angina ulceromembranosa y enfermedad de Vincent («trench mouth») (fig. 222). Puede interesar los pulmones y entonces el paciente presenta a veces el cuadro clínico y anatómico de la gangrena pulmonar, el absceso pulmonar o la bronquiectasia.

Las células de *F. plauti-vincentii* son bacilares, y se presentan apareadas, en cadenas cortas y curvas, o en largos filamentos espirilares, de 0,5 a 1 por 8 a 16 μ; las apareadas se aproximan por los extremos romos, y tienen los terminales apuntados. Los bacilos tienen dos a seis gránulos que se tiñen intensamente. Son anaerobios, inmóviles, y no toman el gram.

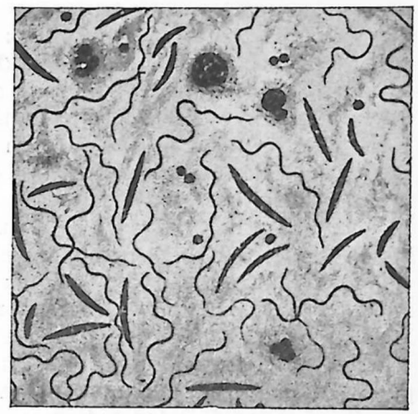


Fig. 222. — *Borrelia vincentii* y *Fusobacterium plauti-vincentii* desarrollados en asociación. Frotis preparado, con ayuda de una torunda, de la faringe de un enfermo de angina de Vincent. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Diagnóstico. La afección se puede diagnosticar preparando extensiones directamente de las zonas ulceradas más profundas y examinándolas con objetivo de inmersión en aceite. Un frotis característico muestra espiroquetas y bacilos en crecido número.

Focos de infección. Depósitos en los dientes y en la cavidad bucal.

Modo de transmisión. La afección no suele ser comunicable. En condiciones singulares de aglomeración, como se presentan a veces entre soldados, puede hacerse transmisible. Parece estar asociada a un estado de resistencia atenuada. La ulceración tonsilar es frecuente en individuos con resistencia disminuida por afecciones tales como sarampión, tuberculosis, diabetes y escarlatina.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. El restablecimiento no va seguido de inmunidad adquirida.

Prevención y tratamiento. Las lesiones locales suelen curarse tratándolas con arsenicales o penicilina. La neoarsfenamina, la sulfarsfenamina y el Bismarsén sirven para curar la infección pulmonar, si se administran durante los primeros días de la enfermedad, antes de iniciarse la necrosis. También responden al tratamiento con penicilina las úlceras tropicales primarias ocasionadas por estos microorganismos simbióticos.

Véase más información en Dean y Singleton (1945).

BRUCELLA

Este género comprende varias especies patógenas pequeñas que provocan aborto en animales y fiebre de Malta u ondulante en el hombre. Invaden los tejidos animales y producen infecciones en el aparato genital, la glándula mamaria o los tejidos linfáticos, y en el conducto intestinal. El género *Brucella* debe su nombre a *Bruce* (1887) el primer investigador que aisló el germen del bazo de personas que habían muerto de la enfermedad en la isla mediterránea de Malta.

Brucella abortus. Las células son bacilos elipsoidales cortos, sueltos, en parejas y a veces en cadenas, de 0,3 a 0,4 μ de longitud. Necesitan para su aislamiento dióxido de carbono al 10 %; se vuelven aeróbicos tras varios pases. Son inmóviles y gramnegativos.

Enfermedad producida. Causa del aborto contagioso en el ganado vacuno, y también en yeguas, ovejas, conejas y cobayas. En el hombre originan fiebre ondulante o brucelosis.

La fiebre ondulante es una infección general de comienzo paulatino o insidioso, y se caracteriza por fiebre irregular, generalmente prolongada, con sudores, escalofríos y dolores en articulaciones y músculos. De ordinario, sigue a un largo período febril, que remite por lisis. En Norteamérica los lapsos febriles no son corrientes.

Diagnóstico. Como la brucelosis suele ir acompañada de septicemia, se puede diagnosticar generalmente a base de un cultivo de sangre.

En el suero de estos enfermos existen aglutininas y anticuerpos fijadores del complemento. Si el cultivo de sangre es negativo, conviene en general investigar aglutininas en el suero del paciente; un índice de aglutinación de 1:500 o más es indicio positivo de fiebre ondulante.

Focos de infección. Tejidos, sangre, leche y orina de animales infectados, especialmente cabras, cerdos y ganado vacuno. Son muy corrientes las infecciones de laboratorio.

Modo de transmisión. Ingestión de leche de animales infectados y contacto directo con ellos o sus productos.

Período de incubación. De seis a treinta días o más, habitualmente catorce días.

Sensibilidad e inmunidad. La mayoría de las personas tienen cierta inmunidad natural, o han adquirido inmunidad parcial por ingestión de pequeñas dosis del germen. Un ataque de fiebre ondulante suele preservar de un segundo ataque.

Frecuencia. Más corriente en el sexo masculino que en el femenino, sobre todo en personas que manipulan leche, andan entre vacas, cerdos, cabras, o consumen leche cruda de vacas y cabras. Se presenta en todo el territorio de Estados Unidos y Canadá, y afecta a individuos de todas las razas. Las infecciones por *Brucella suis* menudean más en el Oeste Medio; son más frecuentes de mayo a octubre.

Prevención y tratamiento. Debe concretarse el origen de la infección. Pasteurización de toda la leche procedente de vacas y cabras; puede ser más factible hervirla. Los animales deben someterse a la prueba de aglutinación, a fin de apartar o sacrificar los que den reacción positiva. Información al público y a matarifes y carniceros acerca de la índole de la dolencia y del modo de transmisión; vacunación de terneras; cuidado en el manejo y eliminación de derrames y fetos de abortos animales; inspección de todas las carnes, en particular de la de cerdo y sus productos.

Reconocimiento precoz de la enfermedad; desinfección de las excreciones orgánicas. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia facultativa, abreviará el curso de la enfermedad. No suele tener desenlace fatal.

Brucella melitensis. Bacilos elipsoidales de 0,3 a 0,4 μ de longitud, sueltos o apareados, raramente en cadenas cortas (fig. 223). Inmóviles, gramnegativos, no acidorresistentes.

Enfermedad producida. Son causa de la fiebre ondulante (brucelosis) en el hombre, y de aborto en la cabra. Pueden infectar a cerdas y vacas y ser eliminados con su leche. Infecciosos para todos los animales domésticos.

La fiebre ondulante es una infección generalizada, de comienzo gradual o insidioso, y se caracteriza por fiebre irregular, generalmente prolongada, con sudores, escalofríos y dolores en articulaciones y músculos.

Diagnóstico. Como la brucelosis va acompañada generalmente de septicemia, el diagnóstico se puede hacer de ordinario a base de un cultivo de sangre. Éste es positivo en un 80 % de los casos después del segundo día, y la infección continúa a veces en la forma septicémica durante varios meses.

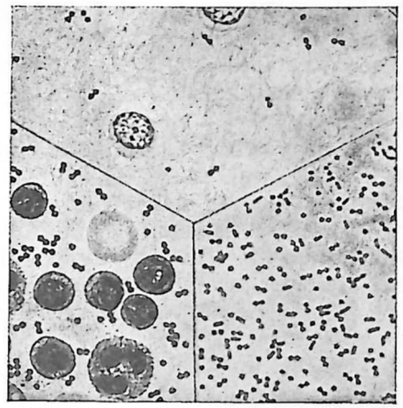


Fig. 223. — *Brucella melitensis.* Arriba, frotis de leche de una cabra infectada; izquierda, abajo, frotis de bazo de un caso de fiebre de Malta; derecha, abajo, frotis preparado de un cultivo reciente. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

En el suero de los pacientes se encuentran aglutininas y anticuerpos fijadores del complemento. Si el cultivo de sangre es negativo, conviene en general investigar la presencia de aglutininas en el suero, donde aparecen hacia el décimo día de fiebre. Un índice de aglutinación de 1:100 ó mayor es signo positivo de fiebre ondulante. Como el antisuero del B. *melitensis* produce interaglutinación con *B. abortus* y *B. suis*, el diagnóstico requiere reacciones de absorción de aglutininas.

Focos de infección. Tejidos, sangre, leche y orina de cabras infectadas. La enfermedad se propaga al hombre por la leche de estos animales; tanto en cabras como en la especie humana es una septicemia. Son muy corrientes las infecciones de laboratorio.

Modo de transmisión. Ingestión de leche de animales infectados y contacto directo con ellos o sus productos.

Período de incubación. De seis a treinta días o más, habitualmente catorce días.

Sensibilidad e inmunidad. La mayoría de las personas poseen cierta inmunidad natural, o han adquirido inmunidad parcial por ingestión de pequeñas dosis del microbio. No se conoce la duración de la inmunidad. Un ataque de fiebre ondulante suele preservar de un segundo acceso.

Frecuencia. Es más corriente en varones que en mujeres, particularmente en personas que manipulan leche o andan entre vacas, cerdos, cabras o consumen leche cruda de vacas o cabras. Se presenta en Estados Unidos y Canadá, y afecta a personas de todas las razas; es más frecuente de mayo a octubre.

Prevención y tratamiento. Hay que averiguar el origen de la infección. Pasteurización de todos los productos lácteos de vacas y cabras; puede ser más factible hervir la leche. Hay que examinar los animales por el método de aglutinación y separar o sacrificar los que den reacción positiva. Instrucción del público y de los traficantes de carne acerca de la índole de la enfermedad y el modo de transmisión; vacunación de animales y esmero en el manejo y eliminación de excreciones y fetos de abortos animales. Inspección de todas las carnes, especialmente de la de cerdo y sus productos.

Reconocimiento precoz de la enfermedad. Desinfección de excreciones orgánicas. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, abreviará el curso de la dolencia, que raramente es fatal.

Brucella suis. Bacilos elipsoidales, de 0,3 a 0,4 μ de longitud, sueltos o apareados, rara vez en cadenas cortas; no móviles, ni acidorresistentes; gramnegativos.

Enfermedad producida. Es causa de la fiebre ondulante (brucelosis) en el hombre, y de aborto en marranas. Puede infectar a vacas y cabras, y ser eliminado con su leche; infeccioso para todos los animales domésticos.

La fiebre ondulante es una infección generalizada, de comienzo gradual o insidioso, y se caracteriza por fiebre irregular, generalmente prolongada, con sudores, escalofríos y dolores en articulaciones y músculos.

Diagnóstico. Como la brucelosis suele ir acompañada de septicemia, puede diagnosticarse generalmente a base de un cultivo de sangre, que resulta positivo en un 80 % de los casos después del segundo día; la infección continúa en la forma septicémica por espacio de varios meses.

En el suero de los pacientes existen aglutininas y anticuerpos fijadores del complemento. Si el cultivo de sangre es negativo conviene generalmente investigar aglutininas en el suero, donde suelen aparecer hacia el décimo día de fiebre. Un índice de aglutinación de 1:100 o mayor es signo positivo de fiebre ondulante. Dado que el antisuero del *B. suis* produce interaglutinación con *B. melitensis* y *B. abortus*, el diagnóstico requiere pruebas de absorción de aglutininas.

Focos de infección. Tejidos, sangre, leche y orina de animales infectados. La enfermedad se propaga al hombre por medio de la leche de esos animales; en cerdos y en la especie humana es una septicemia. Son muy corrientes las infecciones de laboratorio.

Modo de transmisión. Ingestión de leche de animales infectados, y contacto directo con éstos o con sus productos.

Período de incubación. De seis a treinta días, o más; generalmente, catorce días.

Sensibilidad e inmunidad. La mayoría de las personas presentan cierta inmunidad natural o han adquirido inmunidad parcial por ingestión de pequeñas dosis del microorganismo. No se conoce la duración de la inmunidad. Un ataque de fiebre ondulante suele proteger contra un segundo acceso.

Frecuencia. Es más corriente en el sexo masculino que en el femenino, sobre todo en personas que manipulan leche, andan entre vacas, cerdos y cabras, o consumen leche cruda de vacas o cabras. Se presenta en todo el territorio de Estados Unidos y Canadá, y afecta a personas de todas las razas. Es más frecuente de mayo a octubre.

Prevención y tratamiento. Hay que averiguar el origen de la infección. Pasteurización de todos los productos lácteos; puede ser más factible hervir la leche. Hay que examinar los animales por el método de la aglutinación y separar o sacrificar los que den reacción positiva. Instrucción del público y de los traficantes en carnes acerca de la índole de la dolencia y el modo de transmisión. Vacunación de los animales. Cuidado al manejar y eliminar excreciones y fetos de animales que aborten. Inspección de todas las carnes, especialmente de la de puerco y sus productos.

Diagnóstico precoz de la enfermedad. Desinfección de excreciones orgánicas. El empleo de un antibiótico adecuado bajo vigilancia facultativa abreviará el curso de la enfermedad, que no suele tener desenlace fatal.

Véase más información sobre *Brucella* en Culbertson (1949), Huddleson (1947, 1950), Prior (1949), Ralston y Payne (1950).

CLOSTRIDIUM

Estos microorganismos son bacilares, con frecuencia agrandados al esporular, y producen formas clostrídeas y plectrídeas. Las células no contienen catalasa; son anaerobias o microaerófilas, y poseen una gran actividad bioquímica. Muchas especies fermentan carbohidratos, con producción de diversos ácidos, a menudo el butírico, y gases (CO_2,H_2, y a veces CH_4); otras provocan una rápida putrefacción de proteínas, y desprenden olores desagradables. Se encuentran comúnmente en el suelo y en heces humanas o animales. Algunas especies, cuando se desarrollan como saprófitas en substancias vegetales en descomposición o en tejidos muertos dentro de un huésped animal, forman diversos cuerpos tóxicos y líticos, y son por ello patógenas.

Clostridium botulinum (tipo C). El *Cl. botulinum* comprende varias especies tóxicas, convenientemente divididas en un grupo no ovolítico (*Cl. botulinum*) y otro ovolítico (*Cl. parabotulinum*).

Células bacilares de extremos redondeados, que miden 0,5 a 0,8 por 3,8 μ, y se presentan sueltas, apareadas o en cadenas cortas, a veces largas; móviles, con flagelos peritricales. Esporas ovales, en posesión central, terminal o subterminal. No toman el gram.

Enfermedad producida. Es causa del botulismo en el hombre y de laxitud del cuello en el pollo; patógeno para monos, conejos, cobayos, gatos y otros animales. Produce una potente exotoxina, neurotóxica, en inyección y por vía alimenticia.

Los síntomas se desarrollan súbitamente, con dolores gastrointestinales, cefalalgias, diarrea o estreñimiento, postración, varios tipos de parálisis del sistema nervioso central, motivados por la toxina neurotrópica extracelular. La muerte sobreviene por parálisis cardíaca o respiratoria, generalmente en tres a siete días. La gravedad de los síntomas depende de la cantidad de toxina ingerida en proporción al peso corporal.

Diagnóstico. Por reacciones biológicas o toxicológicas se puede comprobar la presencia del germen o de su toxina en los alimentos sospechosos.

Focos de infección. Alimentos ahumados o en adobo o conserva contaminados, cuando la preparación es defectuosa (pág. 638). La toxina sólo se produce en condiciones anaeróbicas; se destruye fácilmente por ebullición, pero las esporas sólo se inactivan a temperaturas de autoclave.

Modo de transmisión. Consumo de alimentos ahumados, salados o en conserva, que contengan la exotoxina procedente de envases mal elaborados. La mayoría de las intoxicaciones provienen del consumo de conservas caseras.

Período de incubación. Por lo general, dieciocho horas después de ingerir alimentos contaminados; a veces, más largo, según la cantidad de alimento consumido y su proporción de toxina.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la toxina es general. La inmunidad pasiva con antitoxina inespecífica es provechosa antes de aparecer los síntomas.

Frecuencia. Casos esporádicos en todos los países, habitualmente a causa de conservas caseras.

Prevención y tratamiento. Inspección de la elaboración comercial de alimentos enlatados y en conserva. Instrucción de las amas de casa en cuanto a métodos de elaboración adecuada de conservas caseras. Como la toxina se destruye por ebullición, los alimentos enlatados en casa deben hervirse antes de servirlos.

La antitoxina polivalente específica neutraliza la toxina y es útil antes de desarrollarse los síntomas de la enfermedad.



Fig. 224. — *Clostridium perfringens.* Arriba: frotis del exudado de un caso de grangena gaseosa. Izquierda, abajo: frotis de un cultivo reciente en agar. Derecha, abajo: otro frotis de un caso de gangrena gaseosa. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Clostridium histolyticum. Células bacilares, sueltas o en parejas de 0,5 a 0,7 por 3 a 5 μ. Esporas ovales, subterminales, que producen abultamientos en los bacilos. Móviles, con flagelos peritricales; anaerobios, grampositivos.

Enfermedad producida. Aisladas al principio de heridas de guerra. Al parecer, muy difundidas, pero bastante diseminadas en el suelo. Activamente proteolíticas; producen necrosis del tejido muscular, por elaboración de una exotoxina citolítica. La inyección intramuscular de pequeñas dosis de cultivo a cobayos provoca una digestión rápida de tejido muscular. No son tóxicos por vía alimenticia; patógenos para animales pequeños de laboratorio.

Focos de infección. Estos microbios se encuentran en el suelo.

Modo de transmisión. La enfermedad sobreviene al penetrar el microorganismo en la piel lacerada, donde se multiplica y produce una toxina citolítica extracelular.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la toxina es general. La exotoxina se puede neutralizar mediante inyección de antitoxina homóloga.

Clostridium perfringens. Células bacilares, cortas y gruesas de 1 a 1,5 por 4 a 8 μ, sueltas, apareadas y menos frecuentemente en cadenas; anaerobias, inmóviles, grampositivas. Esporas ovales, de posición central a excéntrica, que no ocasionan abultamientos en los bacilos; forman cápsulas.

Se han identificado cuatro tipos, I, II, III y IV, a base de reacciones de fermentación. La antitoxina de cualquiera de los tipos neutraliza la toxina de los otros.

Enfermedad producida. Se ha aislado de heridas. Este anaerobio es la causa más frecuente de gangrena gaseosa en el hombre (fig. 224); produce extensas necrosis y abundantes gases en los tejidos. Las burbujas gaseosas dilatan los tejidos y originan presión, que interrumpe la afluencia de sangre, con la consiguiente mortificación. Los microbios se pueden recuperar de la sangre, del hígado y del corazón.

El *Cl. perfringens* produce una potente exotoxina, que se puede obtener natural filtrando un cultivo de los gérmenes. Esta exotoxina contribuye a debilitar al paciente. La inyección de filtrados de cultivos a animales desarrolla una antitoxina enérgica.

Focos de infección. Suelo, polvo de las calles, leche, heces humanas y animales.

Modo de transmisión. Penetración del germen en la piel lacerada o en heridas, donde se reproduce y segrega una potente exotoxina.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. La inmunidad pasiva mediante antitoxina puede servir como profilaxis.

Prevención y tratamiento. Se han utilizado sueros antitóxicos a título profiláctico y terapéutico, y se conocen algunos resultados satisfactorios.

Véase más información en Fredette y Frappier (1946), y Smith (1949).



Fig. 225. — *Clostridium tetani.* Extensión de un cultivo de 72 horas por picadura en agar glucosado. Las esporas, redondas, están situadas en un extremo de los bacilos. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Clostridium tetani. Células bacilares con extremos redondeados, de 0,4 a 0,6 por 4 a 8 μ, sueltas, apareadas y a menudo en largas cadenas y filamentos; móviles, con flagelos peritricales; anaerobias, grampositivas. Esporas esféricas, terminales, que originan bultos en los bacilos.

Enfermedad producida. Es causa del tétanos en el hombre (fig. 225). El microorganismo produce dos clases de toxinas: tetanospasmina, que ocasiona los síntomas del tétanos, y tetanolisina, que hemoliza los eritrocitos de caballos, conejos, cabras y otros animales.

La tetanospasmina es una toxina extracelular, y se puede obtener natural filtrando un cultivo de los gérmenes. La inoculación de filtrados de cultivos a caballos y otros animales desarrolla una antitoxina enérgica.

La enfermedad se caracteriza por cefalalgias, disfagia y apertura de la boca por espasmo de los maseteros; a esto se asocia una ligera rigidez del cuello, y espasmo de los músculos buccinadores; los espasmos pueden propagarse al tronco y a la espalda. La deglución se hace cada vez más difícil. Los gérmenes no invaden casi nunca los tejidos, sino que permanecen localizados en la herida, de donde segregan una potente toxina, tetanolisina.

Diagnóstico. La enfermedad se diagnostica preparando frotis de materiales infectados, tiñéndolos con colorante de Gram, y examinándolos al microscopio en busca de células típicas con esporas.

Focos de infección. Suelo, polvo de las calles, heces humanas y animales, éstas sobre todo.

Modo de transmisión. La enfermedad se origina al penetrar el germen en la piel lacerada o en heridas, donde se multiplica y segrega una potente exotoxina, intensamente tóxica en inyección, pero no por vía alimenticia.

Período de incubación. Los síntomas se desarrollan después de haber alcanzado la toxina el sistema nervioso central. Esto puede tardar cuatro días a cinco semanas, según el carácter, la extensión y la localización de la herida.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad es general. Puede obtenerse inmunidad artificial activa empleando toxoide tetánico (pág. 711). Se administran, por lo general, tres dosis de 1 mg, a intervalos de tres semanas, y se consideran suficientes para conseguir una concentración elevada de anticuerpos antitóxicos. Se afirma que la inmunidad dura hasta unos cinco años. Según informes, el toxoide precipitado con alumbre y aplicado en dos inyecciones de 1 mg, a intervalos de dos a cuatro semanas, proporciona una inmunidad mayor y más rápida que el toxoide simple.

Frecuencia. La distribución es cosmopolita. Muy frecuente en Norteamérica entre varones jóvenes y en los meses de estío. Es corriente sobre todo en heridas contaminadas con tierra fértil o abonada.

Prevención y tratamiento. Conviene la inmunización activa con toxoide de quienes estén expuestos a la infección, y también se aconseja en lactantes y niños pequeños.

El empleo de antitoxina tetánica constituye una protección eficaz contra la afección. El tétanos se previene inyectando unas 1500 unidades EUA de antitoxina en heridas leves, y unas 2000 a 3000 unidades EUA en las graves. Como la antitoxina tiende a desaparecer, debe aplicarse otra inyección complementaria dentro de diez días.

Una vez desarrollada la enfermedad, se inyectan dosis grandes de antitoxina mediante punción raquídea, y al mismo tiempo debe administrarse una inyección intravenosa de unas 10000 unidades. La inyección intrarraquídea se repetirá cada veinticuatro horas, hasta tres veces; si no es posible utilizar esta vía, hay que aplicar inyecciones intravenosas mayores.

CORYNEBACTERIUM

Los miembros de este género son bacilos delgados, rectos a ligeramente curvos, con segmentos o gránulos irregularmente teñidos. Con frecuencia presentan dilataciones en punta o maza en los extremos. Por dehiscencia se disponen las células en ángulo o en empalizada (estacada). Grampositivos a variables; a veces se encuentran células jóvenes, y hasta viejas, gramnegativas, pero los gránulos son siempre grampositivos. Por lo general son aerobios estrictos, aunque se ven algunas especies microaerófilas e incluso anaerobias. Ciertas especies patógenas producen una fuerte exotoxina. El grupo se halla ampliamente difundido en la Naturaleza. Las especies mejor conocidas son parásitas y patógenas del hombre y los animales domésticos; algunas son notoriamente patógenas de plantas, y otras también comunes se encuentran en productos lácteos y en el agua y el suelo.

Corynebacterium diphtheriae. Las células son bacilares, de tamaño muy variable, 0,3 a 0,8 por 1 a 8 μ, y se presentan sueltas. Bacilos rectos o algo curvos, con frecuencia mazudos por uno o por los dos extremos. La división por dehiscencia dispone las células en ángulo y empalizada (estacada). En los bacilos teñidos se advierte la presencia de corpúsculos metacromáticos. Inmóviles, grampositivos. Las células están muchas veces vacuoladas o segmentadas, lo que da a los bacilos aspecto listado (figs. 226 y 227).

Enfermedad producida. Es causa de la difteria en la especie humana; patógenos para cobayos, gatitos y conejos. El microorganismo se localiza en la garganta, donde segrega una fuerte toxina extracelular, que irrumpe en la circulación sanguínea y puede ocasionar la muerte si no se neutraliza mediante anticuerpos conocidos como antitoxinas.

La difteria es una infección febril aguda, generalmente de nariz, garganta y amígdalas. El cuello se inflama considerablemente, y en la parte

anterior de la faringe, sobre todo, se forma una seudomembrana grisácea, que al final puede propagarse a todo el conducto respiratorio. La acción tóxica del microbio destruye la capa superficial de células; a continuación rezuma un humor semejante al plasma, que se coagula y cubre la superficie de la membrana mucosa lastimada con una recia red elástica de fibrina, incrustada de bacterias y células muertas. La toxina elaborada por los gérmenes ejerce una acción nociva sobre los riñones y los músculos cardíacos; probablemente esto último es lo principal.

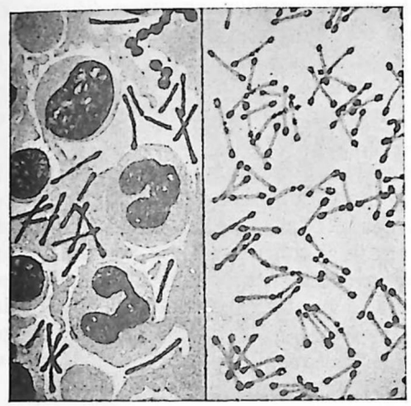


Fig. 226
Corynebacterium diphtheriae. Izquierda: frotis preparado con exudado faríngeo de un caso de difteria. Derecha: frotis de un cultivo de 12 horas en suero de Loeffler. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

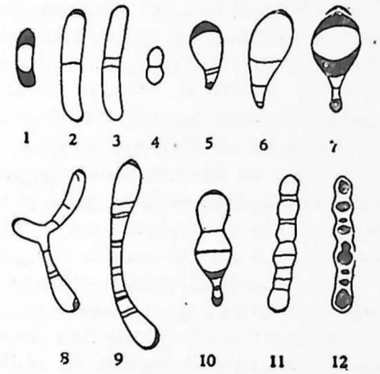


Fig. 227.
Formas celulares típicas de *Corynebacterium diphtheriae*: 1, 2, 3, 4, bacilos cortos y largos; 5, 6, 7, claviformes por un extremo; 9, claviforme con ambos extremos; 11, con membrana celular; 12, la misma célula con material nuclear en los compartimientos. (Según Hewitt.)

Portadores. Los convalecientes suelen albergar gérmenes por espacio de tres a cuatro semanas; luego desaparecen gradualmente las bacterias. Tres exploraciones de la garganta con resultado negativo permiten dar por terminado el aislamiento de un convaleciente. Sin embargo, estudios de la flora bacteriana de gargantas normales han revelado que existe un número por de más elevado de personas que tienen habitualmente bacilos diftéricos en la suya; son portadores crónicos, y no tienen importancia, a menos que los microorganismos sean del tipo virulento, lo cual puede precisarse en el laboratorio por medio de ensayos de virulencia practicados con animales.

Diagnóstico. Se pasa una torunda esterilizada por la región tonsilar o la faringe y se trazan con ella estrías en la superficie de suero coagulado, que se conoce por medio de Loeffler. Igualmente se frota la superficie de un portaobjetos y la extensión se tiñe con azul de metileno. El cultivo se incuba a 37° C durante 24 horas y el porta se examina al microscopio para ver si contiene los característicos bacilos listados y granulares; este examen proporciona una idea preliminar de lo que puede esperarse del cultivo

Como el cultivo en suero sanguíneo ha de contener muchas clases de gérmenes, es necesario sembrar en estrías parte de la vegetación mixta en la superficie de un medio sólido contenido en un platillo de Petri, a fin de obtener *C. diphtheriae* en forma pura. Se denomina medio de cistina-telurito

una excelente preparación, en la cual aparecen opacas y de color gris oscuro o negro colonias típicas de *C. diphtheriae*; los gérmenes absorben el telurito potásico y lo reducen a metal de color. Se trasladan colonias características a tubos con suero coagulado de Loeffler, se incuban a 37° C durante veinticuatro horas y se analiza su virulencia.

Prueba de virulencia. El método generalmente empleado es el intracutáneo, a saber: Se afeita el abdomen a dos cobayos, uno de los cuales se utiliza como testigo o contraste; se inyectan a este último 250 unidades de antitoxina diftérica por vía intraperitoneal. La vegetación de un cultivo de veinticuatro horas del germen analizado se emulsifica en unos 20 mg de solución salina. Y se aplica 0,15 ml a cada cobayo en inyección intracutánea. Si el cultivo contiene bacilos diftéricos virulentos producirá toxina carente de efecto sobre el cobayo inmunizado, pero capaz de producir al otro en veinticuatro horas una lesión inflamatoria local manifiesta, que se necrosifica en cuarenta y ocho a setenta y dos horas.

Prueba de Schick. Este ensayo sirve para determinar la sensibilidad de un individuo a la difteria y se practica como sigue: Se diluye toxina diftérica de modo que 0,1 mg contenga 1/50 de la dosis letal mínima requerida para matar a un cobayo de 250 g en noventa y seis horas. Se aplica 0,1 mg de la toxina así diluida mediante inyección intracutánea en un brazo, y en el otro brazo se inyecta como contraste igual cantidad de toxina calentada. Se examinan diariamente las zonas de inyección durante varios días; generalmente, al cuarto día se obtienen las lecturas de más precisión. Las reacciones se pueden registrar según se indica a continuación:

1.° Indica reacción positiva la presencia de una zona roja algo prominente, de 1 a 2 cm de diámetro, que aparece al cabo de veinticuatro a treinta y seis horas y alcanza su máximo en cuarenta y ocho a setenta y dos horas. La reacción persiste aproximadamente una semana y luego se atenúa gradualmente, hasta desaparecer. En el brazo de contraste no se aprecia reacción.

2.° Cuando el resultado es negativo no hay zona roja en ninguno de los dos brazos.

Focos de infección. Derrames de lesiones diftéricas de la faringe, la laringe, la tráquea, la nariz, la conjuntiva o la vagina; secreciones de la faringe y la nariz sana de portadores.

Modo de transmisión. La enfermedad se propaga de persona a persona por los dedos o por objetos tales como utensilios de mesa, juguetes, lapiceros, pañuelos que contengan moco o saliva, o bien por inhalación de gotitas expulsadas de la garganta al toser o estornudar.

Período de incubación. Generalmente dos a cinco días; a veces es más largo.

Sensibilidad e inmunidad. Un ataque de difteria suele inmunizar para toda la vida. La resistencia a la enfermedad aumenta con el tiempo, probablemente por la continua exposición a ella. Puede proporcionarse inmunidad pasiva transitoria por unos días o semanas, y artificialmente se provoca una inmunidad activa prolongada.

Frecuencia. Es endémica y epidémica, más corriente en zonas templadas y durante los meses de otoño e invierno. La mitad de los fallecimientos corresponden a niños de menos de cinco años, que no han tenido aún oportunidad de desarrollar inmunidad a la dolencia.

Prevención y tratamiento. Deben ser aislados los casos sospechosos de difteria; pueden contraer la enfermedad las personas que hayan dado una reacción de Schick positiva. Hay que vacunar a todos los niños contra la enfermedad. Puede inmunizarse activamente a los sujetos sensibles empleando dos tipos de preparaciones: toxoide, o toxoide precipitado con alumbre (pág. 711).

El toxoide se prepara tratando toxina con formaldehído, para anular sus propiedades tóxicas sin menoscabo de su capacidad estimulante de la producción de antitoxina. Por lo regular hacen falta tres dosis, a intervalos de un mes, para que la prueba de Schick resulte negativa.

El toxoide precipitado con alumbre es superior al toxoide corriente como factor de inmunización. El precipitado es insoluble y permanece en los tejidos más tiempo, antes de ser completamente absorbido, lo cual produce una respuesta antigénica más prolongada. En general, se necesitan dos inyecciones para convertir en negativos a individuos con reacción de Schick positiva.

La leche debe pasteurizarse para librarla de una posible contaminación Se desinfectarán todos los objetos que hayan estado en contacto con el paciente y los manchados por sus excreciones.

Terapéutica. Inmunización pasiva con antitoxina diftérica en casos clínicos. La antitoxina debe administrarse cuanto antes, y la dosis es de unas 10.000 unidades en casos benignos y de 30.000 a 50.000 unidades en los graves. La antitoxina neutraliza el efecto nocivo de la toxina (pág. 712). La inmunización pasiva suele durar dos a cuatro semanas. Si persiste la infección hay que repetir la dosis.

Se encontrará más información en Beattie (1949), Christensen (1949), Hewitt (1948, 1950), Saint-Martin (1948), Welsch y Thibaut (1948).

DIPLOCOCCUS

El neumococo (*Diplococcus pneumoniae*) es el agente causal de la neumonía lobular o fibrosa, aunque algunas veces se asocian a éste otros gérmenes.

Diplococcus pneumoniae. Células ovales o esféricas, de 0,5 a 1,25 μ, típicamente en parejas, a veces sueltas, o en cadenas cortas. Los extremos distales de cada par de células tienden a aguzarse en punta o lanceta. Son encapsuladas, inmóviles (figs. 228 y 229), y las jóvenes toman el gram. Regularmente se desarrollan poco o nada en medios artificiales.

Los gérmenes se disuelven añadiendo a cultivos vegetantes en caldo bilis completa o soluciones de taurocolato sódico o glicocolato sódico al 10 %.

Los neumococos suelen clasificarse con arreglo a tipos. Las células contienen dos tipos de antígenos: «somático» y «hapteno polisacárido» o substancias específicas solubles. El antígeno somático es probablemente una nucleoproteína, y se ha observado que reacciona con neumococos de cualquier tipo; el hapteno carbohidratado es específico de tipo y sirve para diferenciar éstos. En otras palabras, mediante reacciones inmunológicas es posible distinguir entre los diversos tipos de neumococos, por la composición del polisacárido que entra en el material capsular. Estos polisacáridos pertenecen a un grupo de substancias llamadas «haptenos» o antígenos parciales, que, sin ser propiamente antígenos, pueden actuar como tales combinados con proteína (pág. 708).

Se reconocen por lo menos 31 tipos de *D. pneumoniae* a base de reacciones serológicas, en particular el fenómeno de intumescencia de Neufeld, provocado por sueros inmunizantes de conejo, específicos de tipo.

Clasificación de los neumococos. Para determinar los tipos de neumococos se emplean diversos métodos.

1.º *Prueba de la precipitina.* En la cavidad peritoneal de un ratón se inyecta una muestra de esputo (aproximadamente 1 mg) de un presunto enfermo de neumonía. El animal enferma en unas ocho horas; al cabo de este tiempo se mata al animal, se le abre la cavidad peritoneal, y el exudado se pasa por lavado a un platillo de Petri, con ayuda de 2 mg de solución salina. Los lavados se centrifugan y el líquido que sobrenada se utiliza para la reacción.

2.º *Prueba microscópica de aglutinación.* Se prepara el exudado peritoneal como en el caso 1.º, y se ponen gotitas de los lavados en un porta-

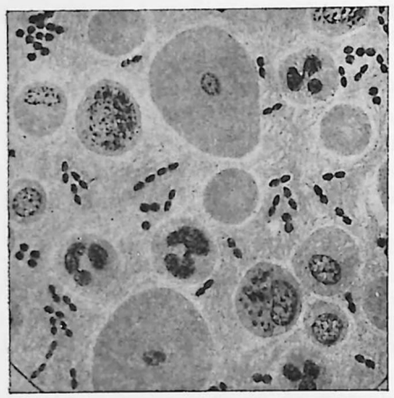


Fig. 228. — *Diplococcus pneumoniae* Frotis de esputos de un caso de neumonía fibrinosa. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia

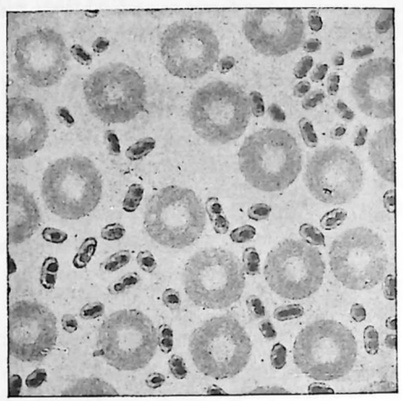


Fig. 229. — *Diplococcus pneumoniae.* Frotis preparados con sangre cardíaca de un ratón infectado. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

objetos. Se agregan a las gotas los diversos sueros específicos de tipo, y se extiende la mezcla en películas delgadas, que se dejan secar, se tiñen y se examinan al microscopio para descubrir posibles grumos. El suero típico que los produzca indica el tipo de germen presente en el exudado peritoneal.

3.º *Prueba de intumescencia.* Esta prueba se basa en la observación de que las cápsulas de neumococos se hinchan al ponerlas en contacto con suero inmunizante específico. En un portaobjetos se pone un asa de suero inmune sin diluir y se mezcla con una mota de esputo; luego se añade un asa de solución de azul de metileno diluido, y el conjunto se examina al microscopio. Si la mezcla es homóloga, las cápsulas aparecerán hinchadas y sus contornos muy bien definidos. La prueba se efectúa con muchos tipos de antisueros y otras tantas motas de esputo.

Los neumococos, cualquiera que sea su tipo serológico, manifiestan tres fases principales de cultivo: mucoide, lisa y rugosa. La forma mucoide constituye la fase típica de la especie; la tendencia o sucesión observada más a menudo es M → L → R. Sólo se reconocen tipos en la forma mucoide, por la presencia de polisacáridos específicos de tipo en el material de la cápsula; este material falta en las fases lisa y rugosa, que, en cambio, presentan antígenos específicos de especies comunes a todos los miembros de ésta. Las formas lisa y rugosa no son patógenas, poseen características distintivas de desarrollo y requieren una técnica especial para observaciones minuciosas.

Enfermedad producida. Es la causa más común de neumonía lobular, con 95 % de frecuencia. El microorganismo se halla en los alvéolos y bronquiolos del pulmón, en los conductos linfáticos y a veces en la sangre; puede ocasionar también pericarditis, artritis, meningitis, otitis media, mastoiditis, endocarditis, rinitis, tonsilitis, conjuntivitis, septicemia, osteomielitis y peritonitis.

Diagnóstico. Pueden descubrirse los gérmenes mediante exámenes adecuados de laboratorio, a base de esputos procedentes de las vías respiratorias.

Focos de infección. Esputos, sangre y exudados, en la neumonía; líquido cerebrospinal, en la meningitis; saliva del conducto respiratorio, en individuos normales.

Modo de transmisión. Contacto directo con personas infectadas o portadores; inhalación de gotitas expelidas de la garganta al toser o estornudar.

Período de incubación. Se estima generalmente en uno a tres días.

Sensibilidad e inmunidad. La resistencia suele ser grande, pero disminuye por exposición a la humedad y al frío, por fatiga física o mental y por alcoholismo. Un acceso de neumonía puede ir seguido de inmunidad adquirida, relativamente ligera y de escasa duración.

Frecuencia. Afecta a gran parte de la población, de cualquier raza, color o sexo; se presenta en todos los climas, pero es más corriente en invierno y primavera, y en comarcas frías. Las aglomeraciones dan ocasión a epidemias.

Prevención y tratamiento. Debe evitarse la aglomeración en zonas de residencia y reposo. La resistencia general se mantendrá por medio de una dieta nutritiva, suficiente sueño, aire libre o puro, e higiene individual.

Aislamiento de casos sospechosos de neumonía. Desinfección de las excreciones de nariz y garganta y de los objetos contaminados por ellas. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, puede abreviar el período de comunicabilidad; desde que se utilizan antibióticos ha disminuido el coeficiente de mortalidad a una cifra insignificante.

ESCHERICHIA

Los *Escherichia* son bacilos cortos, que fermentan glucosa y lactosa y producen ácido y gases, pero no acetilmetilcarbinol. La reacción con rojo de metilo es positiva. De glucosa se desprenden dióxido de carbono e hidrógeno en volúmenes aproximadamente iguales. Por lo regular no pueden utilizar ácido úrico como única provisión de nitrógeno. Se encuentran en las heces, y en ocasiones son patógenas para el hombre (colitis, cistitis, etc.). Están ampliamente difundidos en la Naturaleza.

Escherichia coli. Las células son bacilos cortos y gruesos, de 0,5 por 1 a 3 μ, sueltos, en parejas y en cadenas cortas; pueden ser móviles o inmóviles; las cepas móviles tienen flagelos peritricales (fig. 182). Fermentan glucosa, galactosa, fructosa, lactosa, maltosa y otros azúcares, y producen ácido y gases; no forman esporas, ni utilizan citratos y ácido úrico como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

Enfermedad producida. La *Escherichia coli* habita normalmente en el conducto intestinal del hombre y de otros animales vertebrados. Generalmente no es patógeno; en ciertos casos se ha comprobdo que se sobrepone a los mecanismos defensivos del cuerpo y ocasiona septicemia, peritonitis, hepatitis y colecistitis, cistitis, meningitis y otras infecciones. Como el germen se encuentra en el contenido intestinal, su presencia en el agua y los animales suele significar contaminación con materias fecales.

GAFFKYA

Los microorganismos de este género se presentan en el cuerpo animal y en medios especiales como tétradas, mientras que en medios corrientes aparecen en parejas y en masas irregulares. Son aerobios o anaerobios, y la especie más importante es la *G. tetragena.*

Gaffkya tetragena. Células esféricas, de 0,6 a 0,8 μ de diámetro, con seudocápsulas (en humores orgánicos) que envuelven cuatro células a modo de tétradas típicas; grampositivas.

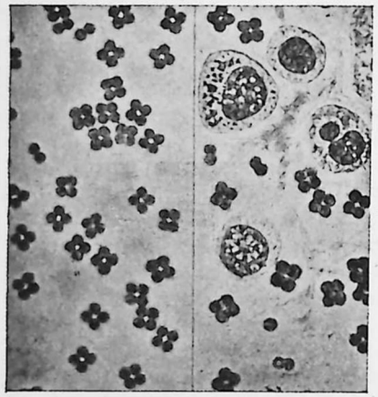


Fig. 230. — *Gaffkya tetragena.* Izquierda: frotis de un cultivo de 24 horas en agar inclinado. Derecha: frotis de esputos de un enfermo de tuberculosis crónica. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Enfermedad producida. La *G. tetragena* se considera en general como habitante normal del esputo o la saliva. Se encuentra en esputos tuberculosos, en la sangre de los enfermos de septicemia, en el pus de abscesos y en el líquido cefalorraquídeo de casos de meningitis. Parece ser un invasor secundario de escasa virulencia, que penetra en los tejidos sólo cuando ya están debilitados por algún otro germen infeccioso. Es patógeno para los ratones japoneses (fig. 230).

HEMOPHILUS

Este género comprende varias especies patógenas de importancia. Las células son diminutas, bacilares, a veces filamentosas y pleomórficas. Son gérmenes parásitos estrictos y crecen sobre todo o exclusivamente en presencia de hemoglobina y diversas substancias auxéticas. Generalmente se conocen por microorganismos hemoglobinófilos.

Hemophilus pertussis. Células bacilares cortas, ovales, de 0,2 a 0,3 por 1 μ, sueltas, a veces en parejas o en cadenas cortas; inmóviles, gramnegativas, con tendencia a coloración bipolar. Con una técnica especial se pueden percibir cápsulas.

Se han aislado diversas formas del microbio, que comprenden tipos lisos, rugosos e intermedios. Los primeros son patógenos, y no los demás. Pueden existir en cuatro fases, fundadas en reacciones serológicas. Las cepas recién aisladas o de fase I son encapsuladas, virulentas para animales de laboratorio, hemolíticas, y requieren la presencia de los factores X y V (pág. 286); las propiedades de la fase I se pierden por cultivo artificial, y los gérmenes pasan a las fases II, III o IV. Únicamente los virulentos en la fase I sirven para producir vacunas.

Enfermedad producida. Se considera como causante de la tos ferina, y a veces lo denominan bacilo de Bordet-Gengou, por los nombres de sus descubridores. La tos ferina es una enfermedad infecciosa específica aguda de la tráquea y los bronquios, y se caracteriza por una tos típica, que dura de uno a dos meses; comienza por un estado catarral, seguido de tos irritativa, que se hace paroxística al cabo de una a dos semanas. Los paroxismos consisten en una serie repetida de golpes violentos de tos, a menudo seguidos de una inspiración larga y ruidosa característica («gallo»); a los paroxismos

suceden en ocasiones vómitos. El período de comunicabilidad no dura probablemente más de tres semanas, a partir de la aparición de la tos.

La tos ferina es corriente sobre todo en niños de menos de cinco años de edad, y la cifra de letalidad es máxima entre los de menos de un año. Las criaturas afectadas muestran predisposición a infecciones por micrococos, estreptococos, neumococos y bacilos tuberculosos.

Diagnóstico. El germen se puede obtener por el método de la placa tosida, que consiste en exponer una placa de Petri, con un medio apropiado, a poca distancia de la boca del enfermo, durante un acceso de tos en la primera fase paroxística de la infección; luego se incuba la placa y se aíslan colonias características.

Focos de infección. Excreciones de membranas mucosas de la laringe y los bronquios de personas infectadas.

Modo de transmisión. Contacto directo con una persona infectada o con sus excreciones. Se propaga fácilmente la infección entre niños, por contacto personal. No hay pruebas de que existan portadores.

Período de incubación. Generalmente siete días, casi siempre menos de diez y nunca más de veintiuno.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general; no hay inmunidad natural. Los niños de menos de siete años son los más sensibles, y los de menos de dos, los más expuestos a un ataque fatal. Éste deja cierta inmunidad, pero no vitalicia; se conocen casos de reiteración. Puede proporcionarse inmunidad pasiva empleando suero inmune o de convalecientes.

Frecuencia. Es común en los niños de todas partes, sin distinción de raza o de clima. Un 15 % de los casos se registran en niños de menos de dos años.

Prevención y tratamiento. Vacunación de todos los niños menores de cinco años; se aconseja especialmente en criaturas de dos meses.

Aislamiento de individuos infectados, especialmente niños. Desinfección de excreciones de nariz y garganta del paciente, y de los objetos contaminados por ellas. Al parecer, ha dado resultados satisfactorios la vacunación preventiva de los sujetos expuestos a la enfermedad. Como agente curativo, se afirma que la vacuna disminuye el número y la gravedad de los paroxismos, y abrevia la duración de la dolencia. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, puede reducir el lapso de comunicabilidad.

Para más información, véanse Overend, Stacey, Webb y Ungar (1951), Payne y otros (1949, 1950).

Hemophilus influenzae. Las células son bacilos diminutos, de 0,2 a 0,3 por 0,5 a 2 μ, sueltos, apareados, o algunas veces en cadenas cortas o filamentos largos; inmóviles, gramnegativos. Con frecuencia muestran señalada tendencia a coloración bipolar. Algunas cepas son encapsuladas.

El *H. influenzae* es parásito estricto y se desarrolla solamente en presencia de hemoglobina y de otros humores orgánicos; no lo hace si faltan los factores X y V de la sangre (pág. 286). A base de la reacción de precipitinas, se distinguen seis tipos (A a F); la mayoría de las cepas obtenidas de las vías respiratorias no son específicas de tipo.

Enfermedad producida. Antes se creía que era el agente etiológico de la gripe epidémica, pero hoy parece demostrado que ésta es obra de un virus filtrable (pág. 807). El germen suele encontrarse en la nariz y la garganta de personas normales, y se ha comprobado que es un invasor secundario en diversas infecciones bacterianas y víricas, entre ellas escar-

latina, sarampión, varicela y tos ferina. También se supone que provoca endocarditis, sinusitis, meningitis, bronconeumonía y conjuntivitis infecciosa aguda («pink eye») (figs. 231 y 232). Los gérmenes del tipo B han resultado ser la causa de graves infecciones de garganta en niños.

Focos de infección. Excreciones de boca y garganta de individuos infectados u objetos contaminados por ellas.

Modo de transmisión. Contacto con personas infectadas; uso de toallas u otros objetos recién contaminados; inhalación de gotitas expelidas al toser, estornudar o hablar.

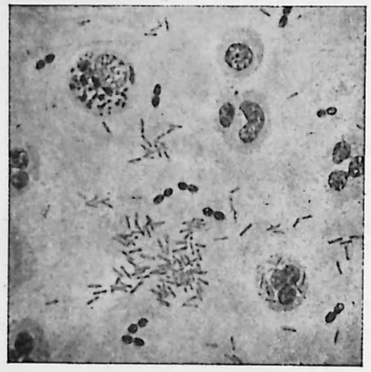


Fig. 231. — *Hemophilus influenzae.* Frotis de esputos de un caso de neumonía gripal Las células ovaladas son de *Diplococcus pneumoniae.* (De Muir, «Bacteriological Atlas».)

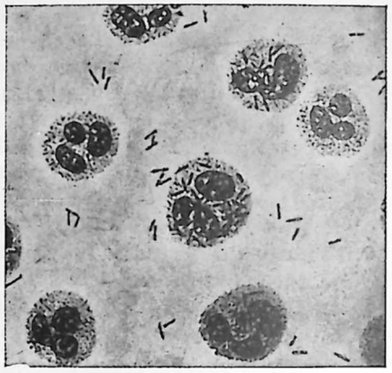


Fig. 232. — *Hemophilus infuenzae.* Frotis de pus de un caso de conjuntivitis aguda. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Inmunidad. Dudosa.

Frecuencia. Puede aislarse de la faringe de casi todos los individuos normales, y se encuentran cepas encapsuladas virulentas en infecciones crónicas de los senos nasales y en la faringe, tras resfriados víricos.

Prevención y tratamiento. Aislamiento de los sujetos infectados; evitar aglomeraciones; desinfectar las prendas o los objetos manchados por excreciones de nariz y garganta.

Hemophilus ducreyi. Pequeños bacilos de 0,5 por 1,5 a 2 μ, con extremos redondeados; sueltos o en cadenas cortas; inmóviles, gramnegativos. Para desarrollarse necesitan el factor X.

Enfermedad producida. Es causa del chancro blando o chancroide, lesión inflamatoria aguda en los órganos genitales o, menos veces, en la piel circundante; comienza por una pequeña pústula, que termina por romperse y formar una úlcera abierta. La infección se propaga fácilmente a otras zonas; se trata de un proceso puramente local, que no produce nunca una infección generalizada.

Focos de infección. Exudados de lesiones ulceradas (fig. 233).

Modo de transmisión. Principalmente por intercambio sexual, o por mediación de artículos manchados por derrames de lesiones ulceradas. El microorganismo pierde rápidamente su viabilidad fuera del cuerpo y muere pronto.

Período de incubación. De tres a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general; probablemente no hay inmunidad natural. Un ataque no preserva de infecciones subsiguientes.

Frecuencia. Muy difundido, sobre todo donde existe promiscuidad sexual.

Prevención y tratamiento. El chancro blando se propaga mucho por contacto sexual. Medidas profilácticas antes de exponerse a la dolencia, en el momento y después.

Exclusión de contacto sexual entre individuos contaminados y sanos. El período de contagiosidad se puede abreviar materialmente aplicando un antibiótico apropiado. No es una enfermedad grave, y cede con facilidad al tratamiento tópico.

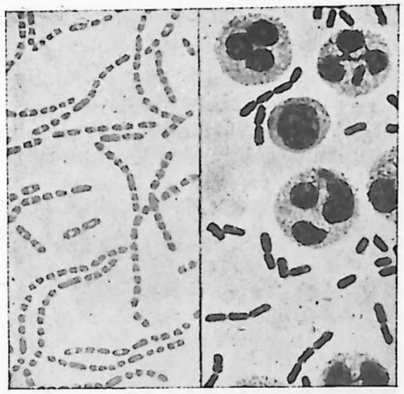


Fig. 233. — *Hemophilus ducreyi,* germen causal del chancro blando o chancroide. Izquierda, frotis de un cultivo joven en agar-sangre; derecha, frotis de un chancro blando. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

KLEBSIELLA

La *Klebsiella pneumoniae* fue aislada primero por Friedländer, y por eso se llama también bacilo de Friedländer. No pocas veces se encuentra asociado a infecciones de las vías respiratorias en el hombre. En la mayoría de los casos, el germen parece ser un invasor secundario; no ocasiona siquiera el 1 % de las neumonías.

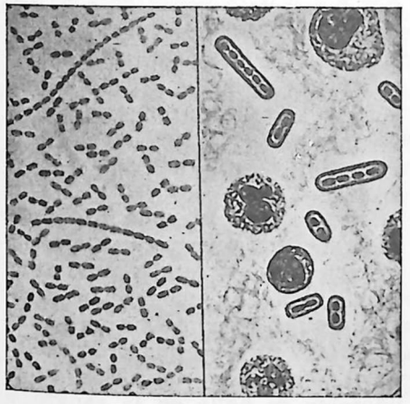


Fig. 234. — *Klebsiella pneumoniae* (bacilo de Friedländer), Izquierda, frotis de un cultivo; derecha, frotis de esputos. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Klebsiella pneumoniae. Las células son bacilos cortos y algo gruesos, de 0,3 a 0,5 por 5 μ, con extremos redondeados; a menudo, cuatro a cinco veces más largos que anchos. Se encuentran sueltos o apareados. Encapsulados, no móviles, gramnegativos (fig. 234).

Enfermedad producida. Simultáneo a infecciones del aparato circulatorio, el conducto intestinal y las vías genitourinarias del hombre. Aislado de los pulmones en la neumonía lobular; asociado a ésta y a otras inflamaciones de las vías respiratorios. Puede producir también otitis media, empiema, pericarditis, meningitis y septicemia.

Focos de infección. Exudados bucales y nasales de personas infectadas o portadores; objetos contaminados por esas secreciones.

Modo de transmisión. Contacto directo con persona infectada o portador.

Sensibilidad e inmunidad. El germen se encuentra en la rinofaringe del 1 % de individuos normales. Inmunidad relativamente escasa y de corta duración.

Prevención y tratamiento. Las personas infectadas deben aislarse; desinfección simultánea.

El empleo de un antibiótico adecuado, como la estreptomicina, bajo vigilancia médica, puede abreviar el período de comunicabilidad.

LEPTOSPIRA

Los miembros de este género son microorganismos finamente espirales, de 6 a 20 μ de longitud, con espiras de 0,3 μ de profundidad y 0,4 a 0,5 μ de amplitud. En medio líquido, uno de los extremos, o los dos, se encorvan a modo de gancho semicircular, que abarca 1/10 a 1/8 del microbio. Movimientos de rotación en líquido, y vermiformes en agar semisólido, hacia adelante o atrás. Se tiñen con dificultad mediante las soluciones colorantes habituales; necesitan oxígeno para desarrollarse, y son sobre todo gérmenes saprófitos, que se encuentran en el agua y a veces en la boca sana. El más importante de los patógenos es la *L. icterohaemorrhagiae*, agente de la ictericia infecciosa o enfermedad de Weil; las formas patógenas no se distinguen de las saprófitas o inofensivas.

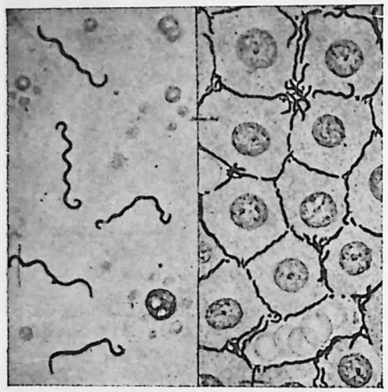


Fig. 235. — *Leptospira icterohaemorrhagiae*, agente de la enfermedad de Weil o ictericia contagiosa aguda en el hombre. Izquierda, frotis de orina; derecha, sección del hígado de una rata infectada. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Leptospira icterohaemorrhagiae. Células espirales finas, que miden 0,25 a 0,3 por 6 a 9 μ (a veces, 20 a 25 μ), con extremos aguzados; espiras de 0,3 μ de profundidad y 0,4 a 0,5 μ de amplitud; una o varias ondas a lo largo del germen, y uno de los extremos, o ambos curvados en gancho. Sin flagelos; la porción terminal, muy móvil, bien desarrollada en las últimas seis a ocho espiras. División transversal; flexibilidad muy activa.

Enfermedad producida. Es el agente etiológico de la ictericia infecciosa aguda o enfermedad de Weil. Se encuentra además en la sangre de perros y ratas silvestres (fig. 235). La dolencia se caracteriza por cefalea, malestar, dolores musculares, síntomas gastrointestinales, vómitos y fiebre al principio, seguidos de ictericia; ésta no se presenta en una mitad de los pacientes. Recidivas en un 20 % de los casos y desenlace fatal en la misma proporción. Los enfermos graves presentan a veces hemorragias en varios sitios, y las lesiones renales pueden ser grandes. El microbio se halla en la sangre y la orina de los pacientes.

Diagnóstico. La enfermedad se diagnostica inoculando a cobayos o hámsters sangre extraída al principio.

Focos de infección. Orina y heces de ratas, perros, gatos, ratones y otros animales. El agua y la tierra se contaminan con excreciones de los animales infectados.

Modo de transmisión. La infección sobreviene probablemente en el hombre por roce de tierra contaminada en la piel, los ojos y la nariz, o por ingestión de agua contaminada. La enfermedad es selectiva para oficios tales como pescaderos, personal de matadero, poceros, mineros, veterinarios, agricultores, etc. Infecciones eventuales por contacto con perros y otros animales. El germen puede introducirse a través de la piel intacta.

Período de incubación. De cuatro a diecinueve días; habitualmente, de nueve a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad es general; después del restablecimiento se desarrolla un estado refractario, y se encuentran gérmenes durante mucho tiempo aún. En la orina puede haber microbios durante meses después de la convalecencia.

Frecuencia. La enfermedad está difundida por todas partes en ratas. Se han comunicado casos humanos desde puntos muy diversos de los Estados Unidos.

Prevención y tratamiento. Desinfección de la orina y las heces de los pacientes. Avenamiento de zonas infectadas y supresión y eliminación de ratas. Tratamiento antibiótico apropiado de perros infectados.

Se ha empleado vacuna con resultados prometedores. Lo más ventajoso parece ser el empleo de antisuero equino.

MICROCOCCUS

Los micrococos son células esféricas, y se presentan en placas o masas irregulares (nunca en cadenas largas ni en paquetes); son grampositivos a gramnegativos. Algunas especies no producen pigmento, y otras lo forman amarillo, a veces anaranjado o rojo. Lo más corriente es encontrarlos en diviesos, furúnculos, abscesos u otros procesos supurativos; existen normalmente en la piel, y su introducción en una cortadura o un rasguño puede ocasionar infección. En algunos estados, especialmente en el curso de períodos de resistencia atenuada de los tejidos, los microorganismos pueden invadir la piel intacta. Parásitos facultativos y saprófitos.

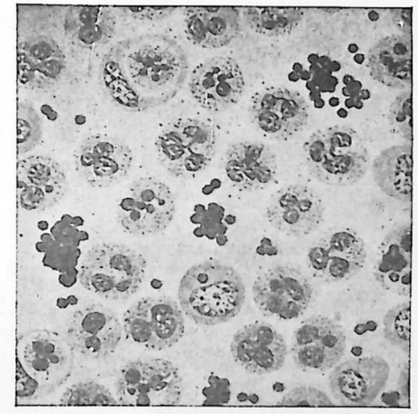


Fig. 236. — *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. Frotis de pus, con microorganismos y leucocitos (De Muir.)

Estos gérmenes estaban antes clasificados en el género *Staphylococcus*, nombre que se ha sustituido actualmente por el de *Micrococcus*.

Micrococcus pyogenes var. aureus. Células esféricas, de 0,8 a 1 μ, sueltos, apareados en cadenas cortas y en agregados irregulares, parecidos a racimos de uvas, inmóviles y grampositivos. Producen un pigmento amarillo colorado, insoluble en agua.

Enfermedad producida. Se encuentran en la piel y las membranas mucosas. Son agentes de diviesos, furúnculos, abscesos y supuraciones en heridas (figs. 236 y 237). El pus consiste en una acumulación de bacterias y leucocitos polimorfonucleares en la zona infectada. El microbio no suele producir septicemia, pero es a veces invasor secundario en casos de peritonitis, piemia, cistitis y meningitis.

Algunas cepas patógenas segregan varias clases de toxinas. Los filtrados de cultivos son capaces de hemolizar glóbulos rojos (hemolisina), destruir

leucocitos (leucocidina), matar a animales si se inyecta en las venas (toxina letal), producir intoxicación alimenticia por ingestión (enterotoxina), y disolver o digerir fibrina humana (fibronolisina).

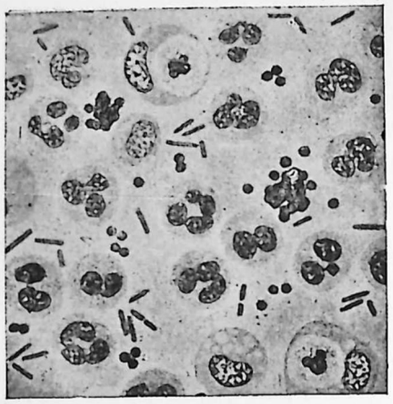


Fig. 237. — Micrococos y *Pseudomonas aeruginosa*. Frotis de pus, con microorganismo y leucocitos, que suelen encontrarse juntos en infecciones piógenas. (De Muir, «Bacteriological Atlas».)

Focos de infección. Pus, epidermis, aire, ropa contaminada, alimentos, agua, etc.

Modo de transmisión. Transmitido por penetración del germen a través de una herida o erosión de la piel, o incluso de la piel intacta.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a las infecciones es general. Se han empleado con algún éxito bacterinas polivalentes correspondientes, bacterinas autógenas y otras preparaciones inactivadas por el calor. Sin embargo, la inmunidad conseguida es escasa.

Prevención y tratamiento. Cirugía aséptica; destrucción de los apósitos por el fuego; limpieza de la boca y la piel.

La introducción de la penicilina y otros antibióticos ha revolucionado el tratamiento de las infecciones microcócicas. A veces, la asociación de penicilina y una sulfamida puede ser más eficaz contra algunas cepas más resistentes.

Más información en Chapman.

Micrococcus pyogenes var. albus. Este microbio es similar al anterior en cuanto a morfología, fisiología y características de cultivos. Defiere del mismo en que forma un pigmento blanco, es menos patógeno y produce menos toxina. Lo aglutina el antisuero de *M. pyogenes* var. *aureus*.

MORAXELLA

Los *Moraxella* son células bacilares pequeñas y cortas, generalmente sueltas o en parejas; parásitas, inmóviles, aerobias, gramnegativas.

Moraxella lacunata. Las células son bacilos cortos, de 0,4 a 0,5 por 2 μ, sueltas, apareadas y en cadenas cortas, con extremos redondeados o cuadrados en estas últimas.

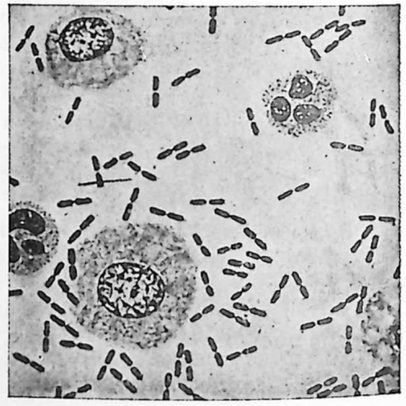


Fig. 238. — *Moraxella lacunata*. Frotis de secreción lagrimal de un caso de conjuntivitis crónica. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Enfermedad producida. Es causa de la conjuntivitis infecciosa subaguda o angular, que suele atacar ambos ojos (fig. 238). Pocas veces se hincha o ulcera notablemente la conjuntiva. La dolencia sigue un curso subagudo o crónico.

Diagnóstico. Se diagnostica la enfermedad mediante frotis del pus, que abunda especialmente por la noche.

Focos de infección. Secreciones de las conjuntivas.

Modo de transmisión. Contacto con la persona infectada, con objetos recién contaminados, o con excreciones de enfermos.

Sensibilidad e inmunidad. Los seres humanos pueden contraer la dolencia por inoculación. No hay inmunidad adquirida.

Prevención y tratamiento. Aislamiento de los pacientes; desinfección de las secreciones conjuntivales y de los objetos contaminados por ellas.

MYCROBACTERIUM

El género comprende varios microorganismos que difieren de la gran mayoría de las bacterias por contener en abundancia substancias céreas o grasas. Este material se tiñe con dificultad, pero, una vez teñido, no se decolora con ácidos, y por esto se califica de acidorresistentes a estos gérmenes. Producen enfermedades caracterizadas por la presencia de nódulos o tubérculos en diversos órganos.

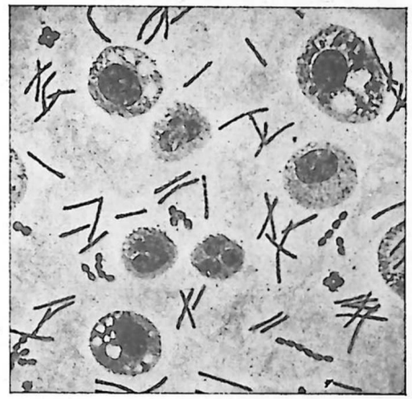


Fig. 239
Mycobacterium tuberculosis var. *hominis*. Frotis de esputos de un caso de tuberculosis pulmonar. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Estos microbios se desarrollan en forma de filamentos delgados, rectos o algo curvos, frecuentemente irregulares, con ramificación escasa y eventual. A menudo se tiñen desigualmente, es decir, muestran diferencias de reacción dentro de la célula (perlas o cuentas). No producen esporas; son inmóviles, aerobios y grampositivos. Las especies patógenas se desarrollan despacio (en varias semanas); las del suelo y el agua lo hacen con más rapidez (en varios dias).

Mycobacterium tuberculosis var. hominis. Células bacilares, que miden 0,3 a 0,6 por 0,5 a 4 μ, rectas o ligeramente curvas, sueltas y en filamentos ocasionales. A veces hinchadas, claviformes o incluso ramificadas. Se tiñen por igual o irregularmente y muestran formas listadas o perladas. El germen contiene ácido micólico, y a ello obedece probablemente su acidorresistencia.

Enfermedad producida. Es agente de la tuberculosis en el hombre, el mono, el perro y el loro. Experimentalmente es muy patógeno para cobayos, pero no para conejos, gatos, cabras, bueyes o aves de corral (fig. 239).

La enfermedad se caracteriza por su principio insidioso, con infiltración del parénquima pulmonar, apreciable por examen roentgenológico antes de aparecer síntomas constitucionales o signos clínicos. La pleuresía es casi siempre el primer síntoma. En su fase avanzada se observa tos, fiebre, fatiga y pérdida de peso.

Diagnóstico. La presencia de bacilos tuberculosos se investiga en material sospechoso, como esputos, orina, heces, líquido cefalorraquídeo o contenido gástrico.

El esputo se extiende sobre un portaobjeto y se tiñe con colorante acidorresistente de Ziehl-Neelsen. La presencia de microorganismos típicos suele ser signo de infección por bacilos tuberculosos.

Generalmente conviene concentrar los bacilos antes de efectuar pruebas

de laboratorio. Esto puede hacerse como sigue: el material infectado se trata con hidróxido sódico al 3 %, para digerir esputos, pus u otro material que impurifique los microorganismos. El material digerido se neutraliza luego con ácido y se centrifuga, reteniendo sólo el sedimento. Éste puede servir para preparar frotis, que se tiñen y se examinan al microscopio; para inyectar a animales y para sembrar en medios de cultivo.

Inoculación a animales. Se inocula un poco de sedimento en la ingle o en el músculo del brazuelo de un cobayo. Los ganglios linfáticos regionales se hipertrofian en dos a tres semanas, y el animal suele morir en unas seis a ocho semanas. La autopsia revela zonas necróticas en el hígado y el bazo, y ganglios linfáticos tumefactos cargados de material caseoso. Pulmones y riñones son atacados muy pocas veces.

Inoculación de medios de cultivo. Puede emplearse algo del sedimento para siembras en medios de cultivo adecuados. Sirven diversos medios, constituidos en su mayor parte por huevo, glicerina y algún colorante, para matar o detener el desarrollo de gérmenes contaminantes. Los medios se ponen en tubos, se inclinan y se esterilizan al calor; éste coagula la albúmina de huevo y solidifica el medio.

Uso de tuberculinas. Hay muchas tuberculinas disponibles. Se preparan de diversos modos, pero consisten en filtrados de cultivos líquidos del bacilo tuberculoso. Contiene ciertos productos liberados después de la muerte y desintegración de los microbios.

La primitiva tuberculina, conocida por «tuberculina antigua de Koch», se prepara como sigue: Se cultivan los microorganismos en un caldo de peptona y glicerina al 5 %, ligeramente alcalino, durante seis a ocho semanas; se concentra luego en baño de maría, se calienta a 80° C, hasta reducirlo a 1/10 de su volumen inicial y se filtra, para eliminar los residuos bacterianos. El filtrado transparente contiene la tuberculina.

Las tuberculinas se emplean para comprobar la sensibilidad de personas y animales a las proteínas del bacilo tuberculoso. Mediante inyección intradérmica de tuberculina se obtiene una reacción positiva en seis a ocho horas, la cual alcanza su máximo al cabo de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, y generalmente se atenúa en seis a diez días. Se caracteriza un enrojecimiento de la piel que mide aproximadamente 1 cm de diámetro. La reacción positiva se produce en individuos con lesiones activas o curadas; como la mayoría de las personas tienen lesiones tuberculosas curadas, la prueba es de valor limitado.

Diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas. Emmart y Smith (1941, 1943) han utilizado la membrana corioalantoica del pollo en embrión para comprobar la viruencia de diversas cepas de bacilos tuberculosos. Según estos autores, a los seis días de la inoculación, 96 % de las membranas inoculadas con cepas virulentas presentaban tubérculos, mientras que sólo se obtuvieron 18 % de reacciones positivas con las cepas no virulentas. Estos resultados concordaron casi totalmente con los de experimentos en cobayos. A juicio de los investigadores, la membrana corioalantoica del embrión de pollo puede emplearse con provecho para determinar virulencias desiguales entre cepas muy afines de bacilos tuberculosos.

Focos de infección. Exudados de lesiones u objetos recién contaminados por ellas, principalmente por esputos. Son menos importantes las secciones de los conductos intestinal y genitourinario, o de lesiones de ganglios linfáticos, huesos y piel.

Modo de transmisión. Secreciones de las vías respiratorias y, con menos frecuencia, del conducto digestivo; inhalación de gotitas expelidas al toser, estornudar, hablar o cantar; besos, empleo de utensilios utilizados para comer y beber; polvo contaminado; moscas, etc. Habitualmente ocasiona infección el contacto continuo con una persona infectada.

Período de incubación. Variable, según el tipo de enfermedad, el agente, etcétera; probablemente no menos de un mes, y, por lo general, más largo.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general, mayor en niños de menos de tres años, y mínima en los de tres a doce años; luego, relativamente alta durante el resto de la vida. Se acentúa en individuos desnutridos, fatigados o descuidados, en comparación con los bien alimentados y atendidos.

Generalmente, la inmunidad natural a la afección no existe.

Prevención y tratamiento. Instrucción del público acerca del peligro de la tuberculosis, del modo de transmisión y de los métodos de reprimirla. Evitar aglomeraciones; mejorar las condiciones de trabajo y de vida; aislamiento y cuidado de individuos enfermos; pasteurización de la leche y los productos lácteos; separación de los recién nacidos de madres tuberculosas; sacrificio del ganado enfermo. Debe prohibirse que los tuberculosos manipulen alimentos destinados al consumo público.

Desinfección de esputos y objetos contaminados por ellos, como pañuelos, toallas, papel, utensilios de mesa, etc. Desinfección de habitaciones previamente ocupadas por pacientes tuberculosos. La vacunación de individuos sanos con vacuna BCG puede ser útil. La cura se basa principalmente en el reposo, la alimentación saludable, el aire puro, el sol y la despreocupación. Los tratamientos quirúrgico, quimioterápico y antibiótico son suplementarios y no pueden substituir al fundamental de reposo.

Véase más información en Birkhaug (1948), Dubos (1949), Feldman, Karlson y Hinshaw (1948), Frappier y Guy (1949, 1950), Hinshaw, Feldman y Pfuetze (1946), Levaditi (1949), Levaditi, Vaisman, Chaigneau y Henry-Eveno (1950), Malmros (1947), Pfuetze, Glover, White, Feldman y Hinshaw (1946), Pottenger (1948), Rosenthal, Leslie y Loewinsohn (1948).

Mycobacterium tuberculosis var. bovis. Bacilos más cortos y gruesos que los del tipo humano, de 1 a 1,5 μ. Con frecuencia se ven bacilos cortos mezclados con formas más largas. Se pueden teñir por completo o aparecer rayados o perlados. Al aislarlos, los gérmenes apenas se desarrollan en huevo, huevo glicerinado, patata glicerinada y caldo glicerinado, mientras que la variedad humana medra bien en tales medios. Son más virulentos para conejos que el tipo humano; producen lesiones generalizadas en terneras, mientras que el tipo humano las origina solamente locales, con expansión, a lo sumo, al ganglio linfático más próximo.

Enfermedad producida. Es causa de la tuberculosis en el ganado vacuno y puede transmitirse al hombre y a los animales domésticos. Patógeno para el buey, el hombre, el mono, la cabra, la oveja, el cerdo, el gato, el loro, la cacatúa y otras aves. Experimentalmente es muy patógeno para el conejo y el cobayo; más patógeno para animales que el tipo humano (fig. 240).

Focos de infección. Las vacas tuberculosas pueden eliminar el germen en las heces, la orina y la leche. La leche de ubres infectadas puede contener un número enorme de gérmenes.

Modo de transmisión. Infección propagada a vacas sanas por medio de la leche, la orina y las heces de vacas enfermas. Los niños, especialmente los menores de cinco años, pueden infectarse por beber leche contaminada de vacas tuberculosas.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general, mayor en niños de menos de tres años, mínima en los de tres a doce.

La inmunidad natural es generalmente negativa.

Prevención y tratamiento. Instrucción del público respecto al peligro de tuberculosis, el modo de difusión y los métodos represivos. Aislamiento y cuidado de los individuos enfermos. Pasteurización de la leche y los productos lácteos. Sacrificio de reses tuberculosas. Debe prohibirse que los tuberculosos manipulen alimentos destinados al consumo público.

Desinfección de secreciones y de objetos contaminados por ellas. Desinfección de habitaciones previamente ocupadas por pacientes tuberculosos. Puede ser útil aplicar a los individuos sanos las vacuna BCG, cepa de tuberculosis bovina despojada de virulencia mediante cultivos por varias generaciones en un medio de patata glicerinada y bilis; este cambio parece ser permanente, y la virulencia no se restablece al trasladar los gérmenes a medios de cultivo usuales. La cura se basa principalmente en el reposo, una alimentación sana, aire puro, luz solar y despreocupación. La terapéutica quirúrgica, quimioterápica y antibiótica es sólo suplementaria y no puede substituir el tratamiento fundamental de reposo.

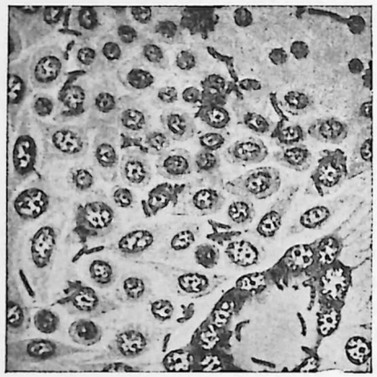


Fig. 240. — *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*. Sección de una ubre de vaca enferma de tuberculosis crónica. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Vacunación del ganado sano con BCG.

Mycobacterium leprae. Células bacilares de 0,3 a 0,5 por 1 a 8 μ, con lados paralelos y extremos redondeados; se tiñen por igual, a veces en perlas o cuentas. Cuando son numerosos, como al extraerlos de nódulos, se hallan generalmente en grumos, masas redondeadas o grupos de bacilos yuxtapuestos.

Enfermedad producida. Son causa de la enfermedad de Hensen o lepra humana. Ésta es una enfermedad crónica, que se presenta en tres tipos: anestésico (neural), nodular (muscular) y mixto (combinación de ambos). La muerte no suele ser efecto de la lepra, sino de algún invasor secundario; el índice de infecciosidad es reducido.

Diagnóstico. El bacilo se halla en número muy crecido en casos nodulares (lepromatosos) de la enfermedad, y poco abundante en los neurales. La enfermedad puede reconocerse por lesiones cutáneas y mucosas, y por manifestaciones neurológicas. Los medios bacteriológicos actuales de identificación dependen de la coloración acidorresistente y de la incapacidad de los gérmenes para desarrollarse en medios bacteriológicos o en animales de laboratorio. Las suspensiones calentadas de bacilos retirados de nódulos producen una reacción positiva de lepromina en 75 a 97 % de las personas normales y de los casos neurales de lepra, pero no suelen dar reacción en los individuos lepromatosos.

Focos de infección. Exudados de lesiones.

Modo de transmisión. Contacto íntimo y prolongado con leprosos. Los nódulos de la piel se pueden licuar y ulcerar, y descargan a veces grandes masas de bacilos. Los pacientes en cuyos frotis se descubren gérmenes acidorresistentes, aun cuando no tengan úlceras, son casos potencialmente expuestos. Generalmente se cree que la enfermedad es consecuencia de vivir en condiciones inmundas, antihigiénicas, pero no hay muchas pruebas que confirmen tal aserto. Los niños enferman con más facilidad que los adultos; los recién nacidos de leprosos raramente se infectan, separándolos al nacer. Los trabajadores de las colonias de leprosos no se contagian casi nunca.

Período de incubación. No se conoce, aunque algunos autores lo estiman en uno a siete años.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad es incierta; no existe inmunidad racial.

Prevención y tratamiento. La lepra se puede contraer en la edad adulta, pero generalmente se adquiere en la infancia. Los niños nacidos de personas leprosas deben ser separados al nacer.

Los casos positivos han de mantenerse aislados en leproserías hasta que se haya detenido la enfermedad. Por lo regular, hacen falta tres análisis bacteriológicos negativos, a intervalos de seis meses, para dar de alta a un paciente. Los que queden libres bajo palabra deben someterse a nuevo examen cada seis meses, a partir de entonces. Las excreciones y los objetos manchados con ellas deben desinfectarse; igualmente se limpiarán a fondo las habitaciones ocupadas por enfermos. El tratamiento se basa principalmente en reposo, buena alimentación, aire puro, sol y despreocupación. Los tratamientos quirúrgico, quimioterápico o antibiótico son sólo suplementarios, y no pueden sustituir al fundamental de reposo.

Más información se encontrará en Burden (1946), Erickson (1950), Hanks (1950), Levaditi y Chaigneau-Erhard (1951).

NEISSERIA

Los cocos gramnegativos están clasificados en el género *Neisseria*. Los gérmenes son cocos apareados, con las caras adyacentes aplanadas. Hay especies aerobias y anaerobias. El desarrollo en medios corrientes puede ser deficiente. Parásitos de mamíferos solamente, por lo que se sabe hasta ahora.

Neisseria gonorrhoeae. Células esféricas de 0,6 a 1 μ de diámetro, sueltas o en parejas, con las caras contiguas aplanadas; suelen describirse como semejantes a granos de café.

Enfermedad producida. La *N. gonorrhoeae* es el agente de la blenorragia en el hombre (fig. 241). Ataca sobre todo la uretra humana en ambos sexos, y produce un estado catarral agudo. La infección tiende ostensiblemente a difundirse, y ocasiona, en el varón, epididimitis, prostatitis, cistitis y otros estados inflamatorios; en la mujer, puede participar todo el aparato genitourinario, incluso el cuello uterino. El germen invade también a veces la circulación, y es transportado a diversas partes del cuerpo; muestra predilección por las membranas sinoviales de las articulaciones, y produce así reumatismo blenorrágico, o por las válvulas cardíacas, con endocarditis consiguiente. Pueden persistir años enteros sin ser eliminados por completo.

Oftalmía neonatal. Es una inflamación de la conjuntiva en niños recién nacidos, a consecuencia de infección materna; si no se cuida, probablemente es la causa más corriente de ceguera; aproximadamente el 10 % de todos los casos de ceguera son efecto de infecciones blenorrágicas. Esto se evita fácilmente instilando una o dos gotas de nitrato argéntico al 2 % en los ojos de la criatura.

Diagnóstico. Se preparan frotis directos de secreción uretral o conjuntival y se tiñen por el método de Gram. En los frotis se investiga la presencia de diplococos intracelulares gramnegativos, ligeramente aplanados por sus superficies contiguas. Los gérmenes se pueden cultivar sembrando

en estrías un poco de pus uretral en la superficie de una placa de agar-sangre, e incubando la placa en una atmósfera que contenga 10 % de dióxido de carbono; esto se consigue aproximadamente colocándola en un pote de tapa roscada, con una bujía encendida en su interior y tapando de nuevc la vasija.

Reacción de la oxidasa. El gonococo produce una oxidasa que hace tomar a una solución de dimetil-parafenilendiamina al 1 %, primero color rosado, luego rosa, magenta y, finalmente, negro. La prueba se efectúa cubriendo un cultivo de veinticinco horas en placa de agar con el reactivo y observando el desarrollo de la referida serie de colores.

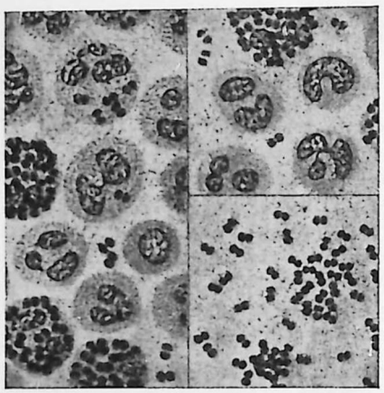


Fig. 241. — *Neisseria gonorrhoeae*, agente de la blenorragia. Izquierda, frotis de pus con gérmenes englobados por leucocitos polimorfonucleares; derecha, arriba, el mismo, pero teñido de otro modo; derecha, abajo, frotis de un cultivo puro. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Focos de infección. Exudados venéreos purulentos; sangre y pus de infecciones conjuntivales y articulares.

Modo de transmisión. La infección se transmite casi siempre por contagio directo entre personas (relaciones sexuales), rara vez por contacto directo con artículos recién contaminados por sus secreciones.

Período de incubación. De uno a catorce días; generalmente de tres a cinco.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Un ataque de blenorragia apenas proporciona inmunidad.

Prevención y tratamiento. Facilidades adecuadas de diagnóstico para identificar el gonococo, y de inmediato y oportuno tratamiento de las personas infectadas. Instrucción al público sobre el modo de transmisión y cómo evitar el contagio. Vigilancia o supresión de las mancebías. Higiene personal antes o inmediatamente después del acto sexual.

Desinfección de secreciones de lesiones y de los objetos o prendas contaminadas por ellas. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, parece abreviar notablemente el período de comunicabilidad.

Neisseria meningitidis. Las células son esféricas y miden 0,6 a 0,8 μ de diámetro, a veces más; se presentan sueltas, en parejas con las caras adyacentes aplanadas o en tétradas.

Los meningococos se clasifican generalmente en cuatro tipos principales, a base de la reacción de aglutinación. En uno u otro de estos tipos I, II, IIa y IV pueden incluirse la mayoría de las cepas. Como sucede con los neumococos, la presencia de substancias carbohidratadas capsulares se considera la causa de la especialidad inmunológica de los diversos tipos meningocócicos.

Enfermedad producida. La *N. meningitidis* es causa de la meningitis cerebroespinal epidémica, enfermedad que se caracteriza por fiebre, cefalalgia intensa, náuseas, a menudo vómitos y muchas veces erupción cutánea. En ocasiones sobrevienen pronto delirio y coma.

El germen ataca la base y la porción cortical del cerebro, así como las superficies de la medula raquídea. Se encuentra en el líquido cefalorraquídeo y, si vegeta en abundancia, puede enturbiarlo. Los microorganismos aparecen libres o englobados en leucocitos. La *N. meningitidis* existe a menudo en la sangre circulante de enfermos de meningitis; también se ha aislado de personas aquejadas de artritis o pericarditis y de la rinofaringe de quienes padecen rinofaringitis.

Diagnóstico. El meningococo se presenta en crecido número en el líquido cefalorraquídeo de personas atacadas de esta dolencia y puede diagnosticarse centrifugando este líquido y examinando frotis teñidos del sedimento. El cuadro típico se caracteriza por la presencia de diplococos intracelulares gramnegativos. Las extensiones típicas de meningococos y gonococos no se distinguen entre sí, salvo por sus reacciones en cultivos.

La *N. meningitidis* se puede cultivar sembrando en estrías un poco de sedimento del líquido cefalorraquídeo en la superficie de una placa de agar-sangre o de agar-sangre calentado (achocolatado). La placa se incuba luego en una atmósfera que contenga dióxido de carbono al 10 % aproximadamente.



Fig. 242. — *Neisseria meningitidis*, agente de la meningitis meningocócica. Izquierda, frotis de sedimento de una muestra centrifugada de líquido celaforraquídeo; derecha, el mismo, teñido de distinto modo. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Como ocurre con el gonococo, este microorganismo produce también una oxidasa que puede oxidar dimetil-parafenilendiamina hasta ennegrecerla. La prueba se efectúa cubriendo un cultivo de veinticutro horas en placa con una solución del reactivo al 1 % y observando el desarrollo de un color negro en colonias de meningococos.

Focos de infección. Los gérmenes encontrados en la rinofaringe, la sangre, el líquido cerebroespinal, la conjuntiva, el pus de articulaciones, etc., de personas aquejadas de la enfermedad (fig. 242).

Modo de transmisión. La enfermedad se difunde por contagio directo y por infección mediante gotitas expelidas al toser o estornudar. El microorganismo se encuentra a menudo en la rinofaringe de personas sanas, que en este caso se denominan portadores por su capacidad de transmitir la dolencia a otros individuos. Los gérmenes se matan muy fácilmente fuera del cuerpo, y probablemente nunca llegan a otro sujeto, a no ser por contacto directo. Las epidemias suelen desarrollarse durante períodos de aglomeración, como los de campamentos militares.

Período de incubación: De dos a diez días, generalmente siete.

Sensibilidad e inmunidad. Es escasa la sensibilidad a la dolencia. Los grupos de poca edad son más sensibles, pero la afección puede sobrevenir también más tarde. Después de la infección se encuentran en el torrente sanguíneo aglutininas contra los gérmenes, pero la duración de la inmunidad es incierta.

Frecuencia. La enfermedad es endémica y epidémica, y está muy difundida por todo el mundo. Es más corriente en invierno y primavera. La onda epidémica puede durar dos a tres años.

Prevención y tratamiento. Aislamiento de individuos infectados; evitar aglomeraciones.

Desinfección de secreciones de la nariz y la garganta y de artículos con-

taminados por ellas. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, puede abreviar notablemente el período de comunicabilidad.

Véase más información en Branham (1953).

PASTEURELLA

Los miembros del género *Pasteurella* son bacilos pequeños, gramnegativos, elipsoidales a oblongos, y presentan coloración bipolar por métodos especiales. Aerobios facultativos; a veces, en el primer aislamiento requieren un potencial escaso de oxidación-reducción.

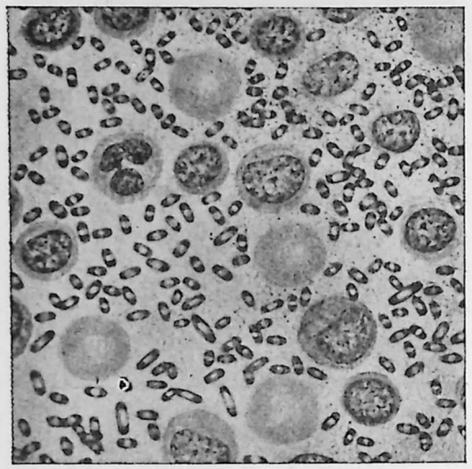


Fig. 243. — *Pasteurella pestis*, agente de la peste bubónica, neumónica y septicémica en el hombre; frotis preparado de un bubón (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Pasteurella pestis. Las células son bacilos pequeños, de 1 a 2 μ, y se presentan sueltas. Inmóviles; coloración polar. Formas características de involución (vejiga, imperdible, anillo).

Enfermedad producida. Es el agente causal de la peste en el hombre, la rata, la ardilla y otros roedores; infeccioso para ratones, cobayos y conejos.

La peste humana puede ser de tres tipos: bubónica, neumónica y septicémica.

La peste bubónica es una enfermedad grave, sumamente peligrosa, y se caracteriza por fiebre alta, debilidad, bubones, a veces pústulas y hemorragias subcutáneas. Las bacterias se introducen por los vasos sanguíneos y linfáticos a los ganglios inguinales, axilares, cervicales, etc.; se multiplican, producen supuración, y dilatan los ganglios, que se pueden ulcerar y descargar su contenido. Los ganglios tumefactos se denominan bubones, y de aquí deriva el nombre de la infección.

La peste neumónica ofrece el cuadro de una neumonía séptica virulenta. Los pulmones se infartan y aparecen hemorragias bajo la pleura; se encuentran bacterias en gran número en los espacios linfáticos peribronquiales y en los alvéolos contiguos.

La enfermedad puede ser benigna o adoptar una forma septicémica aguda, que generalmente acarrea la muerte en poco tiempo.

Diagnóstico. Los cultivos de sangre dan reacción positiva en un 30 % de los casos. Pueden prepararse extensiones directas de bubones abiertos, o este material se siembra en medios de cultivo; si está contaminado, se purifica inoculándolo a un cobayo y aislando el bacilo pestoso de la sangre del corazón. En el tipo neumónico, los gérmenes suelen presentarse numerosos en los esputos, y se reconocen por frotis directo.

Focos de infección. Los microbios hallados en los bubones, la sangre, el derrame pleural, el bazo y el hígado de personas y roedores infectados, así como los contenidos en esputos de enfermos de peste neumónica (fig. 243). La infección llega generalmente al hombre por contacto con ratas muertas.

Modo de transmisión. Se transmite de rata a rata y de la rata al hombre, por mediación de pulgas de rata infectadas, entre las cuales son las más importantes *Xenopsylla cheopis* y *Ceratophyllus fasciatus*. La pulga se infecta al picar a una rata apestada; cuando pica luego a una persona deposita al mismo tiempo su excremento, y tal vez algo de sangre regurgitada. Los bacilos penetran entonces en la piel al rascarse el sujeto.

Período de incubación. Generalmente, de tres a seis días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. La inmunidad que sigue al restablecimiento es transitoria y relativa. La inmunización activa con una bacterina pestosa puede proteger por algunos meses; se necesitan inyecciones estimulantes repetidas.

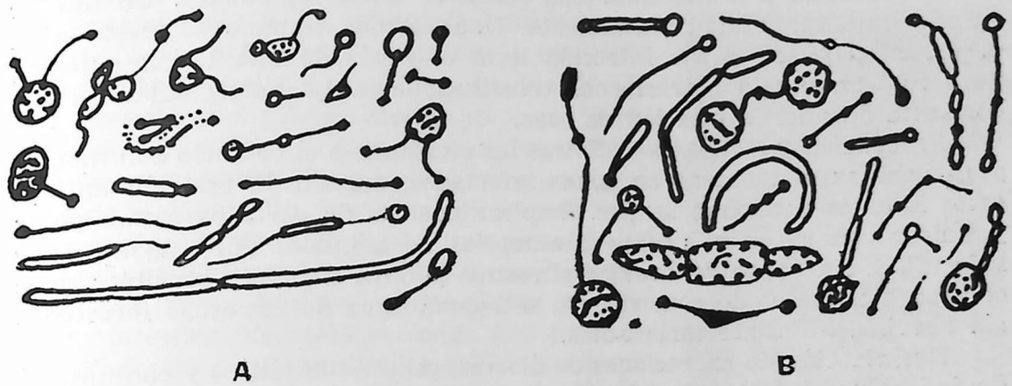


Fig. 244. — Unidades morfológicas seleccionadas de dos cepas de *Pasteurella tularensis*: *A*, cepa Ri, cultivo de 48 horas; nótese la filamentación múltiple a la izquierda, arriba. *B*, cepa Russ, cultivo de 48 horas. (Según Hesselbrock y Foshay.)

Frecuencia. Es insólita en Norteamérica. Se producen casos esporádicos donde hay personas expuestas al contagio por roedores silvestres. Se halla difundida en varias partes del mundo.

Prevención y tratamiento. Exterminio de ratas o protección contra ellas y otras medidas necesarias. Desratización de buques.

Aislamiento de individuos infectados. Desinfección de esputos y objetos contaminados de los de enfermos del tipo neumónico, así como de paredes, suelos y muebles de habitaciones que hayan ocupado enfermos de peste. El tratamiento inmediato con un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, resultará ventajoso.

Pasteurella tularensis. Células esféricas y bacilares, de 0,2 por 0,2 a 0,7 μ, sueltas, sumamente pleomórficas (fig. 244), inmóviles, gramnegativas. Pueden presentar coloración bipolar, y pasan por filtros de Berkefeld.

Enfermedad producida. Es causa de la tularemia en el hombre. La enfermedad se presenta de pronto, con dolores y fiebres; el paciente suele quedar abatido y ha de guardar cama. La fiebre persiste a veces tres a cuatro semanas y sigue una lenta convalecencia. En algunos casos se hinchan y ablandan los ganglios linfáticos y supuran en 50 % de las infecciones. El germen es patógeno para conejos, cobayos, ratas, ratas almizcladas, ratas de agua, ratones grises, ardillas, castores y lémings.

Diagnóstico. La enfermedad se diagnostica por inoculación a animales, aislando el microbio de exudados o lesiones, o por la reacción de aglutinación con suero del paciente.

Focos de infección. Los gérmenes se aislaron primero de ardillas tamias o terrícolas de California y, más tarde, de más de 30 formas distintas de animales silvestres de Estados Unidos y otros lugares, así como de conejos, liebres, tábanos del venado (*Crysops discalis*), garrapatas de la madera

(*Dermacentor andersoni* y *D. variabilis*), y posiblemente otros insectos picadores. Durante la temporada de caza de conejos pueden contraer la dolencia cazadores, cocineros y carniceros.

Modo de transmisión. Por picadura de moscas y garrapatas infectadas, y por inoculación al manipular animales enfermos, especialmente al desollar conejos durante la temporada venatoria. Por ingestión de carne mal cocida de un animal enfermo y por beber agua contaminada.

Período de incubación. De uno a diez días, generalmente unos tres días.

Sensibilidad e inmunidad. Son sensibles todas las edades. Un ataque curado deja inmunidad permanente. Una persona inmune expuesta a la enfermedad puede sufrir infección local a través de una lesión cutánea, pero esto no ocasiona trastornos constitucionales. La enfermedad es más corriente durante la estación de caza.

Prevención y tratamiento. Evitar las picaduras o el contacto con moscas y garrapatas al trabajar en zonas infectadas, durante la estación en que estos insectos succionan sangre. Emplear guantes de goma para manipular y guisar conejos, o al practicar autopsias de animales que puedan estar infectados. La carne de conejos silvestres y otros animales sensibles debe cocerse bien antes de comerla. No se beberá agua de comarcas infectadas sin hervirla o desinfectarla antes.

Desinfección de excreciones de úlceras, ganglios linfáticos y conjuntivas de individuos infectados; el tratamiento de éstos con un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, ha producido efectos favorables.

Véase más información en Eigelsbach, Braun y Herring (1951), Hasselbrock y Foshay (1945).

SALMONELLA

Células bacilares, móviles, con flagelos peritricales o inmóviles. Todas las especies conocidas son patógenas para animales de sangre caliente, incluido el hombre, y ocasionan intoxicaciones alimenticias y fiebres intestinales; algunas se encuentran en reptiles. En su totalidad o en parte pueden vivir asimismo a base de alimentos en descomposición.

Dentro de los límites del género *Salmonella,* las relaciones serológicas constituyen el principal medio de identificar nuevas cepas. Se han reconocido más de 150 serotipos; en general, se desaprueba la concesión de la categoría de especie a cada uno de los tipos, cuyo número aumenta con rapidez.

Como la morfología, las propiedades de coloración y la fisiología de las bacterias que pertenecen a los diversos tipos son prácticamente idénticas, sólo se han registrado la estructura antigénica, el origen y la procedencia de la mayoría de los tipos relacionados.

La nomenclatura adoptada está de acuerdo con el concepto de que la apreciación de estructuras antigénicas similares identifica en realidad serotipos y no especies. En cierto modo, los serotipos son variedades, en sentido taxonómico, si bien, como sucede con las hortícolas de plantas superiores, no coinciden exactamente con las definidas de ordinario por los taxonomistas. Cuando se han tenido en cuenta diferencias de cultivo más bien que la estructura antigénica para subdividir especies, las subdivisiones se designan como variedades.

Véase más información en Edwards, Bruner y Moran (1948), y Felsenfeld (1949).

Salmonella typhosa. Células bacilares, de 0,6 a 0,7 por 2 a 3 μ; sueltas, en parejas y a veces en cadenas cortas (fig. 245). Móviles, con flagelos peritricales; gramnegativas.

Enfermedad producida. Es causa de la fiebre tifoidea en el hombre. Esta enfermedad infecciosa aguda se caracteriza por fiebre persistente, participación de los tejidos linfoides, esplenomegalia, manchas rosadas en el tronco, irritación de las paredes del conducto intestinal, con ulceraciones y diarrea. El germen se puede retirar de las heces. Durante la primera semana de la infección suele encontrarse en la corriente sanguínea. La enfermedad puede transmitirse a los animales de laboratorio mediante inoculación.

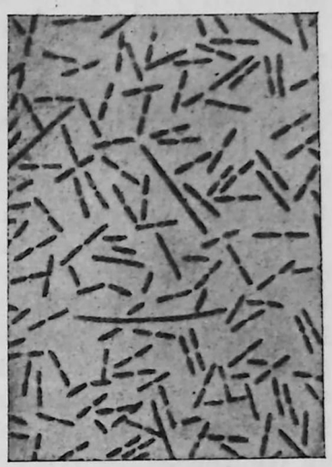


Fig. 245
Salmonella typhosa. Frotis de un cultivo de 24 horas en agar inclinado. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Portadores. La fiebre tifoidea se puede transmitir de una persona a otra por individuos denominados portadores, antiguos enfermos que, después de restablecidos, continúan eliminando bacilos con el contenido intestinal. Estos gérmenes no son ya patógenos para el portador, pero pueden ocasionar fiebre tifoidea cuando llegan al conducto intestinal de otras personas. Los portadores albergan generalmente los microorganismos en su vesícula biliar, que parece ser el depósito de los bacilos. El mejor método de tratamiento de algunos portadores es la extirpación de la mencionada vesícula.

Diagnóstico. Las especies móviles de *S. typhosa* contienen dos componentes antigénicos, el antígeno H, flagelar, y el antígeno O, somático (pág. 709). Se pueden producir aglutininas contra ambos, y durante la infección las hay de las dos clases en el suero sanguíneo. La fiebre tifoidea se puede diagnosticar investigando la presencia de aglutininas en la circulación.

Reacción de Widal. Ésta es una prueba específica de aglutinación para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. Se practica mezclando gradualmente diluciones cada vez mayores de suero del paciente con una suspensión de bacilos tíficos y observando si hay aglutinación de gérmenes. Como la reacción del suero del paciente no se hace positiva hasta la tercera semana de la infección, esta reacción sólo es útil en los primeros días de la enfermedad.

En estos días primeros es mejor diagnosticar aislando el microorganismo de las heces, preparando una suspensión y ensayando la aglutinación frente a un suero inmunizante específico.

Focos de infección. Heces y orina de personas infectadas o portadores.

Modo de transmisión. Por contacto directo con portadores o pacientes. Alimentos contaminados por los dedos de pacientes tifóidicos o portadores. La fuente más común de epidemias de tifus es la leche contaminada por los trabajadores de las lecherías. Las ostras y mariscos cultivados en aguas contaminadas por desagües de cloacas pueden albergar el microbio. A veces también se producen epidemias por contaminación del agua de manantial por aguas residuales.

Período de incubación. De tres a treinta y cinco días, generalmente de siete a catorce.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Sólo

hasta cierto grado existe inmunidad natural en los adultos. El restablecimiento suele ir seguido de inmunidad adquirida permanente; y se obtiene inmunidad activa artificial, de unos dos años de duración, inoculando bacterina tífica.

Frecuencia. Muy difundida en todo el mundo. Endémica en ciertos sectores rurales de los Estados Unidos, pero limitada actualmente a algunos casos esporádicos y pequeñas epidemias de portadores. Cada vez se hace menos corriente, por efecto de la vigilancia ejercida sobre el agua, los alimentos y la leche y sus derivados.

La vacuna se prepara cultivando en un medio adecuado una cepa lisa recién aislada, suspendiendo el cultivo en solución salina, titulando la suspensión a 1 billón de gérmenes por milímetro, matando los gérmenes a 53° C durante una hora, y conservándolos con tricresol al 0,25 %. Tres inyecciones de la vacuna, a dosis de 500 millones, 1 billón y 1 billón, con intervalos de siete a diez días, suelen ser suficientes para conseguir una inmunidad artificial activa satisfactoria.

Prevención y tratamiento. Protección y depuración de embalses y conducciones de aguas. Eliminación sanitaria de aguas fecales humanas. Pasteurización de la leche y sus productos; inspección de alimentos y mariscos. Defensa contra las moscas y protección de los alimentos que puedan contaminar. Examen periódico de las personas que manipulan vituallas para el consumo público. Inmunización de los vecinos mediante el empleo de una bacterina. Instrucción del público en cuanto a focos de infección y modos de transmisión.

Aislamiento de individuos infectados. Desinfección de todas las excreciones intestinales y urinarias y de los objetos contaminados por ellas. Vacunación de los individuos sensibles entre los allegados del paciente. El empleo oportuno de un agente antibiótico apropiado, bajo vigilancia médica, abrevia el período de contagiosidad y acaba rápidamente con la infección.

Véase más información en Knight y otros (1950), Levaditi, Vaisman y Henry-Eveno (1950).

Salmonella schottmuelleri. Células bacilares, de 0,6 a 0,7 por 2 a 3 μ, sueltas y apareadas; móviles, con flagelos peritricales; gramnegativas.

Enfermedad producida. Es causa de la fiebre paratifoidea en el hombre y de algunos casos de intoxicación alimenticia (pág. 636). La enfermedad no se encuentra naturalmente en animales. Se caracteriza por fiebre persistente, participación de los tejidos linfoides de los intestinos, esplenomegalia, a veces manchas rosadas en el tronco; generalmente coincide con un estado diarreico. Puede haber gérmenes en las heces, la orina o la sangre, y se identifican mediante fermentación y reacciones serológicas.

Focos de infección. Heces y orina de personas infectadas o portadores; agua o alimentos contaminados por excreciones de unas u otros.

Modo de transmisión. Por contacto directo con personas infectadas o con objetos contaminados por sus excreciones; por mediación de agua, alimentos y leche contaminados por enfermos o portadores, o por insectos.

Período de incubación. De uno a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Se cree que hay inmunidad natural en algunas personas; la adquirida suele ser permanente después del restablecimiento. Se desarrolla inmunidad artificial adquírida, por espacio de unos dos años, después de inocular una bacterina.

Frecuencia. Esporádica o en brotes limitados, por contacto con personas infectadas o agua, leche y otros alimentos contaminados.

Prevención y tratamiento. Protección y depuración de abastecimientos de aguas. Eliminación sanitaria de aguas fecales. Pasteurización de la leche y sus productos; inspección de alimentos y mariscos. Protección de alimentos contra las moscas y exterminio de éstas. Examen periódico de individuos que manipulen alimentos para consumo público. Inmunización colectiva con bacterina. Instrucción del público acerca de los focos de infección y modos de transmisión.

Aislamiento de individuos infectados. Desinfección de todas las excreciones intestinales y urinarias y de los objetos contaminados por ellas. Vacunación de las personas sensibles entre los allegados del enfermo. El empleo oportuno de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, abrevia el período de comunicabilidad y acaba rápidamente con la infección.

Salmonella paratyphi. Células bacilares de 0,6 por 3 a 4 μ, sueltas: móviles, con flagelos peritricales; gramnegativas.

Enfermedad producida. Son causa de fiebre paratifoidea en el hombre y de algunos casos de intoxicación alimenticia (pág. 636). No se encuentra esta enfermedad naturalmente en animales. Se caracteriza por fiebre continuada, participación de los tejidos linfoides del intestino, esplenomegalia, a veces manchas rosadas en el tronco; suele ir acompañada de diarreas. El germen se encuentra en las heces, la orina y la sangre, y puede identificarse por fermentación y reacciones serológicas.

Focos de infección. Heces y orina de personas infectadas o portadores; agua o alimentos contaminados por sus excreciones.

Modo de transmisión. Por contacto directo con personas infectadas o con objetos contaminados por sus excreciones; por mediación de agua, alimentos o leche contaminados por excreciones de personas infectadas o portadores, y por insectos.

Período de incubación. De uno a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Se supone que hay inmunidad natural en algunas personas. La inmunidad adquirida suele ser permanente después del restablecimiento. La inoculación de una bacterina proporciona inmunidad artificial activa durante unos dos años.

Frecuencia. Esporádica o en brotes limitados, por contacto con personas infectadas o con agua, leche u otros alimentos contaminados.

Prevención y tratamiento. Protección y depuración de abastecimientos de aguas. Eliminación sanitaria de aguas fecales humanas. Pasteurización de la leche y sus productos; inspección sanitaria de alimentos y mariscos. Protección de alimentos contra las moscas y exterminio de éstas. Reconocimiento periódico de individuos que manipulen alimentos para el consumo público. Inmunización colectiva con bacterina. Instrucción general respecto a focos de infección y modos de transmisión.

Aislamiento de individuos infectados. Desinfección de todas las excreciones intestinales y urinarias y de los objetos contaminados por ellas. Vacunación de las personas sensibles entre los allegados del enfermo. El empleo oportuno de un antibiótico apropiado, bajo vigilancia médica, abrevia el período de comunicabilidad y acaba rápidamente con la infección.

Salmonella typhimurium. Células bacilares de 0,5 por 1 a 1,5 μ, sueltas; móviles, con flagelos peritricales; gramnegativas.

Enfermedad producida. Es causa de intoxicación alimenticia en el hombre y agente patógeno natural para todos los animales de sangre caliente.

Focos de infección. Heces y orina de personas infectadas o portadores; agua o alimentos contaminados por sus excreciones.

Modo de transmisión. Contacto directo con personas infectadas o portadores; agua, alimentos, leche y objetos contaminados con tales excreciones; moscas.

Período de incubación. De uno a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Se supone que son naturalmente inmunes algunas personas. La inmunidad adquirida suele persistir después del restablecimiento. Inoculando una bacterina se consigue una inmunidad artificial activa de unos dos años de duración.

Prevención y tratamiento. Protección y depuración de abastecimientos de aguas. Eliminación sanitaria de aguas fecales humanas. Pasteurización de la leche y sus productos; inspección sanitaria de alimentos y mariscos. Protección de los alimentos contra las moscas y exterminio de éstas. Reconocimiento periódico de individuos que manipulen vituallas destinadas al consumo público. Inmunización colectiva con bacterina. Instrucción general respecto a focos de infección y modos de transmisión.

Aislamiento de individuos infectados. Desinfección de todas las secreciones intestinales y urinarias, y de los objetos contaminados por ellas. Vacunación de las personas sensibles entre los allegados del enfermo. El empleo oportuno de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, abrevia el período de comunicabilidad y acaba rápidamente con la infección.

Salmonella enteritidis. Células bacilares de 0,6 a 0,7 por 2 a 3 μ; se presentan sueltas, en parejas, y a veces en cadenas cortas. Móviles, con flagelos peritricales; gramnegativas.

Enfermedad producida. Causa intoxicaciones alimenticias en el hombre (pág. 636) e infecciones naturales en animales domésticos y salvajes.

La enfermedad se caracteriza generalmente por diarrea aguda, con espasmos abdominales, fiebre, náuseas y vómitos. El germen puede aislarse de heces o del sitio en que se localice la infección durante la fase aguda.

Focos de infección. Heces y orina de personas infectadas o portadores; agua o alimentos contaminados por sus excreciones.

Modo de transmisión. Por contacto directo con personas infectadas, o con objetos contaminados por sus excreciones; por mediación de agua, alimentos y leche contaminados con tales excreciones, y por insectos.

Período de incubación. De uno a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Se supone que hay personas naturalmente inmunes. La inmunidad adquirida suele persistir después del restablecimiento. Mediante inoculación de bacterina se consigue una inmunidad artificial activa de unos dos años de duración.

Frecuencia. Esporádica o en brotes limitados, por contacto con personas infectadas, o con agua, leche y otros alimentos contaminados.

Prevención y tratamiento. Protección y depuración de abastecimientos de aguas. Eliminación sanitaria de aguas fecales humanas. Pasteurización de la leche y sus productos; inspección sanitaria de alimentos y mariscos. Protección de alimentos contra las moscas, y exterminio de éstas. Reconocimiento periódico del personal que manipule alimentos destinados al consumo público. Inmunización colectiva mediante una bacterina. Instrucción general respecto a focos de infección y modos de transmisión.

Aislamiento de los individuos infectados. Desinfección de todas las excreciones intestinales y urinarias, y de los objetos contaminados por ellas.

Vacunación de las personas sensibles entre los allegados del enfermo. El empleo oportuno de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, puede abreviar el período de comunicabilidad y acaba rápidamente con la infección.

SHIGELLA

Los *Shigella* son células bacilares, inmóviles y gramnegativas. Algunas especies son patógenas (ocasionan disentería), y otras solamente parásitas en animales de sangre caliente. Se encuentran en conducciones impurificadas de aguas, y actúan como vectores las moscas.

Shigella dysenteriae. Células bacilares de 0,4 a 0,6 por 1 a 3 μ. Estos microorganismos se diferencian de los *Escherichia* y *Salmonella* por su inmovilidad.

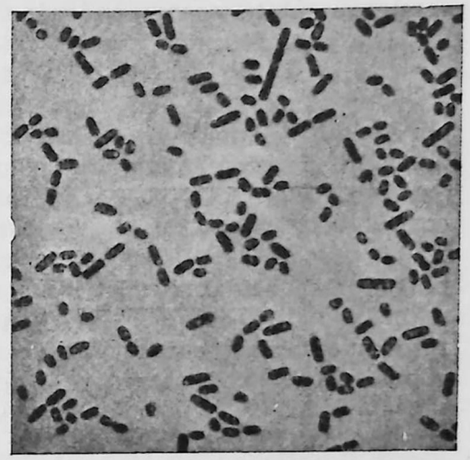


Fig. 246. — *Shigella dysenteriae.* Frotis de un cultivo de 24 horas. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livingstone, Edimburgo, Escocia.)

Enfermedad producida. Es causa de disentería bacilar en el hombre y el mono (fig. 246). Esta enfermedad se caracteriza por su comienzo súbito, acompañado de diarrea, fiebre en algunos casos graves, tenesmo y frecuentes deposiciones mucosanguinolentas.

La *S. dysenteriae* produce una potente exotoxina. Inoculada a conejos, la toxina provoca una parálisis típica y graves lesiones nerviosas, después de un período de incubación de pocas horas a cuatro días. Se cree que las lesiones originadas en el conducto gastrointestinal de personas disentéricas son efecto de la toxina más bien que de la acción directa de los gérmenes.

Portadores. La disentería se puede transmitir de una persona a otra por mediación de portadores, individuos que, después de restablecerse de la dolencia, siguen eliminando bacilos con las heces. Estos gérmenes no son ya patógenos para el portador, pero pueden producir disentería si llegan al conducto intestinal de otras personas.

Focos de infección. Excreciones intestinales de personas infectadas y portadores. Los portadores sanos son corrientes.

Modo de transmisión. Por contacto directo; por ingerir alimentos contaminados; por medio de objetos contaminados por excreciones de personas infectadas o portadores; por beber agua contaminada, y por las moscas. Es más corriente en los meses de verano.

Período de incubación. De uno a siete días, generalmente menos de cuatro.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general; más común y de síntomas más graves en niños que en adultos. El restablecimiento va seguido de una inmunidad adquirida escasa y relativamente breve.

Frecuencia. Puede ser endémica, epidémica o esporádica. Se reprime saneando abastecimientos de agua, pasteurizando la leche y eliminando las aguas residuales higiénicamente. Menudea más en verano.

Prevención y tratamiento. Depuración de abastecimientos públicos de aguas; pasteurización de leche destinada al público; eliminación sanitaria

de aguas sucias; preparación y manipulación higiénicas de géneros alimenticios; reconocimiento periódico de individuos que manipulen estos géneros para el consumo público; exterminio de moscas.

Aislamiento de personas infectadas durante el período de comunicabilidad. El empleo de un antibiótico apropiado, bajo vigilancia médica, abrevia materialmente el referido período.

Véase más información en Weil (1947).

Shigella paradysenteriae. Células bacilares de 0,5 por 1 a 1,5 μ; morfológicamente son como las de *S. dysenteriae.*

Enfermedad producida. Es agente de la disentería en el hombre, y de la diarrea estival en la infancia. Se caracteriza la enfermedad por su comienzo súbito, acompañado de diarrea, a veces fiebre, tenesmo y frecuentes deposiciones mucosanguinolentas. Los síntomas suelen ser algo más ligeros que los de infecciones por *S. dysenteriae.* No produce exotoxina potente.

Portadores. La enfermedad se puede transferir de persona a persona por medio de portadores, individuos que, después de restablecerse de la dolencia, siguen eliminando bacilos con las heces; los gérmenes no son ya patógenos para el portador, pero pueden ocasionar disentería si llegan al conducto intestinal de otra persona.

Focos de infección. Excreciones intestinales de personas infectadas o portadores; son corrientes los portadores sanos.

Modo de infección. Por contacto directo; por comer alimentos contaminados; por mediación de objetos contaminados por excreciones de personas infectadas o portadores; por beber agua contaminada y por moscas.

Período de incubación. De uno a siete días; comúnmente menos de cuatro.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general; menos común, y con síntomas más graves en niños que en adultos. Inmunidad adquirida, ligera y de corta duración después del restablecimiento.

Frecuencia. Puede ser endémica, epidémica o esporádica. Se reprime saneando los abastecimientos de aguas, pasteurizando la leche y eliminando las aguas residuales higiénicamente. Más corriente en los meses de verano.

Prevención y tratamiento. Depuración de aguas de consumo público; pasteurización de la leche; eliminación sanitaria de aguas fecales; preparación y manipulación higiénica de alimentos; reconocimiento periódico del personal que manipule víveres; exterminación de moscas.

Aislamiento de personas infectadas durante el período de contagiosidad. El empleo de un antibiótico apropiado, bajo vigilancia médica, abrevia materialmente el referido período.

Véase más información en Barnes, Dewey, Henry y Cupfer (1947).

Shigella sonnei. Células bacilares.

Enfermedad producida. Es causa de una disentería benigna en el hombre y de diarreas estivales en niños. La enfermedad se caracteriza por su comienzo súbito, acompañado de diarrea, y a veces con fiebre, tenesmo y frecuentes deposiciones. Los síntomas son más ligeros que en infecciones por *S. dysenteriae.*

Portadores. Puede transmitirse la infección de persona a persona, por intermedio de portadores, como se dice de la *S. paradysenteriae.*

Focos de infección. Excreciones intestinales de personas infectadas y portadores. Son corrientes los portadores sanos.

Modo de transmisión. Por contacto directo; por ingerir alimentos o agua infectados; por objetos contaminados por excreciones de personas enfermas o portadores, y por mediación de moscas.

Período de incubación. De uno a siete días; generalmente menos de cuatro.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. La enfermedad es más común y de síntomas más graves en niños que en adultos. Inmunidad adquirida ligera y relativamente breve después del restablecimiento.

Frecuencia. Puede ser endémica, epidémica o esporádica. Se reprime saneando abastecimientos de aguas, pasteurizando la leche y eliminando las aguas residuales por métodos higiénicos. Más corriente en los meses de verano.

Prevención y tratamiento. Depuración de abastecimientos de aguas; pasteurización de la leche destinada al público; eliminación sanitaria de aguas fecales; preparación y manipulación higiénica de víveres, y reconocimiento periódico del personal que interviene en ello; exterminación de moscas.

Aislamiento de las personas infectadas durante el período de comunicabilidad. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, abrevia materialmente el referido período.

STREPTOCOCCUS

Las especies de este género son células esféricas u ovoides, raramente alargadas en bacilos; se presentan apareadas o en cadenas cortas o largas, nunca en paquetes ni en masas de zooglea. Inmóviles, grampositivas, no solubles en bilis; esta última propiedad se aprovecha para distinguir entre estreptococos y neumococos, que se disuelven en la bilis. Las cápsulas son de forma irregular, pero se hacen ostensibles en algunas especies en ciertas condiciones. Apenas medran en medios artificiales; las colonias en agar son pequeñas. En su mayoría son anaerobios facultativos, por excepción anaerobios estrictos. Se encuentran donde haya substancia orgánica que contenga azúcares, y regularmente en la boca y el intestino del hombre y de otros animales, en productos lácteos y en zumos vegetales en fermentación.

Los estreptococos suelen coincidir con diversos estados patológicos, entre ellos erisipela, septicemia, fiebre puerperal, infecciones focales, faringitis, fiebre reumática, escarlatina, tonsilitis, artritis y endocarditis vegetativa.

Clasificación de los estreptococos. Los estreptococos son, entre las bacterias, los más difíciles de clasificar. Una de las clasificaciones más antiguas es la propuesta por Brown (1919), que los dividía en tres grupos, según su efecto en agar-sangre:

1. Estreptococos alfa, que producen una coloración verdosa (formación de metahemoglobina) en el medio, y hemólisis parcial en las proximidades de las colonias.
2. Estreptococos beta, que originan zonas incoloras, completamente hemolizadas, en torno a las colonias.
3. Estreptococos gamma, sin efecto sobre el agar-sangre.

La contribución más importante a los métodos de clasificación de estreptococos es la técnica serológica (prueba de la precipitina) propuesta por Lancefield (1933). A base de este método, los estreptococos se pueden distribuir en los siguientes grupos:

A) *S. pyogenes.* En esta especie se incluyen los microorganismos causantes de escarlatina, erisipela, tonsilitis, fiebre puerperal, septicemia y

faringitis. Son hemolíticos, licuan la fibrina, y no coagulan la leche ni hidrolizan el hipurato sódico.

B) *S. agalactiae.* Esta especie se ha aislado de la mastitis bovina, y en ocasiones de focos humanos. Coagula la leche, hidroliza el hipurato sódico y no licua la fibrina; la mayoría de las cepas son hemolíticas.

C) Incluye tres grupos bioquímicos bastante bien definidos: 1.º, *S. equi*, agente de la papera equina; 2.º, *Streptococcus* «pyogenes animal», y 3.º, *Streptococcus* «C humano». Algunos de estos gérmenes se han aislado de animales, y otros son de origen humano.

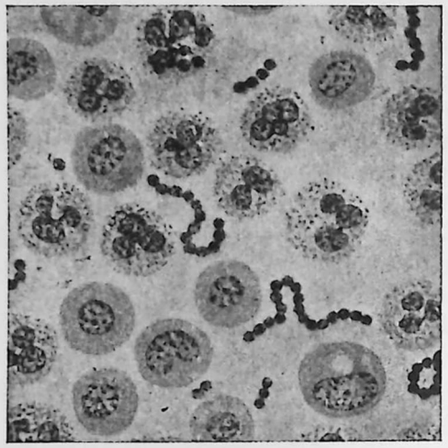


Fig. 247. — *Streptococcus pyogenes.* Frotis de pus humano, con el aspecto típico de estreptococos hemolíticos, mezclados con leucocitos polimorfonucleares y mononucleares. (De Muir, «Bacteriological Atlas», E. y S. Livngstone, Edimburgo, Escocia.)

D) Este grupo comprende tipos hemolíticos y no hemolíticos. El miembro más importante es el *S. zymogenes*; otros, el *S. faecalis* y el *S. liquefaciens*. Por sus estrechas relaciones, algunos autores consideran el *S. zymogenes* y el *S. liquefaciens* como variedades del *S. faecalis*.

E) Este grupo comprende estreptococos no patógenes aislados de la leche. Son hemolíticos, no licuan la fibrina ni hidrolizan el hipurato sódico.

F) Este microorganismo suele encontrarse en gargantas sanas, y a veces se denomina «estreptococo hemolítico diminuto». En placas de agar-sangre, produce colonias puntiformes sumamente pequeñas, con frecuencia apenas visibles, pero rodeadas de una zona de genuina hemólisis.

G) Es un grupo heterogéneo de estreptococos hemolíticos, que se han aislado de la garganta, la nariz, la vagina, la piel y las heces de individuos sanos. No se consideran importantes desde el aspecto de la patogenia.

Streptococcus pyogenes. Células esféricas u ovoides, de 0,6 a 1 μ de diámetro, apareadas o en cadenas. Cápsulas variables, a veces bien desarrolladas y provocables. No hidrolizan el hipurato sódico; producen hemólisis β en placas de agar-sangre. Facultativas y anaerobias.

Enfermedad producida. Se encuentran en la boca, la garganta, las vías respiratorias y exudados inflamatorios. Producen faringitis séptica, septicemia, erisipela, escarlatina, fiebre puerperal, celulitis, mastoiditis, osteomielitis, otitis media, peritonitis y diversas infecciones cutáneas y de heridas (fig. 247).

Focos de infección. Leche contaminada, pus, esputos, excreciones nasales, gotitas de la boca y la nariz, etc.

Modo de transmisión. Por contacto directo; por inhalación de gotitas expelidas al toser, estornudar o hablar; por ingestión de leche contaminada, etc.

Período de incubación. Generalmente, dos a cinco días.

Sensibilidad e inmunidad. La inmunidad contra tipos de un grupo no preserva de infección por tipos de otros grupos. Inmunidad ligera y breve, con excepción de la inmunidad a la escarlatina. Este germen segrega una toxina extracelular contra la cual se produce una antitoxina.

Frecuencia. Más corriente en zonas templadas; menos común en climas semitropicales y tropicales. La mayor frecuencia de la escarlatina y la faringitis estreptocócica se registra al final del invierno y en primavera.

Prevención y tratamiento. Pasteurización de la leche y sus productos. Exclusión de individuos infectados y portadores en la manipulación de alimentos. Cuidado al tratar cortaduras y erosiones.

Aislamiento de individuos infectados. Desinfección de apósitos, excreciones y ropas de estos individuos. Desinfección de pavimentos, tableros de mesas y objetos contaminados. El empleo de un antibiótico apropiado, bajo vigilancia médica, puede abreviar la enfermedad y reducir el período de contagiosidad.

Los filtrados de cultivos de cepas típicas pueden hemolizar eritrocitos. La toxina soluble se llama «hemolisina»; se elaboran dos tipos de hemolisina, una sensible al oxígeno, y otra que lo resiste. En una placa de agar-sangre, los gérmenes producen un tipo de hemólisis conocida generalmente por hemólisis β, de gran utilidad diagnóstica.

Escarlatina. Es una afección febril aguda de la garganta, acompañada de exantema típico. Pueden ser invadidas otras partes del cuerpo, con infección consiguiente del oído, los riñones, etc.

El exantema escarlatinoso se debe a una toxina eritrógena extracelular elaborada por los gérmenes. La inmunidad se refiere más a la toxina que a los microorganismos.

Puede prepararse una antitoxina inmunizando a animales contra filtrados de cultivos de la cepa escarlatinosa de *S. pyogenes*. La administración de la antitoxina a los enfermos influye favorablemente en el desenlace de la infección; la antitoxina neutraliza el efecto pernicioso de la toxina, y con ello abrevia la duración del exantema, cambia el carácter y la extensión de la descamación, y reduce el número de las complicaciones.

La escarlatina se diagnostica por sus síntomas clínicos y por el aislamiento de los gérmenes específicos de la garganta. Para apreciar la sensibilidad a la afección sirve la reacción de Dick, que consiste en la inyección intradérmica de 0,1 ml de toxina de potencia conocida; el resultado se registra a las veinticuatro horas. Una reacción positiva se manifiesta en forma de zona roja brillante, de 1,5 a 3 cm. o más de diámetro, con tumefacción y ablandamiento de la piel.

Se encontrará más información en Chapman (1947), Commission on Acute Respiratory Diseases (1947), Lancefield (1943), Lancefield y Stewart (1944), Pomales-Lebrón y Morales-Otero (1949), Stewart, Lancefield, Wilson y Swift (1944), Watson y Lancefield (1944).

TREPONEMA

Los *Treponema* miden 3 a 18 μ de longitud; hay formas más largas por división incompleta. El protoplasma se dispone en espirales agudas, regulares o irregulares, a veces con filamento terminal. Se cultivan en condiciones estrictamente anaeróbicas. Son patógenos y parásitos en el hombre y en animales; generalmente producen lesiones locales en los tejidos.

Treponema pallidum. Células cilíndricas, con extremos aguzados, de 0,25 a 0,3 por 6 a 14 μ; amplitud de las espiras, 1 μ, regulares; profundidad, 0,5 a 1 μ. Las células parecen consistir en un filamento axil arrollado en espiral; tienen un filamento espiral terminal, fácilmente visible en los cultivos. Multiplicación transversal, a veces también longitudinal. Se cultiva con dificultad, en condiciones estrictamente anaeróbicas, en flúido ascítico con riñón fresco de conejo.

Enfermedad producida. Es causa de la sífilis en el hombre. Esta enfermedad se adquiere casi exclusivamente por contagio sexual. En una infección adquirida, la enfermedad se manifiesta como lesión primaria, que

comienza por una pápula en el sitio de la infección, la cual aumenta de tamaño y termina por ulcerarse. La úlcera suele denominarse chancro sifilítico. A continuación se presentan síntomas constitucionales y lesiones de la piel y las mucosas. Las lesiones secundarias curan al fin y pueden reaparecer dentro de los primeros cinco años siguientes a la infección. Las últimas manifestaciones comprenden a veces trastornos de los sistemas nerviosos vascular y central. En la sífilis congénita sólo se observan manifestaciones secundarias y terciarias o finales.

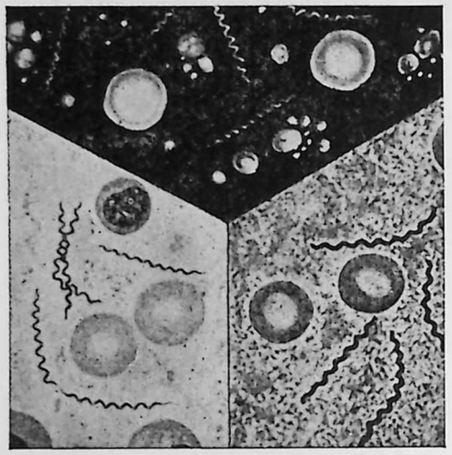


Fig. 248. — *Treponema pallidum*, agente de la sífilis humana. Arriba, exudado de una lesión primaria, vista con iluminación sobre campo oscuro. Izquierda, abajo, frotis de material de un chancro; derecha, abajo, el mismo, obtenido por un método distinto. (De Muir, «Bacteriological Atlas».)

Diagnóstico. En su fase primaria, la afección se puede diagnosticar examinando el exudado seroso de un chancro con iluminación sobre campo oscuro (fig. 248). La presencia de espiroquetas es indicio de infección sifilítica. En fases más avanzadas, puede diagnosticarse mediante reacciones serológicas (pág. 720).

Focos de infección. Exudados de lesiones de la piel y mucosas; sangre de individuos infectados, y rara vez objetos recién contaminados por secreciones.

Modo de transmisión. Por contacto personal directo con un individuo sifilítico, principalmente por intercambio sexual; a veces, al besarse; por instrumentos de odontología, y muy pocas veces por objetos recién contaminados por secreciones. La transmite la madre sifilítica a la criatura por medio de la placenta (sífilis congénita).

Período de incubación. De diez a noventa días; promedio, unos veintiún días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es universal. Se afirma que al restablecimiento sigue inmunidad, aunque se observan reinfecciones.

Frecuencia. Difusión cosmopolita; varía con la edad, el sexo y la raza. Se produce sobre todo entre los dieciocho y los treinta años de edad.

Prevención y tratamiento. Facilidades terapéuticas adecuadas, que comprenden la libre distribución de agentes antibióticos a médicos para atender a todos los casos. Legislación que imponga el reconocimiento prematrimonial. Vigilancia o supresión de mancebías. Instrucción al público acerca de la naturaleza, caracteres, frecuencia, modo de transmisión, manera de evitar la infección y de procurarse tratamiento oportuno en caso de infección. Higiene personal antes o inmediatamente después de intercambio sexual con personas que estén expuestas a infectarse.

Aislamiento de las personas infectadas en el período de contagiosidad. Desinfección de derrames de lesiones abiertas y de objetos contaminados por ellas. El empleo de un antibiótico adecuado, bajo vigilancia médica, abrevia materialmente el período referido, y a su tiempo cura la enfermedad.

Véase más información en Gruhzit y Fisken (1950), Hampp, Scott y Wyckoff (1948), Levaditi y Vaisman (1951), Morton, Rake y Rose (1951), Reynolds y Moore (1947), Stavitsky (1948), y Thomas (1948).

VIBRIO

Los miembros del género *Vibrio* son pequeños bacilos curvos, sueltos o unidos en espirales. Se mueven por medio de un solo flagelo polar, que suele ser relativamente corto; pocas veces se observan dos a tres flagelos en penacho. Los gérmenes se desarrollan bien y rápidamente en la superficie de medios de cultivo corrientes; unos son aerobios, y otros, anaerobios. En su mayoría son formas acuáticas, algunas parásitas.

Vibrio comma. Células bacilares ligeramente curvadas, de 0,3 a 0,6 por 1 a 5 μ, sueltas y en cadenas espirales. Pueden ser largas, finas y delicadas, o cortas y gruesas, y perder su forma curva por cultivo artificial; se mueven por medio de un solo flagelo polar, y no toman el gram.

Los gérmenes toleran una intensa alcalinidad; pH, óptima, 7,6 a 8; para el aislamiento inicial, 9 a 9,6.

Enfermedad producida. Es causa del cólera asiático en el hombre. En casos benignos, la afección puede ocasionar diarrea; en los más graves o típicos, los síntomas, además de diarrea, pueden ser vómitos, deposiciones de «agua de arroz» y signos generales de deshidratación, acompañados de sed, dolor abdominal y coma. Los gérmenes se introducen en la mucosa intestinal y se acumulan en capas junto a la submucosa; pueden ser numerosos en las heces. El curso de la enfermedad es breve, y producen la muerte a veces en término de doce horas después de aparecer los síntomas.

Diagnóstico. El *V. comma* se puede aislar de las heces de individuos infectados y de portadores. La inoculación intraperitoneal de cultivos puros a cobayos los mata en veinticuatro horas.

Portadores. Los individuos convalecientes de la enfermedad suelen continuar eliminando gérmenes con las heces siete a catorce días después del restablecimiento. También hay portadores sanos que eliminan el vibrión colérico sin presentar signos de la dolencia. Los convalecientes y los portadores sanos desempeñan un importante papel en la diseminación de la enfermedad.

Focos de infección. El contenido intestinal y los vómitos de personas infectadas; las heces de convalecientes y de portadores sanos; los alimentos y el agua.

Modo de transmisión. Por el agua y los alimentos; por contacto con personas infectadas, portadores o objetos contaminados por excreciones de unas u otras; por moscas.

Período de incubación. De unas horas o cinco días; generalmente tres días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. La resistencia natural a la infección varía. El acceso clínico confiere una inmunidad transitoria que puede durar varios años. Con vacunas puede producirse una inmunidad artificial activa de seis a doce meses de duración.

Frecuencia. La enfermedad es endémica en la India y los territorios adyacentes del sudeste de Asia. Esto no ocurre en el hemisferio occidental.

Prevención y tratamiento. Eliminación sanitaria de excreciones humanas. Ebullición del agua; pasteurización de la leche y sus productos; preparación y manipulación sanitaria de los alimentos en lugares públicos. Represión o destrucción de moscas. Instrucción del público respecto a higiene personal.

Aislamiento de las personas atacadas por la dolencia. Desinfección de heces y vómitos y de los objetos contaminados por estas excreciones. Los alimentos que deje el paciente han de ser quemados. La habitación ocupada

por el enfermo se limpiará y desinfectará a fondo. También deben ser aislados los portadores. Los grupos de población amenazados deben someterse a vacunación colérica.

Se encontrará más información sobre bacterias patógenas en American Public Health Association (1950), Culbertson y Cowan (1952), Smith y Conant (1952), Topley y Wilson (1946).

REFERENCIAS

American Public Health Association: «The Control of Communicable Diseases in Man», Nueva York, 1950.

Barnes, F. W., M. Dewey, S. S. Henry y H. Cupfer: Chemical detoxification of Flexner dysentery antigen. I. Survey of results, *J. Immunol.*, **56**: 255, 1946.

Beattie, M. I.: Occurrence and distribution of types of *C. diphtheriae*, *Am. J. Pub. Health*, **39**: 1458, 1949.

Birkhaug, K. BCG and the newer epidemiology of tuberculosis, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **24**: 411, 1948.

Branham, S. E.: Serological relationships among meningococci, *Bact. Rev.*, **17**: 175, 1953.

Brown, J. H.: The use of blood agar for the study of streptococci, *Rockefeller Institute for Medical Research*, Nueva York, *Monograf* 9, 1919.

Burdon, K. L.: Dispartiy in appearance of true Hansen's bacilli and cultured «leprosy bacilli» when stained for fat, *J. Bact.*, **52**: 679, 1946.

Chapman, G. H.: The staphylococci, *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **9**: 52, 1946.

—: Relationships of nonhemolytic and viridans streptococci in man, *ibid.*, **10**: 45, 1947.

Christensen, W. B.: Observations on the staining of *Corynebacterium diphteriae*, *Stain Technol.*, **24**: 165, 1949.

Commission on Acute Respiratory Diseases: The role of Lancefield groups of betahemolytic streptococci in respiratory infections, *N. Engl. J. Med.*, **236**: 157, 1947.

Culbertson, J. T.: Symposium on brucellosis Sept. 22-23, 1949, *Science*, **110**: 469, 1949.

— y M. C. Cowan: «Living Agents of Disease», Nueva York, G. P. Putnam's Sons, 1952.

Dean, H. T., y D. E. Singleton: Vincent's infection—A wartime disease, *Am. J. Pub. Health*, **35**: 433, 1945.

Dubos, R. J.: Immunological aspects of BCG vaccination, *Am. Rev. Tuberc.*, **60**: 670, 1949.

Edwards, P. R., D. W. Bruner, y A. B. Moran: The genus *Salmonella*: its occurrence and distribution in the United States, *Kentucky Agric. Exp. Sta., Bull.* 525, 1948.

Eigelsbach, H. T., W. Braun, y R. D. Herring: Studies on the variation of *Bacterium tularense*, *J. Bact.*, **61**: 557, 1951.

Emmart, E. W., y M. I. Smith: The growth and efects of the tubercle bacillus on the chorio-allantoic membrane of the chick embryo, *Pub. Health Reports*, **56**: 1277, 1941.

— y —: The chorio-allantoic membrane of the chick embryo as a medium for testing the virulence of tubercle bacilli, *Am. Rev. Tuberc.*, **47**: 426, 1943.

Erickson, P. T.: Relapse following apparent arrest of leprosy by sulfone therapy, *Pub. Health Reports*, **65**: 1147, 1950.

Feldman, W. H., A. G. Karlson, y H. C. Hinshaw: Dihydrostreptomycin: its effect on experimental tuberculosis, *Am. Rev. Tuberc.*, **58**: 494, 1948.

Felsenfeld, O.: An outline for the identification of salmonellas, *Am. J. Clin. Path.*, **19**: 106, 1949.

Frappier, A., y R. Guy: The use of BCG, *Can. Med. Assoc. J.*, **61**: 18, 1949.

— y —: A new and practical B.C.G. skin test (The B.C.G. scarification test) for the detection of the total tuberculous allergy, *Can. J. Pub. Health*, **41**: 72, 1950

Fredette, V., y A. Frappier: Recherches sur l'immunité dans la gangrène gazeuse, I., *Ext. Rev. can. biol.*, **5**: 428, 1946.

Gruhzit, O. M., y R. A. Fisken: Chloramphenicol (chloromycetin) in experimental syphilis of rabbits, *Am. J. Syphilis Gonorrhea, Venereal Diseases*, **34**: 338, 1950.

Hampp, E. G., D. B. Scott, y R. W. G. Wyckoff: Morphologic characteristics of certain cultured strains of oral spirochetes and *Treponema pallidum* as revealed by the electron microscope, *J. Bact.*, **56**: 755, 1948.

Hanks, J. H.: Three factors wich may influence the experimental transmission of leprosy, *Intern. J. Leprosy*, **18**: 33, 1950.

Hesselbrock, W., y L. Foshay: The morphology of *Bacterium tularense*, *J. Bact.*, **49**: 209, 1945.

Hewitt, L. F.: Virulence and toxigenicity of different serological types of *C. diphtheriae*, *Brit. J. Exp. Path.*, **29**: 181, 1948.

—: Use of antibiotics in the treatment of experimental diphtheria infections, *ibid.*, **31**: 597, 1950.

Hinshaw, H. C., W. H. Feldman, y K. H. Pfuetze: Streptomycin in treatment of clinical tuberculosis, *Am. Rev. Tuberc.*, **54**: 191, 1946.

Huddleson, I. F.: The relation of brucellosis to human welfare, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **48**: 415, 1947.

—: Further observations on the immunizing value of *Brucella* M vaccine against brucellosis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **116**: 50, 1950.

Knight, V., F. R. Sánchez, A. R. Sánchez, S. Shultz, y W. McDermott: Antimicrobial therapy in typhoid, *Arch. Internal Med.*, **85**: 44, 1950.

Lancefield, R. C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci, *J. Exp. Med.*, **57**: 571, 1933.

—: Studies on the antigenic composition of Group A hemolytic streptococci. I. Effects of proteolytic enzymes on streptococcal cells, *ibid.*, **78**: 465, 1943.

— y W. A. Stewart: Studies on the antigenic composition of Group A hemolytic streptococci. II. The occurrence of strains in a given type containing M but no T antigen, *ibid.*, **79**: 197, 1944.

Levaditi, C.: Étude experimentale de l'activité curative antituberculeuse des antibiotiques d'origine fungique ou végétale, *Schweiz. Z. Pathol. Bakteriol.*, **12**: 557, 1949.

— y H. Chaigneau-Erhard: Activité anti-microbienne de la streptomycine, de l'acide p-aminosalicylique et de la diaminodiphényl-sulfone chez les souris contaminées par le bacille de Stefanski, *Compt. rend. soc. biol.*, **145**: 328, 1951.

— y A. Vaisman: La terramycine nouvelle médication anti-syphilitique, *La Presse médicale*, **41**: 894, 1951.

—, —, H. Chaigneau, y J. Henry-Eveno: Effets anti-tuberculeux du p-aminosalicylate de streptomycine, *Ann. inst. Pasteur*, **79**: 886, 1950.

—, —, y J. Henry-Eveno: Action du chloramphénicol synthétique (tifomycine) sur le bacille typhique *(Eberthella typhosa)*, *La Presse médicale*, **38**: 665, 1950.

Malmros, H.: Late primary infection and BCG vaccination, *Am. Rev. Tuberc.*, **56**: 267, 1947.

Morton, H. E., G. Rake, y N. R. Rose: Electron microscope studies of treponemes, III. Flagella, *Am. J. Syphilis Gonorrhea, Venereal Diseases*, **35**: 503, 1951.

Overend, W. G., M. Stacey, M. Webb, y J. Ungar: The solation of desoxyribonucleic acid from virulent and avirulent strains of *Haemophilus pertussis*, *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 268, 1951.

Payne, E. H., M. Levy, G. M. Zamora, M. S. Vilarroel, y E. Z. Canelas: Pertussis treated with chloramphenicol, *J. Am. Med. Assoc.*, **141**: 1298, 1949.

—, —, E. Z. Canelas, G. M. Zamora, y M. S. Vilarroel: Chloromycetin as a treatment for pertussis, *J. Mich. State Med. Soc.*, **49**: 450, 1950.

Pfuetze, K. H., R. P. Glover, E. F. White, W. H. Feldman, y H. C. Hinshaw: Clinical use of streptomycin in the treatment of tuberculosis, *J. Am. Coll. of Chets Phys.*, **12**: 3, 1946.

Pomales- Lebrón, A., y P. Morales-Otero: Dissociation among Lancefield's group «B» streptococci of human and bovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**: 612, 1949.

Pottenger, F. M.: «Tuberculosis: A Discussion of Phthisiogenesis, Immunology, Pathologic Physiology, Diagnosis, and Treatment», St. Louis, The C. V. Mosby Company, Medical Publishers, 1948.
Prior, J. A.: The control and treatment of brucellosis, *Ohio State Med. J.*, **46**: 455, 1950.
Ralston, R. J., y E. H. Payne: Treatment of chronic brucellosis with chloramphenicol and aureomycin, *J. Am. Med. Assoc.*, **142**: 159, 1950.
Reynolds, F. W., y J. E. Moore: Syphilis: A review of the recent literature, *Arch. Inter. Med.*, **78**: 592, 733, 1946; **79**: 92, 1947.
Rosenthal, S. R., E. I. Leslie, y E. Loewinsohn BCG vaccination in all age groups, *J. Am. Med. Assoc.*, **136**: 73, 1948.
Saint-Martin, M.: Use of Mueller's potassium tellurite medium in the detection of *Corynebacterium diphtheriae*, *Can. J. Pub. Health.*, **39**: 148, 1948.
Smith, L. De S.: Clostridia in gas gangrene, *Bact. Rev.*, **13**: 233, 1949.
Smith, D. T., y N. F. Conant: «Zinsser's Textbook of Bacteriology», Nueva York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1952.
Stavitsky, A. B.: Characteristics of pathogenic spirochetes and spirochetoses with special reference to the mechanisms of host resistance, *Bact. Rev.*, **12**: 203, 1948.
Stewart, W. A., R. C. Lancefield, A. T. Wilson, y H. F. Swift: Studies on the antigenic composition of Group A hemolytic streptococci. IV. Related T but distinct M antigens in types 15, 17, 19, 23, 30, and in types 4, 24, 26, 28, 29, 46. Identification by slide agglutination, *J. Ewp. Med.*, **79**: 99, 1944.
Thomas, E. W.: Recent developments in the treatment of syphilis, *Am. J. Pub. Health*, **38**: 1361, 1948.
Topley, W. W. C., y G. S. Wilson: «The Principles of Bacteriology and Immunity», Baltimore, Williams & Wilkins, 1946.
Watson, R. F., y R. C. Lancefield: Studies on the antigenic composition of Group A hemolytic streptococci. III. Types with serologically identical M but distinct T antigens: types 10 and 12. *J. Exp. Med.*, **79**: 89, 1944.
Weil, A. J.: Dysentery: a progress report for the years 1942 to 1946, *J. Immunol.*, **55**: 363, 1947.
Welsch, M., y J. Thibaut: A study of corynebacteria from human sources, and especially of their sensitivity to antibiotics *Antonie van Leeuwenhoek*, **14**: 193, 1948.

CAPÍTULO XXVII

VIRUS BACTERIANOS

Un virus se puede definir como una unidad exógena submicroscópica que sólo puede multiplicarse dentro de células específicas. Los virus bacterianos son agentes que invaden células de bacterias o viven parásitos en ellas.

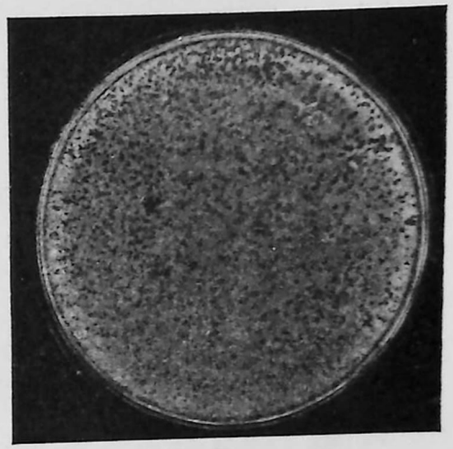


Fig. 249. — Se sembró en agar fundido una mezcla de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus y bacteriófago* específico, y se incubó después. Las zonas claras o placas representan espacios en que el bacteriófago ha englobado la vegetación.

Twort (1915) observó ciertas zonas transparentes en un cultivo de *Micrococcus* exento de vegetación bacteriana. Comprobó que tocando esas zonas con un asa de inoculación, y trazando luego estrías con ella en la superficie de un cultivo en agar de la misma especie de *Micrococcus*, se formaban zonas límpidas y transparentes a lo largo de las estrías. También observó que pasando el material de tales zonas por un filtro de Berkefeld, el filtrado contenía una substancia capaz de disolver un cultivo en caldo de los gérmenes. Esta acción lítica resultó ser transmisible en serie.

D'Herelle (1917), con independencia de Twort, observó el mismo fenómeno, y dio al principio lítico el nombre de bacteriófago (fig. 249). Esta palabra se reduce algunas veces por abreviación a «fago», y significa literalmente «agente que ingiere bacterias». En la actualidad, los bacteriófagos se denominan en general virus bacterianos, por poseer características similares a las de virus vegetales y animales.

Distribución del bacteriófago. Los bacteriófagos son parásitos obligados, y dependen de bacterias vivas para subsistir. Se encuentran naturalmente donde están sus huéspedes. Bacteriófagos dotados de actividad contra las bacterias intestinales se han obtenido de heces humanas, aguas residuales, moscas domésticas trituradas, heces de polluelos y otros animales. Los hay en el suelo, en materia vegetal en descomposición y también se han aislado de cultivos viejos de laboratorio; muchos cultivos permanentes o de repuesto contienen un bacteriófago de cualquier clase.

Algunas cepas de una especie bacteriana pueden tener un bacteriófago que no disuelva los microorganismos. Separando el principio lítico por filtración se obtiene una solución capaz de disolver cepas sensibles de la misma especie.

Se han aislado y estudiado bacteriófagos en número muy crecido. Son más o menos específicos, por afectar a una sola especie o a especies o tipos muy afines. Los gérmenes dotados de características inmunológicas análogas suelen ser disueltos por el mismo bacteriófago. Las normas principales aplicadas para su diferenciación se basan en el carácter de las placas que forman, el tamaño de las partículas de virus, las reacciones serológicas y la morfología que permiten apreciar micrografías electrónicas.

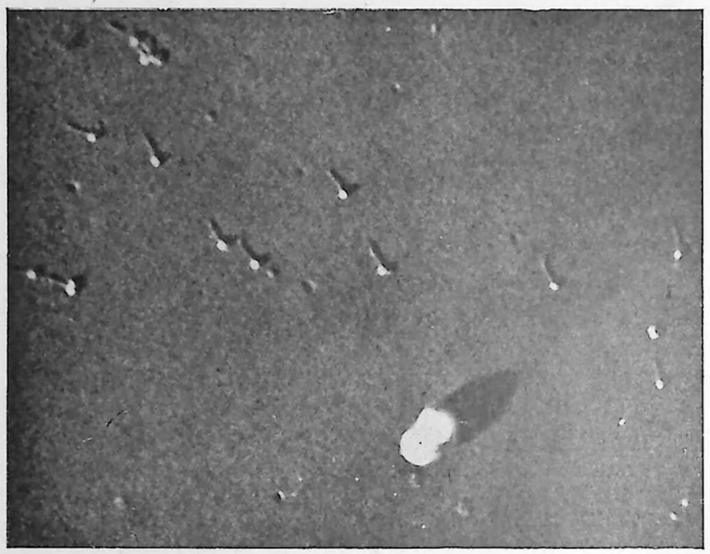


Fig. 250. — Micrografía electrónica de una muestra en gota de mezcla de bacteriófago T1 y látex. Aumento: 1: 15.500. (Según Luria, Williams y Backus.)

Características del bacteriófago. Se afirma que sólo se reproduce en presencia de células vivas. No aumenta en ausencia de bacterias sensibles, ni en presencia de bacterias muertas. Generalmente se cree que la multiplicación del bacteriófago requiere que haya células jóvenes, vegetantes; sin embargo, Price (1947) descubrió que la penicilina impide el desarrollo del *Staphylococcus muscae,* aunque no produce efecto alguno sobre la formación del bacteriófago. El virus parece aumentar 100 000 veces en cultivos de bacterias, después de ser totalmente detenida la multiplicación por el antibiótico.

En la mayoría de los casos, el desarrollo del bacteriófago acarrea finalmente lisis de las células bacterianas, fenómeno que se manifiesta por una aclaración del medio de cultivo. No hay multiplicación alguna en cultivos viejos o en suspensiones de bacterias remanentes.

Gran parte del trabajo acerca de bacteriófagos se ha efectuado a

base de una cepa inmóvil de *Escherichia coli,* sensible a siete cepas de virus numeradas del T1 al T7. El virus T1 es esférico, con una delgada cola (fig. 250); la cabeza mide 50 mμ de diámetro, y la cola, 150×15 mμ

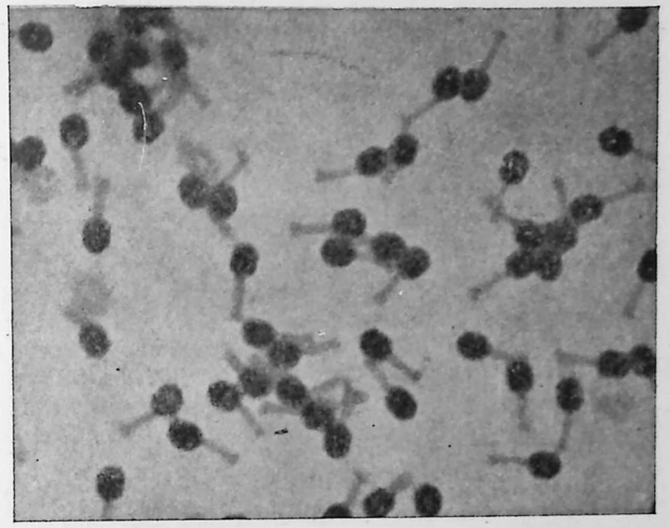


Fig. 251. — Micrografía electrónica de bacteriófago T2 de un lisado en caldo de *Escherichia coli,* a 41.000 diámetros. (Según Hook, Beard, Taylor, Sharp y Beard.)

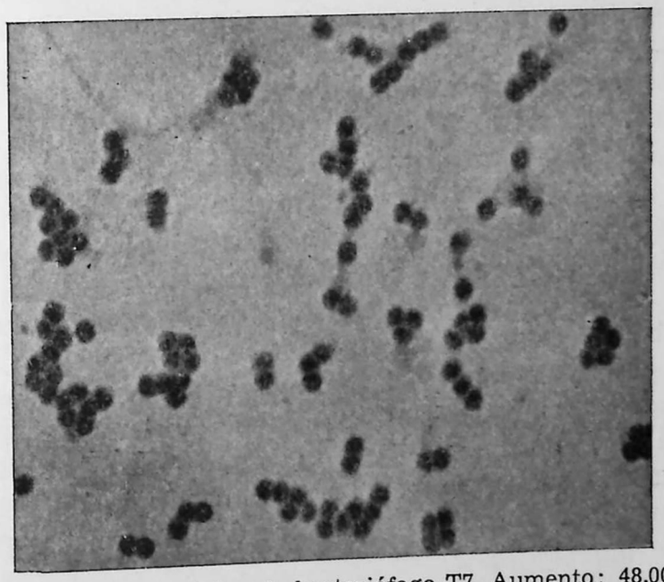


Fig. 252.—Micrografía electrónica de bacteriófago T7. Aumento: 48.000 diámetros. (Según Kerby, Gowdy, Dillon, Dillon, Csáky, Sharp y Beard.)

Los corpúsculos de virus T2 tienen forma de renacuajo, con cabeza grande, y constituyen en lo esencial bacilos cortos con extremos cónicos o redondeados, de 80 mμ de longitud y 65 mμ de anchura, y una cola delgada de 120 mμ de largo y 20 mμ de ancho, terminada en una especie de borla o disco (fig. 251). Las partículas de virus T4 se componen también de cabeza y cola; la primera es elipsoidal, con 80 y 60 mμ de

diámetro mayor y menor; la cola parece estar constituida por fibras delgadas reunidas, que se ensanchan o apartan para producir el abultamiento apreciable en el extremo de muchas de ellas. Las partículas del virus T7 son casi esféricas, y miden 51 mμ de diámetro (fig. 252). En las figuras 253 y 254 se exponen otros corpúsculos víricos provistos de cola, con actividad contra el *Corynebacterium diphtheriae* y el *Streptomyces griseus*.

En las cabezas de bacteriófagos T2 se aprecian zonas densas que semejan estructuras diferenciales en cuerpos elementales de virus de vacuna. Se ha sugerido que tales zonas representan nucleoproteína de gran densidad.

Véase más información en Freeman (1951), Hook, Beard, Taylor, Sharp y Beard (1946), Kerby, Gowdy, Dillon, Dillon, Csáky, Sharp y Beard (1949), Luria, Williams y Backus (1951), Parmelee, Carr y Nelson (1949), y Wyckoff (1948).

Formación del bacteriófago. Se supone que los virus bacterianos se forman como sigue: En la primera fase, las partículas de virus se adsorben en la célula, y cesa la proliferación de ésta; el período de adsorción varía según el virus, y puede ser de dos a diez minutos. Las células viejas requieren más tiempo que las jóvenes para adsorber partículas de virus, y algunos de éstos necesitan que haya triptófano en el medio para ser adsorbidos en la bacteria huésped.

Durante la segunda fase, las partículas de virus invaden las bacterias y aumentan en número. Se sabe poco acerca de cómo se forman corpúsculos bacteriófagos en el interior de una célula; allí no es posible estudiarlos hasta que la célula se disuelve y los corpúsculos quedan libres. Micrografías electrónicas de bacterias muestran las células llenas de partículas de virus antes de la lisis.

En un determinado momento (tercera fase), la célula estalla, y deja en libertad las partículas de virus (fig. 255); el tiempo necesario para ello es característico de cada virus, y se denomina período latente mínimo. El número de partículas de bacteriófago liberadas por cada célula varía mucho, aun para el mismo virus: las infectadas por bacteriófago T1 pueden soltar 20 a 1000 partículas de virus en unos trece minutos, sea cualquiera el número de las formadas dentro de la célula.

En general, las partículas de virus no se desprenden sino después de disuelta la bacteria hospedante. En ciertos sistemas de bacteriófago, las segrega probablemente una célula intacta, y esta producción de virus sin bacteriólisis se llama lisogénesis; no se sabe cómo son liberados los corpúsculos.

Ehrlich y Watson (1949) señalaron que el *Bacillus megatherium* podía multiplicarse con virus dentro de las células, y que estas células infectadas resistían a la lisis por virus externos. La adición de glucosa



Fig. 253. — Micrografía electrónica de bacteriófagos activos contra *Corynebacterium diphtheriae*. Aumento: 30.000 diámetros. (Según Freemna.)



Fig. 254. — Micrografía electrónica de bacteriófagos de *Streptomyces griseus*. Aumento: 45.000 diámetros. (Con licencia de Eli Lilly & Co.)

a un medio rico en nitrógeno hacía perder a la célula infectada sus virus internos y volver así al estado sensible, lo cual coincidía con una desaparición de los virus externos; es decir, que las células sensibles no sintetizaban más virus.

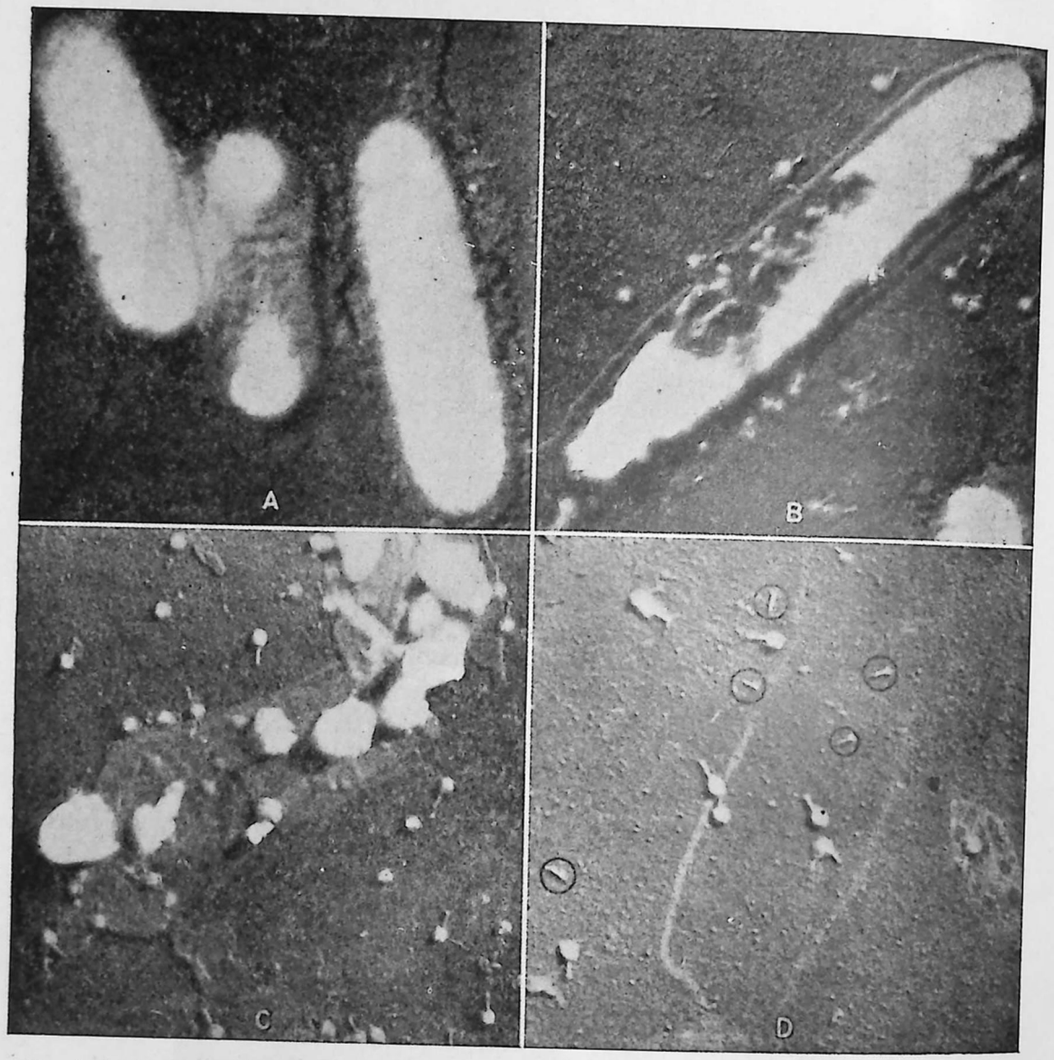


Fig. 255. — Micrografia electrónica de *Escherichia coli* infectadas por bacteriófagos. A, células normales inmediatamente después de agregar virus a la suspensión; B, célula 75 minutos después de la infección; C, célula 120 minutos después de la infección; D, célula 5 horas después de la infección. (Según Hedén.)

Clark y Cowles (1952) suponían que la liberación de bacteriófagos por una capa lisógena de *B. megatherium* guardaba relación con la lisis de ciertas células de cultivo. Tal liberación no era continua, sino por brotes. Las células que experimentaban lisis se denominaron sensibles, y se observó que surgían con un ritmo regular.

Véase más información en Bertani (1951).

Composición del bacteriófago. Los bacteriófagos estudiados parecen estar constituidos por dos componentes principales, proteína y ácido desoxirribonucleico, el último en proporción aproximada de 40 % del peso en seco de la partícula. Estos componentes se sintetizan a partir de materiales del medio de cultivo, y no de un precursor contenido en la célula bacteriana. En este aspecto, los bacteriófagos difieren de las bacterias, que contienen ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico.

Cohen (1949) informó que el aminoácido triptófano se encuentra en los bacteriófagos T2 y T4, y que debe existir en el ambiente para que sea posible sintetizar los componentes de los virus.

Labaw (1951) ha empleado un método de trazador radiactivo, y comprobó que, con los bacteriófagos T2r, T4r y T6r de *E. coli,* la célula contenía 20 a 30 % del fósforo de las partículas de virus antes de que éstas la infectaran; el otro 70 a 80 % deriva del fósforo inorgánico del medio. Con los virus T3 y T7, las condiciones se invierten, y las bacterias hospedantes proporcionan un 80 % del fósforo del bacteriófago.

Véase más información en Anderson (1948 *a, b*), Cohen (1948 *a, b*; 1949, 1951), Polson y Wyckoff (1948), y Price (1948 *a, b*; 1949 *a, b*).

Cambios citológicos en células infectadas por bacteriófagos. Boyd (1949 *a*) ha investigado los virus de *Salmonella typhimurium,* y comprobado que los bacteriófagos se pueden dividir en dos grupos. Los miembros del primer grupo producen siempre lisis de los microorganismos que infectan; las bacterias no quedan permanentemente infectadas o lisógenas; las células se hinchan visiblemente antes del fenómeno de la lisis. Los miembros del segundo grupo producen una infección inofensiva de las células, que, en condiciones naturales, persisten indefinidamente; estos microorganismos infectados se vuelven lisógenos.

Murray, Guillen y Heagy (1950) han determinado la sucesión de los cambios que se desarrollan en la *E. coli* B infectada por bacteriófago T2r. En preparaciones teñidas con colorante de Giemsa, el primer cambio es la aparición de células marginadas, en las que la cromatina de cada cuerpo nuclear se halla distribuida a lo largo de la membrana citoplasmática adyacente; estas células son sustituidas por otras granulares, con la cromatina irregularmente distribuida. Los gránulos aumentan de tamaño y densidad, hasta que las células se disuelven. Con preparaciones teñidas mediante tionina se confirma el cambio inicial antes descrito; luego disminuye la capacidad de coloración del citoplasma y se pierde casi por entero en el momento de la lisis.

Para más información, véanse Boyd (1949 *b*), Luria y Human (1950).

Identificación de bacterias por el bacteriófago. Craigie y Yen han desarrollado un método útil para clasificar cepas de *Salmonella typhosa* por medio de bacteriófagos Vi. Ciertas preparaciones específicas Vi permiten identificar diferentes tipos de imposible demostración por ningún método serológico. La técnica se ha adoptado como habitual en muchos laboratorios, y ha resultado de gran valor médico y epidemiológico, especialmente por lo que concierne a gérmenes entéricos, estreptococos, micrococos, etc.

Técnica del desarrollo de bacteriófagos. Thomas (1947) ha informado que el extracto de granos de avena servía para desarrollar bacteriófagos de muchos microorganismos. El método es el siguiente: Se ponen 100 g de avena en un vaso, y se añaden 300 ml de agua destilada; se agita durante unos minutos, y se vierte el líquido sobre un filtro de alambre. Se remojan las semillas lavadas en 1950 ml de agua destilada, y se llevan a una nevera, donde permanecen dos a tres días. El contenido se vierte en un pasador, para recuperar el extracto, de color oscuro.

El extracto de avena se esteriliza pasándolo por un filtro bacteriológico. Para desarrollar un bacteriófago se utiliza un medio líquido cualquiera que permita desarrollarse bien al microorganismo correspondiente. Se inoculan tres tubos del medio con tres gotas de un cultivo de 18 a 24 horas de *E. coli*; uno de los tubos sirve de contraste. Al segundo tubo se añaden tres gotas de extracto de avena esterilizado, y al tercer tubo, 1 ml de extracto de avena. Los cultivos se incuban durante 18 a 20 horas, y se examina su turbiedad. El tubo testigo debe mostrar desarrollo normal, y en los otros dos, la transparencia debe ser total o poco menos.

Para más información, véanse Craigie y Félix (1947), Desranleau (1947), Félix y Callow (1951), Katznelson y Sutton (1951).

Antigenicidad del bacteriófago. Los bacteriófagos son antígenos, pues estimulan la producción de anticuerpos al introducirlos en un microorganismo animal. La actividad del bacteriófago se interrumpe al añadir el antisuero homólogo. Los virus bacterianos son serológicamente distintos de sus células hospedantes. Por lo que se sabe (Anderson, 1949), el antisuero de una bacteria no reacciona con los virus que son activos con relación a ella. Los bacteriófagos son serológicamente heterogéneos, pero se pueden clasificar en varios grupos distintos.

Utilidad terapéutica del bacteriófago. Al descubrirse los bacteriófagos se pensó que habrían de ser de gran utilidad terapéutica. Puesto que las partículas de virus disuelven fácilmente microorganismos *in vitro*, era natural creer que podrían hacerlo también *in vivo*. Hace unos años, era corriente que los médicos prescribieran bacteriófagos para muchos tipos de infecciones; por desgracia, las observaciones clínicas no han confirmado el supuesto, y es probable que los bacteriófagos no influyan apreciablemente en el desenlace de las infecciones. Su empleo con esta finalidad ha decaído mucho.

Más información sobre virus bacterianos se encontrará en Anderson (1949), Benzer (1952), Delbrück y otros (1950), Dulbecco (1952 *a*, *b*), Hedén (1951), Luria (1953), y Watson (1952).

REFERENCIAS

Anderson, T. F.: The activation of the bacterial virus T4 by *l*-tryptophan, *J. Bact.*, **55**: 637, 1948*a*.

—: The inheritance of requirements for adsorption cofactors in the bacterial virus T4, *ibid.*, **55**: 651, 1948*b*.

—: The reactions of bacterial viruses with their host cells, *Bot. Rev.*, **15**: 464, 1949.

Benzer, S.: Resistance to ultraviolet ligth as an index to the reproduction of bacteriophage, *J. Bact.*, **63**: 59, 1952.

Bertani, G.: Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bact.*, **62**: 293, 1951.

Boyd, J. S. K.: Morphological changes in bacteriophage-infected organisms as revealed by phase-contrast illumination, *J. Path. Bact.*, **61**: 127, 1949*a*.

—: Development of bacteriophage in *Escherichia coli* B, *Nature*, **164**: 874, 1949*b*.

Clarke, N. A., y P. B. Cowles: Studies on host-virus relationship in a lysogenic strain of *Bacillus megaterium*. I. The relationship between growth and bacteriophage production in cultures of *Bacillus megatherium*, *J. Bact.*, **63**: 177, 1952.

Cohen, S. S.: The synthesis of bacterial viruses. I. The synthesis of nucleic acid and protein in *Escherichia coli* B infected with T2 + bacteriophage, *J. Biol. Chem.*, **174**: 281, 1948*a*; II. The origen of the phosphorus found in the desoxyribonucleic acids of the T2 and T4 bacteriophages, *ibid.*, **174**: 295, 1948*b*.

—: Growth requirements of bacterial viruses, *Bact. Rev.*, **13**: 1, 1949.

—: The synthesis of nucleic acid by virus-infected bacteria, *ibid.*, **15**: 131, 1951.

Craigie, J., y A. Félix: Typing of typhoid bacilli with Vi bacteriophage, *Lancet*, **1**: 823, 1947.

D'Herelle, F.: «The Bacteriophage and Its Clinical Application», Springfield, Ill., Charles C. Thomas, Publisher, 1930.

Delbrück, M., y otros: «Viruses», Pasadena, California Institute of Technology, 1950.

Desranieau, J.-M.: Typing of *Bact. typhosum* and *Bact. paratyphosum* B by means of bacteriophage, *Can. J. Pub. Health*, **38**: 343, 1947.

Dulbecco, R.: A critical test of the recombination theory of multiplicity reactivation, *J. Bact.*, **3**: 199, 1952*a*.

—: Mutual exclusion between related phages, *ibid.*, **63**: 209, 1952.

Ehrlich, H. L., y D. W. Watson: Lysogenesis of *Bacillus megatherium*, *J. Bact.*, **58**: 627, 1949.

Félix, A., y B. R. Callow: Paratyphoid-B Vi-phage typing, *Lancet*, pág. 10, 7 de julio de 1951.

Freeman, V. J.: Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*, *J. Bact.*, **61**: 675, 1951.

Hedén, C.-G.: Studies of the infection of *E. coli* B with the bacteriophage T2, *Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl.* 88, 1951.

Hook, A. E., D. Beard, A. R. Taylor, D. G. Sharp, y J. W. Beard: Isolation and characterization of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **165**: 241, 1946.

Katznelson, H., y M. D. Sutton: A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demostration of internally borne bacterial infections of seed, *J. Bact.*, **61**: 689, 1951.

Kerby, G. P., R. A. Gowdy, E. S. Dillon, M. L. Dillon, T. Z. Csáky, D. G. Sharp, y J. W. Beard: Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*, *J. Immunol.*, **63**: 93, 1949.
Labaw, L. W.: The origin of phosphorus in *Escherichia coli* bacteriophages, *J. Bact.*, **62**: 169, 1951.
Luria, S. E.: «General Virology», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1953.
—, y M. L. Human: Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection, *J. Bact.*, **59**: 551, 1950.
—, R. C. Williams, y R. C. Backus: Electron micrographic counts of bacteriophage particles, *ibíd.*, **61**: 179, 1951.
Murray, R. G. E., D. H. Gillen, y F. C. Heagy: Cytological changes in *Escherichia coli* produced by infection with phage T2, *J. Bact.*, **59**: 603, 1950.
Parmelee, C. E., P. H. Carr, y F. E. Nelson: Electron microscope studies of bacteriophage active against *Streptococcus lactis*, *J. Bact.*, **57**: 391, 1949.
Polson, A., y R. W. G. Wyckoff: The amino acid content of bacteriophage, *Science*, **108**: 501, 1948.
Price, W. H.: Bacteriophage formation without bacterial growth. I. Formation of *Staphylococcus* phage in the presence of bacteria inhibited by penicillin, *J. Gen. Physiol.*, **31**: 119, 1947.
—: Bacterial viruses (bacteriophages), *Sci. Monthly*, **67**: 124, 1948*a*.
—: Phage formation in *Staphylococcus muscae* cultures. III. The competition between host and virus for a nutrient, *J. Gen. Physiol.*, **32**: 213, 1948*b*; IV. The effect of the yeast fraction on virus synthesis, *ibíd.*, **32**: 301, 1949*a*; VI. Nucleic acid synthesis during virus formation, *ibíd.*, **33**: 17, 1949*b*.
Thomas, R. C.: The bacteriophage reaction for the identification of bacteria, *Ohio Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 11, 1947.
Watson, J. D.: The properties of X-ray inactivated bacteriophage. II, Inactivation by indirect effects, *J. Bact.*, **63**: 473, 1952.
Wyckoff, R. W. G.: The electron microscopy of developing bacteriophage. II. Growth of T4 in liquid culture, *Biochim. et Biophys. Acta*, **2**: 246, 1948.

CAPÍTULO XXVIII

BACTERIAS Y ENFERMEDADES BACTERIANAS DE PLANTAS

BACTERIAS DE PLANTAS

La primera observación acerca de una enfermedad bacteriana de plantas se remonta al trabajo de Burrill (1881), quien descubrió el germen causante de la roña del peral. Así lo confirmó Waite (1891), quien aisló el agente etiológico y demostró su patogenicidad. Desde entonces, se han aislado y estudiado numerosas bacterias patógenas de plantas; puede suponerse que son tantas las enfermedades bacterianas en plantas como en el hombre y los animales.

Antes de que un microorganismo se pueda considerar definitivamente como causa de una enfermedad vegetal, hay que aislarlo del tejido de la planta y probar su patogenicidad de modo irrefutable. Koch (1883) estableció ciertos requisitos que deben satisfacerse antes de afirmar que un microorganismo produce una enfermedad específica, y han sido aceptados por los especialistas en afecciones de ambos reinos; son los siguientes:

1.º El microorganismo tiene que estar asociado consecuentemente con la enfermedad de que se trate.
2.º Se ha de aislar en cultivo puro y describir minuciosamente.
3.º El cultivo puro del microbio, inoculado a plantas sanas, ha de ser capaz de reproducir la enfermedad.
4.º El microorganismo se ha de reaislar del tejido vegetal enfermo y debe mostrarse idéntico a la especie original.

Las enfermedades bacterianas de las plantas se pueden distribuir en cinco grupos, según la localización y el carácter de las lesiones que produzcan, a saber: 1.º, podredumbre blanda; 2.º, enfermedades vasculares o agostamientos; 3.º, royas o roñas; 4.º, enfermedades por intumescencia, y 5.º, lesiones locales o manchas.

Los microorganismos que producen podredumbre blanda reducen el tejido vegetal a una masa blanda, muy húmeda, pulposa, estado que puede definirse mejor como podredumbre. El ataque bacteriano puede ser o no obra de un germen específico.

Los microbios causantes de la podredumbre húmeda difieren de las otras formas encontradas en el suelo en que pueden atacar tejidos vegetales sanos por secreción de una enzima extracelular, la cual disuelve la pectina, especie de cemento que une entre sí las células de la planta. La reacción, probablemente hidrolítica, deja en libertad azúcares solubles, que la bacteria aprovecha como alimento; el resultado es que la planta se reduce a una masa de células sueltas, que más tarde se convierten en materia mucilaginosa o pulposa.

En la mayoría de los casos, el microorganismo específico va acompañado o seguido de cerca de muchas bacterias terrícolas y hongos saprófitos. Estos gérmenes encuentran un ambiente favorable en las células expuestas, producen cantidades relativamente grandes de amoníaco, por desaminación de los aminoácidos presentes en las proteínas de los tejidos vegetales muertos. El amoníaco destruye las células contiguas, y reduce rápidamente la planta a una pulpa glutinosa maloliente; el hedor proviene de los invasores secundarios. Las plantas destruidas por cultivos puros del microorganismo patógeno específico no desprenden olores desagradables.

Los géneros causantes de la podredumbre blanda pertenecen al género *Erwinia* (pág. 467). Invaden los tejidos de plantas vivas para producir la enfermedad y se elabora la enzima protopectinasa, que destruye la substancia laminar intermedia de los vegetales.

Las especies importantes productoras de podredumbre blanda comprenden: *E. aroideae,* causa de esta afección en calas, patatas, berenjenas, coliflores, rábanos, pepinos, coles, chirivía, nabos y tomates; *E. atroseptica,* productora del ennegrecimiento o gangrena de tallos y tubérculos de patatas y otros vegetales; *E. betivora,* agente etiológico de la podredumbre de la remolacha azucarera en Corea; *E. carotovora,* agente causal de la podredumbre blanda de zanahorias, coles, opio, pepinos, berenjenas, lirios, melones, jacinto, cebolla, chirivía, pimientos, patatas, rábanos, tomates, nabos y otras plantas; *E. cytolytica,* que pudre el tallo y los tubérculos de la dalia; *E. dissolvens,* agente etiológico de la podredumbre de tallos de cereales; *E. erivanensis,* causa de la podredumbre de la raíz del algodón; *E. flavida,* productor de la podredumbre blanda de la caña de azúcar, y *E. rhapontici,* que pudre las sumidades del ruibarbo.

Existen muchas pruebas de que el grupo se compone de una sola especie variable, *E. carotovora.* Elrod (1941 *a, b*), Dowson (1939, 1941), Jones (1950), y otros, han observado una estrecha relación de estos microorganismos con los miembros del grupo coliforme (pág. 573).

Véase más información en Starr y Mandel (1950), y Taylor (1951).

Enfermedades vasculares o agostamientos. Los agostamientos bacterianos constituyen un grupo de enfermedades muy importantes y destructoras de los vegetales. Los gérmenes infecciosos se multiplican y acumulan en gran número en el sistema vascular, e interrumpen la circulación de la savia; si la interrupción es completa, la planta se marchita rápidamente, y si es parcial, se desarrolla una planta enfermiza, que medra poco y termina por morir. En algunos casos, la muerte es obra de invasores secundarios.

Entre los gérmenes de importancia que producen enfermedades vasculares se cuentan los siguientes: *Bacterium stewartii,* causa del agostamiento del maíz; *Corynebacterium insidiosum,* agente de la enfermedad vascular de la alfalfa; *C. michiganense,* que produce el cáncer del tomate; *Erwinia tracheiphila,* agente etiológico del agostamiento de pepinos, cierta especie de melones (cantalupo), melones, calabazas y calabacines; *Pseudomonas solanacearum,* causa de la podredumbre parda de patatas, tabaco y tomates; *Xanthomonas vasculorum,* agente de la gomosis de la caña de azúcar.

Véase más información en Hildebrandt (1950).

Royas o roñas. Los microorganismos productores de royas pueden introducirse a gran profundidad entre las células y dejar intactos los tejidos contiguos. Las bacterias se desarrollan en los zumos de las plantas, sin digerir los tejidos; suelen alterar el color de las hojas y las ramas. La muerte se debe probablemente a un impedimento de la circulación de la savia.

Una lista parcial de los gérmenes causantes de royas comprende los siguientes: *Erwinia amylovora,* agente de la afección en el peral; *E. lathyri,* que ocasiona estrías en guisantes y trébol; *Pseudomonas medicaginis,* agente etiológico de la roya del tallo en la alfalfa; *P. mori,* causa de la roya del moral; *P. pisi,* que ataca a los guisantes; *Xanthomonas juglandis,* que estropea las nueces; *X. phaseoli,* agente de la roya de judías, altramuces y otras plantas.

Enfermedades por intumescencia. Algunas bacterias tienen la facultad de producir agallas o tumores en plantas. Estas excrecencias o desarrollos anormales se deben a la acción de microorganismos sobre los tejidos meristemáticos vegetales, y tales alteraciones se incluyen entre las enfermedades por intumescencia.

En algunas infecciones, las agallas permanecen pequeñas; en otras, llegan a alcanzar grandes proporciones. Se han conocido remolachas azucareras con tumores más grandes que las plantas atacadas. Se cree que las bacterias elaboran cierto producto metabólico irritante que divide rápidamente las células inmediatas. Algunos investigadores suponen que las infecciones tumorales de las plantas son similares a las excrecencias cancerosas del hombre y los animales. No se necesitan microorganismos intracelulares para que se desarrollen las lesiones características.

Entre los gérmenes importantes que ocasionan estas enfermedades figuran: *Agrobacterium gypsophilae,* en la *Gypsophila fasciculata*; *A. rhizogenes,* agente de la raíz pilosa del manzano; *A. rubi,* que produce agallas en el frambueso y la morera; *A. tumefaciens,* causa del cáncer bacteriano en una especie de margarita; *Bacterium pseudotsugae.* productor de agallas en el abeto de Douglas; *Corynebacterium fascians,* agente de la anastomosis del guisante; *Pseudomonas savastanoi,* que origina nudos en el olivo; *P. tonelliana,* causante de agallas en la adelfa, y *Xanthomonas beticola,* que produce bolsas en la remolacha azucarera y otras especies de esta planta.

Véase más información en Felt (1940), Hildebrandt (1950), Riker, Spoerl y Gutsche (1946).

Lesiones locales o manchas. En muchas enfermedades de plantas, el ataque se limita a una pequeña zona en torno al punto de entrada; tales afecciones se denominan lesiones locales o manchas.

Los microorganismos causantes de manchas foliares atacan vigorosamente el vegetal, y las células se infectan y cambian de color de modo ostensible. Las zonas atacadas se secan, y con frecuencia se desprenden, dejando agujeros en las hojas.

Algunos de los gérmenes productores de manchas son: *Pseudomonas angulata,* que ocasiona manchas angulares en el tabaco; *P. maculicola,* que lo hace en la coliflor; *P. mellea,* agente etiológico de las manchas foliares del tabaco; *Xanthomonas cucurbitae,* en las hojas del calabacín; *X. malvacearum,* que origina manchas angulares en las hojas de algodón; *X. ricinicola,* en las hojas del ricino.

Más información sobre patógenos bacterianos de plantas se encontrará en Braun y Elrod (146), y Starr (1949).

Vías de infección. Las bacterias penetran en las plantas generalmente a través de heridas. Raíces, hojas y tallos se lesionan mecánicamente con facilidad por medio de las herramientas de labor, animales, etcétera. Las plantas con raíces dañadas enferman con facilidad, mientras que las sanas resisten los ataques bacterianos. Se sabe que el granizo daña las plantas y las hace vulnerables a infecciones; sin embargo, la causa habitual de enfermedades vegetales es la picadura de diversos insectos. A veces, éstos llevan en su aparato bucal el agente etiológico, y ello hace posible que lastimen e infecten las plantas en una sola operación.

En muchas de las infecciones de hojas y frutos, los gérmenes se introducen a través de aberturas naturales conocidas por estomas, desde donde encuentran acceso a los espacios intercelulares, reducen en gran parte la resistencia de las células, por asfixia o envenenamiento, y así penetra el agente etiológico en las células vegetales afectadas.

También pueden introducirse las bacterias en las plantas por los hidatodos u órganos excretores de agua. Una eliminación excesiva de este líquido acumula en la superficie de la planta mucha humedad; las bacterias se reúnen fácilmente en las gotitas de agua, y así pueden penetrar algunas dentro del vegetal.

Las lenticelas son también aberturas sin protección, que a veces brindan a las bacterias una vía de entrada; están constituidas por poros verticales en los tallos de plantas leñosas, por los cuales penetra aire en el interior.

Muchos insectos ocasionan infecciones en plantas. Sus órganos bucales o sus patas sirven de portadores de bacterias capaces de atacarlas, sobre todo cuando las plantas producen néctar para atraer abejas y otros insectos que intervienen en la fecundación de las flores.

Véase más información sobre el tema en Chapman, Hillier y Johnson (1951), Chester (1947), Elliot (1943, 1951), Green (1946), Kelman (1953), y Starr (1946).

VIRUS DE PLANTAS

Un virus se puede definir como un agente patógeno demasiado pequeño, por lo general, para ser visto por el microscopio corriente. Los virus presentan las siguientes características:

1.ª Son muy pequeños, por lo general invisibles al microscopio; sin embargo, pueden verse con el microscopio electrónico.
2.ª Se mantienen exclusivamente de ciertas células vivas específicas.
3.ª Producen enfermedades típicas similares en huéspedes adecuados, por series no interrumpidas.
4.ª Son antígenos, y pueden estimular la producción de anticuerpos cuando se introducen en un organismo animal.
5.ª Muestran una gran capacidad de variación.

Los virus cambian notablemente de tamaño o forma. El mosaico del tabaco tiene figura bacilar; el del achaparramiento del tomate y el de la judía del Sur son esféricos o casi esféricos. En el microscopio electrónico, estos virus se parecen mucho a bacterias, aunque son mucho más pequeños. No son móviles, ni se sabe que se reproduzcan por escisión, como las bacterias.

Ivanowski (1892) fue probablemente el primero que dio a conocer la existencia de partículas ultramicroscópicas capaces de producir enfermedades. Demostró que el agente del mosaico del tabaco pasaba por un filtro que retenía todas las bacterias conocidas entonces. Posteriormente se han descubierto muchos agentes filtrables que originan enfermedades en plantas, animales y bacterias.

Probablemente son más numerosas las enfermedades de plantas producidas por virus que por bacterias. Los virus son causa de algunas de

las que más destruyen las cosechas. Puede afirmarse que casi todas las plantas cultivadas sufren el ataque de un virus, por lo menos, y no es raro encontrar algunas atacadas por dos o más; por ejemplo, la patata es sensible a veinticinco de ellos, y el tabaco, a doce, como mínimo. A causa de estas infecciones múltiples, resulta a menudo muy difícil, si no imposible, identificar un virus por los síntomas apreciados.

Naturaleza de los virus de plantas. No se comprende bien la naturaleza de los virus vegetales. Algunos autores creen que son partículas vivientes de tamaño submicroscópico, que se desarrollan por multiplicación de formas preexistentes, aunque otros opinan que tales virus no son microorganismos vivos, sino cuerpos catalíticos capaces de lastimar una célula vegetal sensible, estimulándola a producir más virus de la misma clase. La célula termina por destruirse, y el agente catalítico se propaga entonces a otras células del vegetal hospedante. Apoya esta creencia el trabajo de Stanley (1935), quien aisló el virus del mosaico del tabaco de plantas infectadas de este vegetal y del pepino, en forma de finos bacilos aciculares o cristales sumamente puros, capaces de reproducir la enfermedad en plantas sanas.

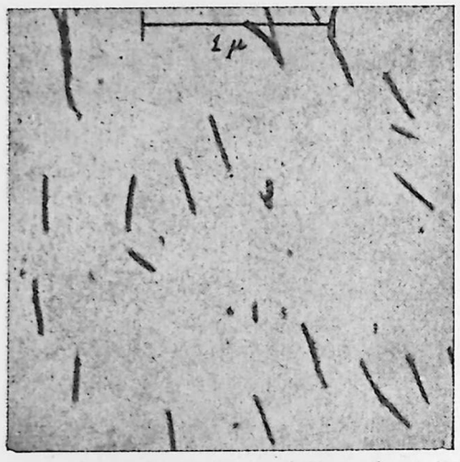


Fig. 256. — Micrografía electrónica del virus cristalino del mosaico del tabaco. Aumento: 1:22.100. (Según Stanley y Anderson.)

Estructura química de los virus de plantas. Stanley (1935) aisló de plantas de tabaco turco, atacadas por el mosaico, una nucleoproteína cristalizada de elevado peso molecular, que poseía las propiedades del virus del mosaico del tabaco (fig. 256). Recristalizaciones repetidas no hicieron variar la infecciosidad de los cristales; se ha demostrado que éstos se componen de moléculas de nucleoproteína pura.

También se han obtenido cristales análogos de plantas no afines enfermas de mosaico del tabaco. La actividad del virus de esta afección no se ha demostrado en ausencia de la nucleoproteína característica. Los informes de Stanley acerca del mosaico del tabaco han estimulado a estudiar otros agentes etiológicos de enfermedades de plantas, con el resultado de la obtención de diversos virus en forma cristalina (figura 257).

Se han identificado muchas cepas de virus del mosaico del tabaco en estado natural. Las nucleoproteínas víricas aisladas de varias procedencias han resultado similares en cuanto a propiedades físicas y químicas, pero diferentes entre sí y también del virus corriente de la

enfermedad. Un virus se puede modificar tras cultivo en un huésped no natural; este virus modificado proviene con toda probabilidad de un cambio en las propiedades físicas y químicas de la nucleoproteína específica. Por consiguiente, los síntomas típicos de una enfermedad vírica de vegetales se obtienen sólo por medio de una cepa no mutada inoculada a una planta hospedante natural.

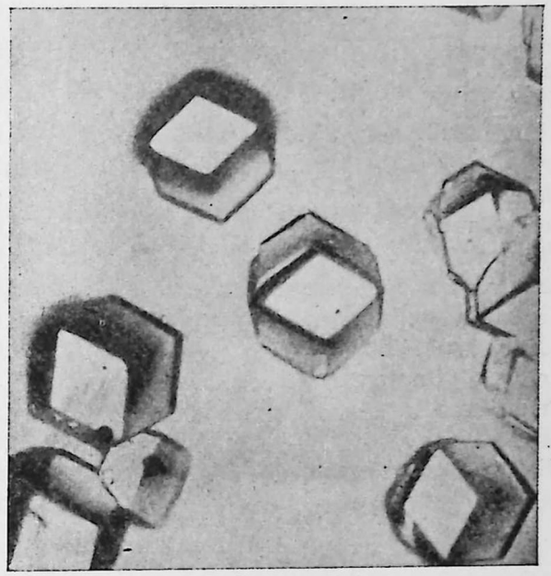


Fig. 257. — Virus cristalino del achaparramiento. (Según Stanley.)

Takahashi y Rawlins (1947) estudiaron el virus común del mosaico del tabaco y un mutante amarillo aislado del mismo, por medio del microscopio electrónico. El mutante amarillo no se podía distinguir por su tamaño y forma de la cepa primitiva, al aislarlo de zumo del vegetal. A juicio de estos autores, las mutaciones de virus bacilares no suelen ir acompañadas de una modificación de los corpúsculos suficientemente grande para que la descubra el microscopio electrónico. Por eso, si un virus no identificado tiene el tamaño de un virus bacilar conocido, es muy probable que ambos sean afines.

Todavía no se conoce la estructura química exacta de una sola proteína, y lo mismo sucede con las nucleoproteínas. Las proteínas tienen pesos moleculares altos, del orden de 30 a varias centenas de millar. En cambio, el virus del mosaico del tabaco da un peso molecular aproximado a 40 millones; es una proteína conjugada, pues se compone de proteína en combinación con ácido nucleico.

Ross (1942) ha hidrolizado virus del mosaico del tabaco, y apreciado la presencia de trece aminoácidos distintos; faltaban cuatro de éstos. Loring (1939) hizo saber que el ácido nucleico presente en este virus era similar, si no idéntico, al ácido ribonucleico (pág. 691).

La composición del virus del mosaico del tabaco, según Ross, se resume en la tabla 41.

TABLA 41. — COMPOSICIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO

Producto hidrolítico	Peso %
Glicocola (glicina)	0,0
Alanina	2,4
Valina.	3,9
Leucina	6,1
Serina.	6,4
Cisteína	0,7
Metionina	0,0
Treonina	5,3
Tirosina	3,9
Fenilalanina	6,0
Arginina	9,0
Lisina	0,0
Histidina	0,0
Ácido aspártico	2,6
Ácido glutámico	5,3
Triptófano	4,5
Prolina	4,6
Nitrógeno de amidas (en NH_3).	1,9
Ácido nucleico	5,8
Total.	68,4

Knight y Stanley (1941) han analizado el contenido en tirosina, triptófano, fenilalanina, arginina y fósforo de varias cepas de mosaico del tabaco aisladas de diferentes plantas atacadas, y de dos cepas de virus del pepino, y comprobaron que existen diferencias evidentes entre las proporciones de aminoácidos contenidas en ellas. También se efectuaron ensayos serológicos, con resultados muy parecidos a los datos químicos de las cepas examinadas. Puede afirmarse que las cepas mutadas de virus del mosaico del tabaco muestran diferencias de estructura, que pueden descubrirse por métodos químicos y serológicos. No parece probable que tales cambios puedan provocarse en moléculas ya constituidas de virus; antes bien es de creer que ocurren durante la síntesis de nuevas moléculas de virus dentro de las células de la planta hospedante.

AGENTES DE PROPAGACIÓN DE LOS VIRUS

Es probable que todas las enfermedades por virus sean diseminadas por insectos. El transporte de los virus a las plantas puede efectuarse también por otros medios, aunque de importancia secundaria, entre los cuales pueden mencionarse el viento, el agua, el suelo, las semillas y el polen.

Viento. La intervención del viento en la diseminación de los virus de plantas es pequeña, salvo contadas excepciones. El virus del mosaico del tabaco, por ejemplo, es muy resistente a la desecación, y el viento lo puede esparcir en forma de tejido vegetal desmenuzado y seco. Este virus es capaz de infectar fácilmente plantas sanas, a través de pequeñas lesiones.

Agua. El agua parece ser un factor de poca importancia en la propagación de la gran mayoría de las enfermedades víricas de las plantas; pero también se conocen algunas excepciones en este caso. Es posible infectar plantas sanas con necrosis de tabaco bañando las raíces en agua que contenga el virus, que puede contaminarlas sin necesidad de heridas artificiales.

Suelo. El propio suelo no es agente de transmisión de enfermedades por virus. La infección se puede producir a través de raíces y otras partes subterráneas de plantas, por obra del agua o de insectos que actúen en el suelo. Como es muy difícil observar partes subterráneas de vegetales, sigue siendo oscuro el mecanismo de infección por esta vía. Sin embargo, se ha demostrado que el virus del mosaico del trigo se puede transmitir bajo tierra por las raíces, las sumidades, o de ambas maneras. El virus puede sobrevivir en la tierra por algún tiempo, y es difícil que el agua lo arrastre y desprenda. No se conoce la forma en que el virus invade la planta.

Semillas. La transmisión de enfermedades de plantas por medio de las semillas está probada respecto a algunos virus. El del mosaico de la judía se produce por este conducto en un 50 % de las plantas, en condiciones experimentales, aunque los resultados no suelen ser consecuentes. Una planta puede tener semillas sanas e infectadas. Las de la familia *Leguminosas* parecen ser más sensibles a la infección por esta vía que las de otras familias.

Polen. Se ha demostrado que las infecciones por virus pueden transmitirse a las semillas por el polen procedente de plantas infectadas. En la *Datura stramonium,* hasta 79 % de las semillas son atacadas a veces, e igualmente lo pueden ser de este modo las semillas de judía.

Transmisión por insectos. Los agentes más importantes de diseminación de virus de plantas son los insectos. Muchos de ellos transmiten notoriamente enfermedades por virus; otros transmiten la infección biológicamente. Lo primero suele ocurrir cuando los insectos son masticadores; lo segundo, cuando son chupadores, pero esto último no se produce siempre biológicamente.

Según Leach (1940), la transmisión biológica de virus de plantas por medio de insectos presenta habitualmente una o varias de las circunstancias siguientes:

1.ª Una multiplicación o aumento evidente de los virus en el cuerpo del insecto.

2.ª Un período de incubación en el cuerpo del insecto, o sea un período necesario después de que éste se ha alimentado de plantas enfermas y antes de volverse infeccioso o virífero.

3.ª Un grado de especificidad entre el insecto y el virus que transmite.

4.ª Una relación obligada.

5.ª Una relación entre la edad o fase vital del insecto y su aptitud para transmitir el virus.

6.ª Transmisión congénita del virus de una generación a la siguiente.

Para más información sobre virus de plantas, véanse Bawden (1950, 1951), Bawden y Roberts (1948), Best (1948), Best y Lugg (1944), Cohen (1942), Holmes (1939), Jones (1950), Kunkel (1947), Rawlins, Roberts y Utech (1946), Seiffert (1944), Smith (1951), Stanley (1936 *a*, *b*; 1938, 1943), Storey (1939), Takabashi y Rawlins (1948, 1949).

REFERENCIAS

Bawden, F. C.: «Plant Viruses and Virus Diseases», Waltham, Mass., The Chronica Botanica Co., 1950.

—: The multiplication of Viruses, *Sci. Progress*, **39**: 1, 1951.

— y F. M. Roberts: Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses, *Ann. Appl. Biol.*, **35**: 418, 1948.

Best, R. J.: Longevity of tobacco mosaic virus. I. In vitro life of the pure virus in buffer solution at pH 4, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **26**: 163, 1948.

— y J. W. H. Lugg: Partial composition of tobacco mosaic virus protein: the amide, tyrosine, tryptophane, cystine (plus cysteine), and methionine contents, *ibid.*, **22**: 247, 1944.

Braun, A. C., y R. P. Elrod: Sages in the life history of *Phytomonas tumefaciens*, *J. Bact.*, **52**: 695, 1946.

Burrill, T. J.: Anthrax of fruit trees; or the so-called fire-blight of pear, and twig bligt of apple trees, *Proc. Am. Assoc. Advance. Sci.*, **29**: 583, 1881.

Chapman, G., J. Hillier, y F. H. Johnson: Observations on the bacteriophagy of *Erwinia carotovora*, *J. Bact.*, **61**: 261, 1951.

Chester, K. S.: «Nature and Prevention of Plant Diseases», Filadelfia, The Blakiston Company, 1947.

Cohen, S. S.: New crystalline forms of tomato bushy stunt virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **51**: 104, 1942.

Dowson, W. J.: On the systematic position and the generic names of he Gram-negative bacterial plant pathogens, *Zentr. Bakt. Parasitenk.*, II, **100**: 177, 1939.

—: The identification of the bacteria commonly causing soft rot in plants, *Ann. Appl. Biol.*, **28**: 102, 1941.

Elliott, C.: Recent developments in the classification of bacterial plant pathogens, *Botan. Rev.*, **9**: 655, 1943.

—: «Manual of Bacterial Plant Pathogens», Waltham, Mass., The Chronica Botanica Co., 1951.

Elrod, R. P.: Serological studies of *Erwineae*. I. *Erwinia amylovora*, *Botan. Gaz.*, **103**: 123, 1941*a*; II. Soft rot group; with some biochemical considerations. *ibid.*, **103**: 266, 1941*b*.

Felt, E. P.: «Plant Galls and Gall Makers», Ithaca, N.Y., Comstock Publishing Company, Inc., 1940.

Green, D. E.: «Diseases of Vegetables», Londres, Macmillan & Co., Ltd., 1946.

Hildebrandt, A. C.: Some important galls and wilts of plants and the inciting bacteria, *Bact. Rev.*, **14**: 259, 1950.

Holmes, F. O.: «Phytopathogenic Viruses», Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1939.

Jones, D. R., On the nomenclature and identity of the coliform soft-rot bacteria, *Trans. Brit. Mycological Soc.*, **33**: 73, 1950.

Kelman, A.: The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, *North Carolina Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 99, junio de 1953.

Knight, C. A., y W. M. Stanley: Aromatic amino acids in strains of tobacco mosaic virus and in related cucumber viruses 3 and 4, *J. Biol. Chem.*, **141**: 39, 1941.

Kunkel, L. O.: Virus diseases of plants, *Mich. State Coll., Agr. Exp. Sta., Circ. Bull.* 208, 1947.

Leach, J. G.: «Insect Transmission of Plant Diseases». Nueva York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1940.

Loring, H. S.: Properties and hydrolytic products of nucleic acid from tobacco mosaic virus, *J. Biol. Chem.*, **130**: 251, 1939.

Rawlins, T. E., C. Roberts, y N. M. Utech: An electron microscope study of tobacco mosaic virus at different stages of infection, *Am. J. Bot.*, **33**: 356, 1946.

Riker, A. J., E. Spoerl, y A. E. Gutsche: Some comparisons of bacterial plant galls and of their causal agents, *Botan. Rev.*, **12**: 57, 1946.

Ross, A. F.: The fractionation of the amino acids of tobacco mosaic virus protein, *J. Biol. Chem.*, **143**: 685, 1942.

Seiffert, G.: «Virus Diseases in Man, Animal and Plant», Nueva York, Philosophical Library, Inc., 1944.

Smith, K. M.: «Recent Advances in the Study of Plant Viruses», Londres, J. & A. Churchill, 1951.

Stanley, W. M.: Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus, *Science*, **81**: 644, 1935.

—: Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. VI. The isolation from diseased Turkish plants of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus, *Phytopatology*, **26**: 305, 1936*a*; VII. An improved method for the preparation of crystalline tobacco-mosaic virus protein, *J. Biol. Chem.*, **115**: 673, 1936*b*.

—: Virus proteins—A new group of macromolecules, *J. Phys. Chem.*, **42**: 55, 1938.

—: Purification of tomato bushy stunt virus by differential centrifugation, *J. Biol. Chem.*, **135**: 437, 1940.

—: Chemical structure and the mutation of viruses. De «Virus Diseases», ed. por T. M. Rivers, Ithaca, N. Y., Cornell University Press, 1943.

Starr, M. P.: The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the genus *Xanthomonas*, *J. Bact.*, **51**: 131, 1946; III. The Grampositive phytopathogenic *Corynebacterium species*, *ibid.*, **57**: 253, 1949.

— y M. Mandel: The nutrition of phytopathogenic bacteria. IV. Minimal nutritive requirements of the genus *Erwinia*, *ibid.*, **60**: 669, 1950.

Storey, H. H.: Transmission of plant viruses by insects, *Botan. Rev.*, **5**: 240, 1939.

Takahashi, W. N., y T. E. Rawlins: An electron microscope study of mutation in tobacco-mosaic virus, *Phytopathology*, **37**: 73, 1947.

— y —: An electron microscope study of tobacco mosaic virus extracted from pulp and juice after various periods of infection, *ibid.*, **38**: 279, 1948.

— y —: The effect of washing frozen mosaic leaves on the length of tobacco mosaic virus particles, *J. Bact.*, **57**: 131, 1949.

Taylor, C. B.: The soft-rot bacteria of the coli-aerogenes group, *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **14**: 95, 1951.

CAPÍTULO XXIX

ENFERMEDADES POR VIRUS EN EL HOMBRE

Los agentes etiológicos de enfermedades estudiados en el capítulo XXVI pueden verse con ayuda de un microscopio corriente. Algunos de los virus de animales apenas se distinguen con los mayores aumentos de tales microscopios; pero su presencia se puede demostrar examinándolos con un microscopio electrónico o inoculando el material que los contiene en un animal sensible.

Naturaleza de los virus de animales. No se conoce la naturaleza exacta de estos virus. Generalmente se cree que son microorganismos vivos de tamaño infinitesimal, que se desarrollan por multiplicación de formas preexistentes (pág. 796). Se han cristalizado algunos virus de plantas, pero ninguno de animales, y esta propiedad sirve para distinguir los últimos de virus cristalinos de plantas. Pasan por los filtros capaces de retener bacterias. En suspensiones neutras o ligeramente alcalinas, la mayoría de los virus poseen una carga eléctrica negativa, en lo cual se comportan como bacterias.

Sólo unos pocos virus de animales se han analizado químicamente. En muchos casos, los resultados son erróneos, pues se ha probado que las preparaciones «purificadas» contenían impurezas. Por eso, los datos relativos a la composición química de muchos virus son inexactos y desorientadores.

Uno de los mejores ejemplos de virus animal muy purificado es el de la vacuna o viruela bovina. Los corpúsculos de virus tienen forma cuboidea, y estructura interna definida, como la membrana limitante. Se componen de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico, cobre, biotina y riboflavina. Las partículas no pueden vivir sino contando con células hospedantes vivas y sensibles. El análisis del virus vacunal revela una composición mucho más compleja que la de ciertos virus de plantas que consisten en moléculas puras de nucleoproteínas.

Los corpúsculos de vacuna son probablemente microorganismos

vivos que difieren de las bacterias por ser de menor tamaño y carecer de ciertas enzimas esenciales. El hecho de que se multipliquen puede explicarse admitiendo que utilizan las enzimas necesarias contenidas en las células del huésped. Esto haría tal vez comprensible la especificidad de los virus, en cuanto atacan solamente las células que poseen las enzimas necesarias u otros mecanismos específicos.

Tamaño de los virus. El tamaño de los virus se puede determinar por filtración, por la rapidez de centrifugación, por difusión y midiéndolo en un microscopio corriente, si las partículas son grandes, o en el microscopio electrónico, si son demasiado pequeñas. Los resultados más exactos se obtienen mediante este último instrumento.

Los virus muestran una gran variación de tamaño y forma, entre 10 y 300 mμ (fig. 258). Algunos son más pequeños que las mayores moléculas de proteína; otros, más grandes que las bacterias diminutas. Entre estos dos extremos, otros virus forman un espectro casi continuo. Unos virus son esféricos; otros, ovoides, y otros forman cubos o paralelepípedos minúsculos; también los hay bacilares.

Cultivo de virus. Se requieren células vivas de tejidos vegetales o animales para la propagación de virus de ambas clases de organismos. Aunque los virus no se multiplican más que en células vivas, esto no quiere decir que puedan cultivarse de ese modo; muchos virus, especialmente los de origen animal, no se han cultivado con éxito. Algunos virus de animales se pueden cultivar en un medio de embrión picado, o en la membrana corioalantoica del embrión de pollo, o en fragmentos de tejidos vivos incrustados en plasma (cultivo hístico). Los virus de plantas no se pueden propagar en tejidos animales; necesitan tejidos vegetales, y con este fin se suelen emplear cultivos de ápices radicales.

Resistencia de los virus. Los virus son termolábiles y sensibles a los mismos agentes que destruyen bacterias; pero, en general, su resistencia es mayor. Añadiendo fenol al 0,5 % a virus vacunal, no se extingue su infecciosidad. La glicerina, concentrada al 50 %, destruye gradualmente bacterias, pero no produce efecto apreciable en los virus. En cambio, éstos pueden experimentar destrucción oxidativa, lo cual se evita en gran parte añadiendo un reductor apropiado, como cisteína, a la suspensión de virus.

Mutación de los virus. Los virus muestran una gran capacidad de variación o mutación. Una vez modificado un virus, el cambio suele persistir indefinidamente; la adaptación de un virus al ratón hace variar su virulencia para el hombre: el virus pierde su capacidad de producir en seres humanos una enfermedad grave, pero retiene la de proporcionar una inmunidad rápida y sólida frente al virus no modificado. La facultad de mutación de un corpúsculo es una propiedad no asignada de ordinario a moléculas, sino a organismos vivos.

	Diámetro o anchura por longitud en mμ
Glóbulos rojos	7500
B. prodigiosus (Serratia marcescens)	750
Rickettsia	475
Psitacosis	450
Varicela	260 X 310
Mixoma	230 X 290
Vacuna	210 X 260
Germen de la pleuroneumonía	150
Seudorrabia	150
Herpe simple	150
Rabia o hidrofobia	125
Gripe (influenza)	115
Enfermedad de Newcastle	115
Estomatitis vesicular	100
Bacteriófago del estafilococo	100
Peste aviaria	90
Bacteriófago del colibacilo T_2	60 X 80
Tumor I del pollo	70
Encefalomielitis equina	50
Bacteriófago del colibacilo T_3	45
Papiloma del conejo (Shope)	44
Virus de la neumonía murina	40
Mosaico del tabaco y sus varied.	15 X 280
Mosaico latente de la patata	10 X 525
Gen (cómputo máximo de Muller)	20 X 125
Mosaico de la alubia del sur	31
Fiebre de Rift Valley (Kenia)	30
Gangrena del tallo de la tomatera	26
Poliomielitis (Lansing)	25
Molécula de hemocianina (Busycon)	22
Fiebre amarilla	22
Molécula de hemocianina (Octopus)	20
Modorra del cordero	19
Orín blanco del tabaco	19
Encefalitis japonesa B	18
Mosaico de la alfalfa	17
Podredumbre del tabaco	16
Glosopeda	10
Ictericia del gusano de seda	10
Molécula de hemoglobina (caballo)	3 X 15
Molécula de albúmina de huevo	2.5 X 10

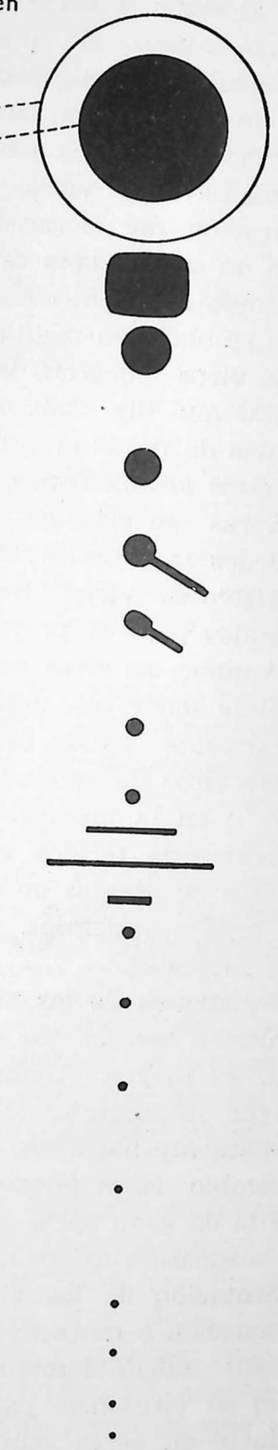


Fig. 258. — Tamaños aproximados de virus y materiales de referencia. (Reproducido de Stanley.)

Inmunidad en las enfermedades por virus. El restablecimiento de una afección vírica suele proporcionar una fuerte inmunidad, casi permanente. Son insólitos los segundos ataques de enfermedades víricas tales como varicela, parotiditis, sarampión, poliomielitis y viruela. En cambio, la inmunidad que dejan algunas infecciones por virus es de corta duración; así sucede con la gripe epidémica, el resfriado común y el herpe simple (herpes labiales, vesículas febriles). Se han identificado en la sangre circulante diversas substancias inmunes, entre ellas aglutininas, precipitinas, anticuerpos fijadores del complemento y neutralizantes.

El restablecimiento de algunas enfermedades víricas no significa necesariamente que se haya eliminado por completo del huésped el agente etiológico; el virus puede persistir toda la vida en el sujeto restablecido. No por eso queda la persona inmune en condiciones de difundir el virus, pues se supone que lo retienen varias células vivas y no puede ponerse en contacto con anticuerpos circulantes. Como, al parecer, los virus se reproducen y desarrollan sus actividades sólo en células vivas, no pueden ser atacados y destruidos por esos anticuerpos. En consecuencia, si el virus no destruye las células del huésped, ambos pueden vivir juntos sin que el infectante se ponga nunca en contacto con los anticuerpos humorales.

Las enfermedades víricas de importancia en el hombre son las siguientes:

Dengue. Es una infección provocada por dos cepas inmunológicamente distintas, por lo menos.

Enfermedad producida. Infección aguda, que comienza de pronto, generalmente con dos paroxismos breves, acompañados de fiebre, cefalalgia intensa, dolores en músculos y articulaciones, y erupción irregular.

Focos de infección. Sangre de personas infectadas, de un día a cinco días después del comienzo.

Modo de transmisión. Picadura de varias especies de mosquitos, entre ellos *Aedes aegypti, A. albopictus* y *A. scutellaris.* El mosquito se vuelve infeccioso pasados ocho a once días.

Período de incubación. De tres a quince días, generalmente cinco a seis.

Sensibilidad e inmunidad. Es universal la sensibilidad a la infección. Se conocen dos cepas inmunológicamente distintas. Inmunidad homóloga de larga duración y heteróloga breve.

Prevención y tratamiento. Eliminación de mosquitos y de sus nidos. Empleo de substancias repelentes.

Aislamiento de pacientes en habitaciones protegidas y tratadas previamente con insecticida.

Frecuencia. Puede sobrevenir donde haya mosquitos específicos. Se encuentra la enfermedad sobre todo en comarcas tropicales y subtropicales.

Véase más información en Sabin (1948, 1950), y Schlesinger (1940).

Encefalitis letárgica (tipo Viena). Inflamación del cerebro.

Enfermedad producida. Es una afección del sistema nervioso central, a menudo crónica, que dura varios años y se caracteriza por fiebre moderada, inflamación, letargo, a veces parálisis de músculos oculares, en algunos casos con participación de nervios raquídeos y periféricos. La fiebre se presenta durante la fase aguda o a cada exacerbación.

Focos de infección. No se conocen.

Modos de transmisión. No se conocen.

Período de incubación. Ignorado.

Sensibilidad e inmunidad. No se conocen. Se presenta en cualquier edad. Se cree que al restablecimiento sigue una inmunidad activa permanente.

Frecuencia. En la actualidad se presenta sólo eventualmente.

Prevención y tratamiento. No se conoce método alguno.

Encefalitis transmitida por artrópodos. En Estados Unidos y Canada comprende tipos equino oriental y occidental, y tipo St. Louis de infección humana; en algunos países de Sudamérica, el tipo equino de Venezuela; en Japón, Corea y China, el tipo japonés B; en Rusia europea y Siberia, el tipo vernoestival.

Enfermedad producida. Casos benignos de todos los tipos, caracterizados por cefalea, fiebre, rigidez de cuello y espalda, tirantez muscular, a veces somnolencia, con alteraciones en el líquido cefalorraquídeo. Casos menos graves, caracterizados por comienzo repentino, alta fiebre, estupor, signos meníngeos, coma, espasticidad, temblores, rara vez parálisis flácida. Cada forma de infección es efecto de un virus específico.

Focos de infección. Aves silvestres y domésticas sirven de principal foco de la infección por mosquitos en los tipos de Norteamérica; pueden infectarse ácaros de pollos y aves silvestres. No es probable que lo sea el hombre.

Modo de transmisión. El tipo vernoestival ruso se transmite por garrapatas; todos los demás, por mosquitos.

Período de incubación. Generalmente, de cinco a quince días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección suele ser máxima en la infancia y la senectud. Se cree que el restablecimiento va seguido de inmunidad activa permanente contra el virus específico.

Frecuencia. Por lo regular, se presenta en verano y a principios de otoño. Es endémica en los valles cálidos de los Estados Unidos y epidémica en terrenos de secano del Oeste Medio, el Sur y el Este.

Prevención y tratamiento. Destrucción de larvas y pastos de los mosquitos vectores. Empleo de mosquiteros en los dormitorios; evitar los mosquitos a las horas en que pican. Instrucción del público sobre el modo de difusión y el de represión.

Véase más información en Olitsky y Casals (1948).

Fiebre amarilla. Partículas más pequeñas que la mayoría de los virus conocidos, con sólo 22 mμ de diámetro. El virus pasa fácilmente por los filtros de Seitz, Berkefeld y Chamberland; lo inactivan fácilmente el calor y los germicidas; puede conservarse en glicerina al 50 % durante varios meses; retiene su actividad congelado por espacio de mucho tiempo; resiste a la desecación a partir de ese estado y puede permanecer viable muchos meses; se inactiva por dilución en solución salina fisiológica, y se multiplica en cultivo de tejidos.

Enfermedad producida. Es una afección vírica específica aguda, caracterizada por comienzo repentino, fiebre, escalofríos, abatimiento, dolor de cabeza, mialgia, ligera destrucción de hematíes, congestión de membranas, vómito negro, algo de albuminuria e ictericia. Suele haber leucopenia; la enfermedad dura poco tiempo.

Focos de infección. Sangre de personas o de monos atacados y probablemente de otros animales salvajes.

Modo de transmisión. Por picadura de *Aëdes aegypti* y otras especies de mosquitos, de las cuales parecen ser más importantes en Sudamérica las del género *Hemagogus.*

Período de incubación. Generalmente tres a seis días, a veces más.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la dolencia es general. El restablecimiento va seguido de inmunidad adquirida permanente. Puede desarrollarse inmunidad activa de unos cuatro años de duración en diez días inoculando virus atenuado por cultivo en tejidos vivos, *in vitro.*

Frecuencia. Endémica en el hombre y algunos animales, sobre todo en África occidental y central. Epidémica entre los primates de Sudamérica, excepto Uruguay. Sigue siendo endémica en la forma selvática en Panamá.

Prevención y tratamiento. Vigilancia y eliminación de nidos de *Aëdes aegypti.* Inmunización activa de personas expuestas a la infección.

Aislamiento de personas infectadas durante los primeros cuatro días de fiebre y protección contra los mosquitos. La inmunización colectiva, mediante virus atenuado es el único método factible para combatir la fiebre amarilla; su efectividad persiste unos seis años.

Gripe epidémica (influenza). Antes se creía que ocasionaba esta enfermedad el *Hemophilus influenzae,* pero hoy se sabe que su productor es un virus. En casos típicos graves se encuentra también *H. influenzae,* pero probablemente su importancia es secundaria (pág. 751).

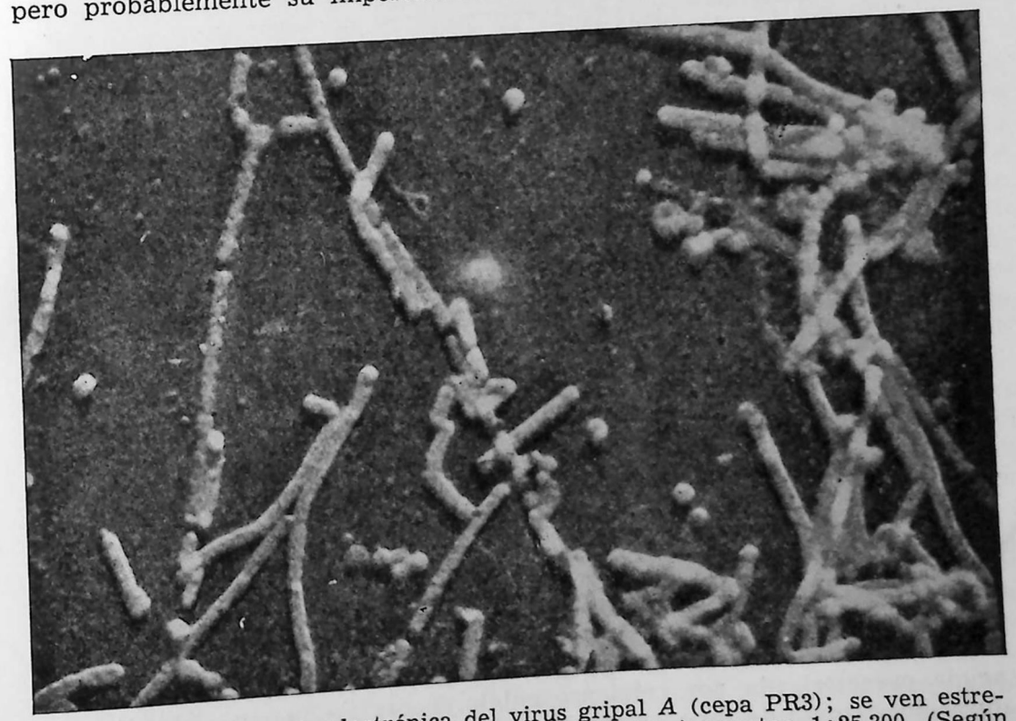


Fig. 259. — Micrografía electrónica del virus gripal *A* (cepa PR3); se ven estrechamente asociadas formas esféricas y filamentosas. Aumento: 1:25.300. (Según Murphy, Karzon y Bang.)

Se han identificado dos tipos *A* y *B* de virus gripal; el tipo *A* es el más antiguo y difundido (fig. 259); el tipo *B* se ha encontrado en brotes más pequeños y localizados. Hay algunos que no parecen efecto de los tipos *A* y *B*, lo cual induce a admitir la participación de un tipo más, como mínimo.

Son virus que pasan por la mayoría de los filtros, resisten la congelación durante unas dos semanas y conservan su potencia en glicerina al 50 % el mismo tiempo. Cuando se desecan a temperaturas muy bajas (liofilización), los virus retienen su potencia no menos de seis semanas en la nevera. Se inactivan con mercuriales, lo cual parece indicar la presencia de grupos —SH (cisteína) y los reactiva el tioglicolato sódico (Klein, Brewer, Pérez y Day, 1948). La cepa de virus de Lee se inactiva a 50-54° C en quince minutos, y con formol al 0,05 % solamente en 18 horas (Chu, 1948). También inactiva el virus una irradiación ultravioleta intensa (Henle y Henle, 1949).

Knight y Stanley (1944) descubrieron que este virus era sensible a oxidantes enérgicos, como el yodo, las sales de metales pesados, el mercurocromo, el formaldehído, los humectantes Phemerol y Roccal y el sulfato de dodecilo y sodio. En cambio, apenas le afectan los reductores: sulfatiazol, soluciones diluidas de fenol, glucosa, sulfato amónico, cloruro cálcico y tiosulfato sódico.

Ensayos microbiológicos efectuados por Knight (1947) sobre hidrolisados de preparaciones muy depuradas de virus gripal *A* (cepa PR8) y *B* (cepa de Lee) han demostrado que contiene 17 aminoácidos (tabla 42).

TABLA 42. CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS DE LOS VIRUS GRIPALES A (CEPA PR8) Y B (CEPA DE LEE)

	Tipo A %	Tipo B %
Alanina	2,5	2,6
Arginina	5,0	4,0
Ácido aspártico	7,4	7,3
Ácido glutámico	7,7	6,2
Glicina	2,5	2,9
Histidina	1,4	1,5
Isoleucina	4,1	4,2
Leucina	5,3	5,5
Lisina	3,6	4,7
Metionina	2,3	2,1
Fenilalanina	3,7	3,4
Prolina	2,6	2,7
Serina	2,2	2,2
Treonina	3,7	4,0
Triptófano	1,1	0,7
Tirosina	3,1	2,1
Valina	3,4	3,2

Enfermedad producida. La gripe epidémica es una infección vírica aguda caracterizada por comienzo súbito, fiebre de uno a siete días de duración, catarro de las vías respiratorias (a veces del conducto digestivo), dolores de cabeza y músculos, coriza, faringitis, bronquitis y tendencia a

complicaciones neumónicas. La enfermedad ocasiona profundo abatimiento. El virus es capaz de infectar ratones, hurones y tal vez cerdos, por vía intranasal.

Focos de infección. Excreciones de la nariz y la garganta de personas infectadas, u objetos recién contaminados por ellas.

Modo de transmisión. Por contacto directo con personas infectadas, por infección con gotitas, o con objetos recién contaminados por excreciones nasales y faríngeas de sujetos infectados.

Período de incubación. Habitualmente, 24 a 72 horas.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general, aunque algunas personas presentan inmunidad natural. Una inmunidad adquirida de corta duración, a veces hasta de un año, sigue al restablecimiento y es eficaz sólo contra el tipo causante de la infección.

Frecuencia. Las epidemias pueden afectar hasta al 50 % de la población en cuatro a seis semanas. Se presentan pandemias a intervalos irregulares.

Prevención y tratamiento. Instrucción del público respecto a los peligros de la infección por gotitas expelidas al escupir, estornudar y toser en presencia de otras personas. Debe evitarse el empleo común de cubiertos y vasijas, toallas, etc., y se recomienda usar telas y servilletas desechables.

Aislamiento de las personas infectadas durante la fase aguda. Desinfección de excreciones de nariz y garganta y de los objetos contaminados por ellas. Los pacientes deben guardar cama desde el comienzo de un ataque. Durante las epidemias hay que evitar las aglomeraciones.

Véase más información en Briody (1948), Commission on Acute Respiratory Diseases (1948), Dawson y Elford (1949), Horsfall (1948 b), Lauffer, Carnelly y MacDonald (1948), Hirst (1949), Loosli (1949), Murphy y Bang (1952), Murphy, Karzon y Bang (1950), Sharp (1949).

Hidrofobia o rabia. Corpúsculos grandes, de 125 a 150 mμ de diámetro. Virus capaz de pasar por filtros de Berkefeld y aun de Chamberland, pero no por los de Seitz. Los tejidos infectados se pueden conservar en glicerina sin diluir durante varias semanas a la temperatura ambiente; durante meses en la nevera, y por espacio de uno a dos años, a temperaturas bajo cero. Se reduce la virulencia del virus (atenuación) desecándolo sobre hidróxido potásico, exponiéndolo a fenol al 1 % y calentándolo a temperaturas de 54 a 56° C durante una hora o menos. Se conserva muy bien desecándolo a temperaturas muy bajas y guardándolo en la nevera. La repetida congelación y licuación de suspensiones de virus les hace perder la infecciosidad.

Enfermedad producida. Encefalitis aguda producida por un virus neurotrópico transmitido por la mordedura de un animal rabioso, generalmente el perro. Se caracteriza por depresión, comezón en el sitio de la infección primaria y fiebre. El paciente se encuentra molesto, la deglución se hace difícil y la salivación se acentúa; a continuación, ataques de delirio y parálisis de los músculos faciales, los ojos y la lengua, que se extiende gradualmente al tronco y a los miembros.

La causa de la muerte se puede determinar demostrando la presencia de cuerpos de Negri en las células nerviosas del cerebro o la medula espinal, o emulsificando una pequeña porción del hipocampo en solución salina esterilizada, e inoculándola por vía subdural a cobayos o conejos. La muerte sobreviene al cabo de unos dieciséis días, y pueden demostrarse cuerpos de Negri en los tejidos cerebrales.

Focos de infección. Animales infectados, principalmente perros; también intervienen vampiros.

Modo de transmisión. El virus existe en la saliva y se transmite generalmente al hombre por mordedura de un animal hidrófobo. Se han producido infecciones por contacto de la saliva con un rasguño o excoriación de la piel.

Período de incubación. Generalmente dos a seis semanas, a veces hasta seis meses, según el sitio de la herida respecto a la abundancia de inervación y la distancia de la vía nerviosa al cerebro.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. No se sabe que exista inmunidad natural en el hombre ni en los animales. Puede proporcionarse inmunidad artificial activa por medio de vacuna.

Frecuencia. Se conoce en todos los continentes, excepto Australia. Más corriente en perros que en los demás animales. En el hombre no es frecuente.

Prevención y tratamiento. El perro u otro animal que haya mordido a una persona debe ser aislado y sometido a observación durante un período adecuado de tiempo. Si hay sospecha de hidrofobia, se debe matar al animal y examinar su cerebro para descubrir posibles cuerpos de Negri. Cuando el examen es positivo, se aplicará vacunación antirrábica a la persona mordida, inmediatamente antes de que aparezcan los síntomas.

Una herida causada por mordedura o arañazo de un animal sospechoso deberá tratarse con ácido nítrico fumante para destruir el virus. Los perros de más de seis meses han de vacunarse cada año.

La vacuna se prepara inoculando a conejos por vía subdural virus callejero, en serie, hasta que la virulencia llegue a ocasionar la muerte en seis días. Como no es posible aumentar más la virulencia, este virus se califica de «fijo». Tan pronto como muere el animal, se lava en una solución desinfectante y se le practica la autopsia; se retira la espina dorsal asépticamente y se suspende por medio de un hilo esterilizado dentro de un frasco grande, que en el fondo contiene trozos de hidróxido potásico como desecante. El frasco se guarda en un sitio oscuro, a unos 25° C de temperatura. El virus se atenúa gradualmente por desecación, y el grado de atenuación varía directamente con el tiempo.

Para la primera inyección es costumbre emplear medula desecada durante catorce días; para la segunda, medula desecada durante trece días; para la tercera, medula de doce días, etc.; y por último, la desecada durante tres días. A partir de entonces se utiliza la misma preparación, hasta aplicar un total de 21 inyecciones. Para cada inyección se emulsifica aproximadamente 1 cm de medula en 3 ml de solución salina, y se inoculan 2,5 ml bajo la piel. Este tratamiento basta, en general, para producir una inmunidad artificial activa.

El empleo de la vacuna ha contribuido a reducir notablemente el índice de mortalidad de la rabia. En las personas así tratadas, el índice de letalidad ha descendido al 1 %.

Parotiditis infecciosa o epidémica. Habel (1945) cultivó este virus en el saco vitelino, amniótico o alantoico del embrión de pollo, y comprobó que los corpúsculos tenían más de 340 mμ de diámetro. El virus era muy sensible a los efectos inactivantes del calor, formaldehído, éter y luz ultravioleta. Weil, Beard, Sharp y Beard (1948), por medio de micrografías electrónicas, descubrieron que las partículas de virus eran circulares y de tamaño sumamente variable, entre 106 y 282 mμ, con un promedio de 190μ. En micrografías sombreadas, las partículas aparecían aplanadas, con un contorno superficial rugoso e irregular (fig. 260).

Enfermedad producida. La parotiditis epidémica es una afección contagiosa específica aguda, caractizada por fiebre e inflamación de las glándulas salivales. Pueden infectarse las glándulas parótidas, submaxilares y sublinguales, aunque participan con mayor frecuencia las parótidas. A veces son atacados ovarios y testículos.

Focos de infección. Secreciones de la boca y probablemente de la nariz.

Modo de transmisión. Por contacto directo con personas infectadas u objetos contaminados por excreciones bucales y nasales de las mismas.

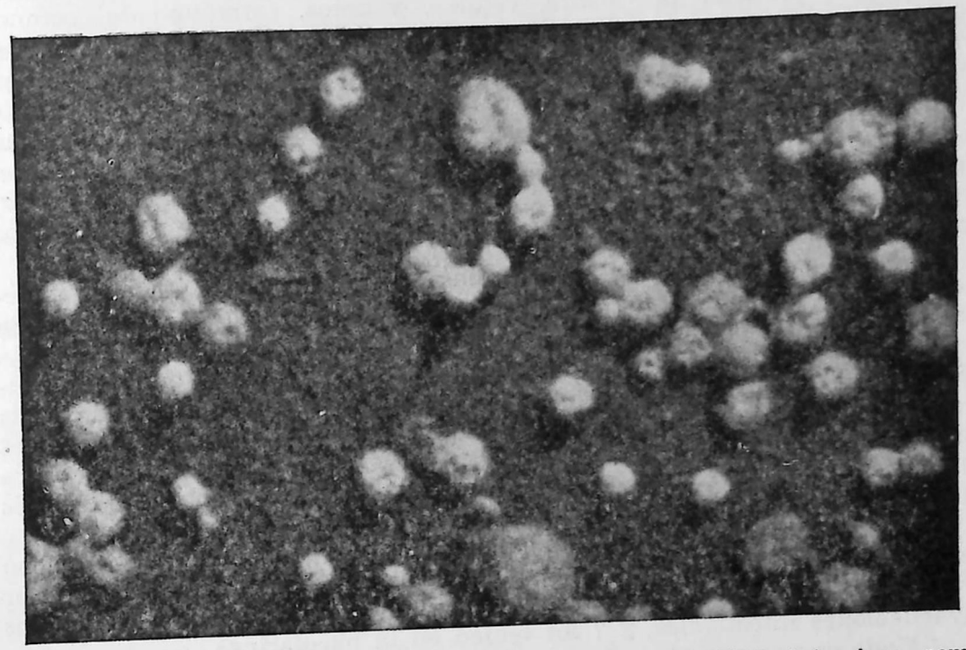


Fig. 260. — Micrografía electrónica del virus de la parotiditis infecciosa, sombreado con cromo. Aumento: 28.800 diámetros. (Según Wel, Beard, Sharp y Beard.)

Período de incubación. De doce a veintiséis días, generalmente dieciocho.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. El restablecimiento suele proporcionar inmunidad activa permanente. Es regular la aparición de anticuerpos fijadores del complemento o una concentración mayor de los mismos en el suero de las personas atacadas de parotiditis o convalecientes.

Frecuencia. La parotiditis contagiosa es menos corriente que otras enfermedades de la infancia; menudea más en invierno y primavera. Puede ser esporádica y epidémica, o también endémica en las grandes ciudades. Se presentan brotes con frecuencia durante períodos de aglomeración.

Prevención y tratamiento. Debe aislarse a las personas infectadas hasta siete días después de haber cedido la tumefacción de las glándulas salivales. Desinfección de utensilios de mesa.

Para más información, véanse Beveridge y Lind (1947), Ginsberg, Goebel y Horsfall (1948 *a*, *b*), Henle, Stokes, Burgoon, Bashe, Burgoon, Henle y Hunt (1951).

Poliomielitis (parálisis infantil). Este virus es uno de los más pequeños conocidos, y mide 25 mμ de diámetro. Resiste a la desecación, la congelación, la glicerina al 50 % y el fenol al 5 %. Es termolábil, pues se destruye a temperaturas de 45° C y mayores.

Enfermedad producida. La poliomielitis está muy difundida. Sólo en una pequeña proporción de personas infectadas se reconoce clínicamente la enfermedad; en su forma identificable, la poliomielitis es una dolencia infecciosa general aguda, que interesa el sistema nervioso central. Se caracteriza generalmente por fiebre, cefalea, vómitos, estreñimiento, somnolencia, que alterna con irritabilidad; casi siempre, rigidez del cuello y el raquis, temblores y exageración de los reflejos musculares. En una mitad de los casos puede desarrollarse parálisis en los primeros días, con pronunciada tendencia a mejoría después de haber llegado a su culminación. El diagnóstico depende del descubrimiento de una parálisis fláccida, característicamente irregular en cuanto a la participación del tejido muscular. La produce un virus, del que se han encontrado por lo menos tres tipos inmunológicamente distintos.

Focos de infección. Excreciones nasales y faríngeas de personas infectadas, y aun de las que no padecen un ataque clínicamente reconocido de la dolencia. Se encuentran virus en evacuaciones intestinales.

Pearson y Brown (1947) aislaron el virus de 4 entre 7 torundas faríngeas, y de 3 entre 9 lavados de garganta de pacientes con poliomielitis recogidos durante los primeros tres días siguientes a la aparición de los síntomas. En otra serie de 16 lavados de garganta recogidos tres a trece días después del comienzo, se aisló el virus de 2 pacientes once días después de iniciarse la enfermedad.

Un estudio de cuatro familias atacadas de poliomielitis proporcionó pruebas de una amplia distribución del virus entre sus miembros (Wenner y Tanner, 1947). De 20 personas, 16 contenían virus de poliomielitis en sus evacuaciones intestinales, y 7 los tenían en la bucofaringe.

Modo de transmisión. Se supone que el virus se introduce por la nariz o la boca, a partir de un portador o de una persona atacada de infección subclínica. Hay indicios de que la enfermedad se puede propagar por la leche, los abastecimientos de aguas, las piscinas de natación, los alimentos, las aguas residuales y los insectos. Se han encontrado moscas contaminadas por el virus.

Rhodes, Clark, Knowles, Goodfellow y Donohue (1950) han señalado que una cepa de virus de poliomielitis humana en las heces sobrevivía después de ponerla en agua de río durante no menos de 188 días, y conservaba su propiedad de provocar parálisis en monos. El agua infectada se conservó a unos —4° C, y la dilución de heces humanas era de 1:200 aproximadamente. El hecho de que el virus de la poliomielitis pudiera sobrevivir tanto tiempo parece sugerir ciertas deducciones epidemiológicas.

Lensen, Rhian, Stebbins, Backus y Peterson (1949) descubrieron que, en muestras de aguas naturales con una escala de pH de 7,9 a 8,3, el virus se inactiva en diez minutos en presencia de 0,05 parte por millón de cloro libre remanente. En experimentos con pH superior (10 a 14,25), se necesitó 0,1 a 0,15 parte por millón de cloro libre remanente para conseguir iguales resultados.

Período de incubación. Generalmente, siete a catorce días; pueden ser sólo tres, o hasta treinta y cinco. El período de máxima contagiosidad parece estar comprendido entre los últimos días del período de incubación y la primera semana de la enfermedad aguda.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general.

Se cree que los niños de uno a dieciséis años son más sensibles que los adultos, si bien faltan aún pruebas irrefutables. Después del restablecimiento queda una inmunidad activa. Los casos menudean en verano y a principios de otoño.

Prevención y tratamiento. Los individuos infectados han de aislarse durante dos semanas después de aparecer los síntomas. Desinfección de secreciones de nariz, garganta e intestino y de objetos contaminados por ellas.

Todos los niños con fiebre deben ser aislados y retenidos en cama hasta que se formule el diagnóstico. Se preservará a los niños del contacto con otros durante una epidemia, en el curso de la cual se evitarán las operaciones de nariz y garganta en niños, así como las aglomeraciones, en lo posible.

Para más información, véanse Carlson, Ridenour y McKhann (1943), Melnick (1950), Hammon (1949), Hammon y Roberts (1948), Salk (1953), Syverton, Scherer y Butorac (1951), Weller, Robins y Enders (1949).

Psitacosis. Partículas de virus relativamente grandes (450 mμ de diámetro), casi del tamaño de bacterias pequeñas. Se ven en un microscopio corriente. El virus atraviesa membranas que retienen bacterias; no toma el gram, produce lesiones semejantes a las de infecciones bacterianas más que a las víricas, y es sensible a los agentes bacteriostáticos.

Puede cultivarse en la membrana corioalantoica del embrión de pollo y obtenerse fácilmente por este método.

El diagnóstico se obtiene inoculando esputo de un individuo sospechoso a ratones blancos. Estos animales mueren generalmente en término de cinco a catorce días, y las preparaciones por impresión del bazo muestran la presencia de cuerpos elementales. El suero contiene anticuerpos fijadores del complemento.

Enfermedad producida. La psitacosis es una enfermedad contagiosa de los loros, similar a la gripe epidémica, y se transmite al hombre, en el que la dolencia se caracteriza por fiebre alta, dolor de cabeza y espalda, sed, alteraciones en la lengua y la faringe, estupor o depresión, taquicardia, diarrea o estreñimiento y esplenomegalia; pueden faltar los síntomas de neumonía atípica o de un estado tifoideo, con estertores y matidez cardíaca, y los signos externos corrientes de catarro y neumonía. Esputos ligeramente amarillos y muy viscosos. El leucograma es normal, o ligeramente elevado al principio, con leucopenia más tarde.

Focos de infección. Canarios, palomas, loros, periquitos y otros pájaros. A veces transmiten la enfermedad ejemplares que parecen estar sanos.

Modo de transmisión. El virus se encuentra en la sangre, la saliva y las heces de aves infectadas. La enfermedad se propaga por contacto con ellas o con el medio en que han estado recientemente.

Período de incubación. De seis a quince días, en los casos humanos.

Sensibilidad e inmunidad. La enfermedad se presenta en todas las edades, pero es más grave en personas ancianas. El restablecimiento va seguido de inmunidad.

Frecuencia. Los brotes suelen ser repentinos, por exposición al contacto con aves enfermas. Las defunciones se limitan generalmente a adultos de más de treinta años. Pueden producirse casos leves por contacto con aves infectadas que no estén enfermas.

Prevención y tratamiento. Estricta regulación del comercio de pájaros psitácidos. Instrucción del público sobre los peligros de estas aves, en par-

ticular de las recién importadas. Deben ser sometidas a cuarentena las casas y las tiendas que alberguen pájaros infectados.

La enfermedad se puede diagnosticar por la presencia de virus en la saliva y la sangre durante la primera semana de la infección. El suero contiene anticuerpos fijadores del complemento. Las personas infectadas deben aislarse durante las fases febril y clínica aguda. Al asistir a pacientes que tosan, hay que llevar mascarilla. Desinfección de excreciones y de objetos contaminados por ellas. Los pájaros infectados se quemarán, y se limpiarán y se desinfectarán con cuidado los edificios en que hayan estado. Es conveniente el empleo de un antibiótico adecuado lo antes posible.

Véase más información en Francis, Milzer y Gordon (1947), Heinmets y Golub (1948), Wagner, Golub y Andrew (1948).

Resfriado común. El agente etiológico es un virus, o varios, aunque hubo un tiempo en que se suponía que lo causaban numerosas bacterias.

Enfermedad producida. Infección catarral aguda muy contagiosa de la nariz, la garganta, la laringe, los senos, la tráquea y los bronquios principales, que dura generalmente dos a siete días. Suele ir acompañada de una elevación de temperatura el primer día, y de sensaciones de escalofrío, con coriza y lasitud.

Focos de infección. Excreciones nasales y faríngeas de personas infectadas u objetos recién contaminados por ellas.

Modo de transmisión. Por lo regular, directamente, mediante gotitas de saliva infectada que se disemina en el aire al toser, estornudar o hablar, e indirectamente por objetos recién contaminados.

Período de incubación. Probablemente doce a setenta y dos horas. La contagiosidad se limita a las primeras fases de la dolencia, aunque el virus permanece en las excreciones durante un período indeterminado.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es universal. El restablecimiento va seguido de inmunidad por espacio de un mes, poco más o menos.

Frecuencia. La mayoría de las personas contraen un resfriado una o más veces al año; son sensibles por igual los dos sexos. Es mayor la frecuencia en niños de menos de cinco años, y disminuye pasados los veinte.

Prevención y tratamiento. Las personas infectadas deben evitar el contacto con otras y conviene guardar cama durante la fase aguda. Las evacuaciones nasales y bucales se apartarán de las demás, y se eliminarán mejor quemándolas. Desinfección de utensilios de mesa.

Para más información, véanse Dingle (1947), Horsfall (1948 *b*), Pollard y Caplovitz (1947), Topping y Atlas (1947).

Rubéola o roséola. Infección específica benigna por virus, caracterizada por fiebre, erupción cutánea, que a veces se asemeja a la del sarampión, y otras a la de escarlatina, o a ambas, y suele presentarse sin otros síntomas, pero casi siempre acompañada de hipertrofia de los nódulos linfáticos postauriculares, suboccipitales y cervicales.

Focos de infección. Secciones de la nariz y la boca.

Modo de transmisión. Directamente de una persona a otra; por gotitas de saliva infectada que se disemina en el aire al toser, estornudar y hablar; por objetos recién contaminados por las secreciones de una persona infectada.

Período de incubación. De diez a veinte días; generalmente dieciocho.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general en niños. Suele quedar inmunidad adquirida permanente después del restablecimiento. La afección es más corriente en adultos que el sarampión.

Frecuencia. Se presenta más a menudo en niños, sobre todo en invierno y primavera.

Sarampión. Virus filtrable de tamaño y forma desconocidos. Las partículas de virus se destruyen a 55° C en quince minutos; resisten a la desecación y la congelación durante largo tiempo.

Enfermedad producida. Es una afección específica muy contagiosa, caracterizada por fiebre, síntomas catarrales en los ojos, la nariz y la faringe y erupción precoz en la boca. Manchas de Koplick, erupción cutánea seguida de descamación durante la convalecencia.

Focos de infección. Secreciones nasales y faríngeas de las personas infectadas.

Modo de transmisión. Directamente de persona a persona; por gotitas de saliva infectada que se disemina en el aire al toser, estornudar y hablar; por objetos recién contaminados por excreciones de un individuo enfermo.

El sarampión es una de las enfermedades más fácilmente transmisibles entre las contagiosas.

Período de incubación. Tras la exposición, la fiebre se presenta hacia los diez días; la erupción, en trece a quince días, a veces antes o después.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. La dolencia ataca con más frecuencia a niños de cinco a catorce años.

El restablecimiento suele ir seguido de inmunidad adquirida permanente.

Frecuencia. Es universal; casi todas las personas (hasta 90 %) han padecido sarampión alguna vez en la vida. Es corriente en la infancia.

Prevención y tratamiento. Puede emplearse globulina inmunizante para la inmunización pasiva de niños de menos de tres años, en familias donde se presenten casos de sarampión.

Aislamiento de las personas infectadas durante los períodos de comunicabilidad, a fin de preservarlas de reinfección, y como protección para las demás. El período de aislamiento es de unos catorce días desde que aparece la erupción. Desinfección de objetos contaminados por excreciones recientes, nasales y faríngeas, de personas infectadas.

La inmunidad pasiva se puede transmitir a individuos sanos, antes de aparecer el sarampión, mediante inyección de suero de convalecientes o de una persona restablecida de la enfermedad; esta inmunidad pasiva persiste a veces unas cuatro semanas. Durante una epidemia, el suero de convalecientes puede prevenir la afección o reducir la gravedad del ataque. en este último caso, basta generalmente un sarampión benigno para proporcionar una inmunidad permanente.

Varicela. Enfermedad vírica aguda, sumamente contagiosa, caracterizada por fiebre, síntomas constitucionales leves, una erupción cutánea que interesa las capas superficiales de la piel y dura tres a cuatro días, dejando una costrita granular. Las vesículas tienden a ser más abundantes en las partes cubiertas del cuerpo. A veces las vesículas son tan pocas que escapan a la observación. También se presentan lesiones en el cuero cabelludo y en las membranas mucosas de las vías respiratorias altas.

Focos de infección. Hay virus en las lesiones de la piel y de las vías respiratorias altas (fig. 261). La enfermedad se puede contagiar antes de manifestarse la erupción.

Modo de transmisión. De persona a persona, por contacto directo; por objetos recién contaminados por excreciones de personas infectadas.

Período de incubación. De dos a tres semanas; generalmente, catorce a dieciséis días. La enfermedad es contagiosa, probablemente a lo sumo desde un día antes hasta no más de seis días después de aparecer las vesículas. Especialmente comunicable en las primeras fases de la erupción.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es universal entre quienes no la han padecido. Un 70 % de las personas la han tenido antes de los quince años. El restablecimiento suele ir seguido de inmunidad activa permanente.

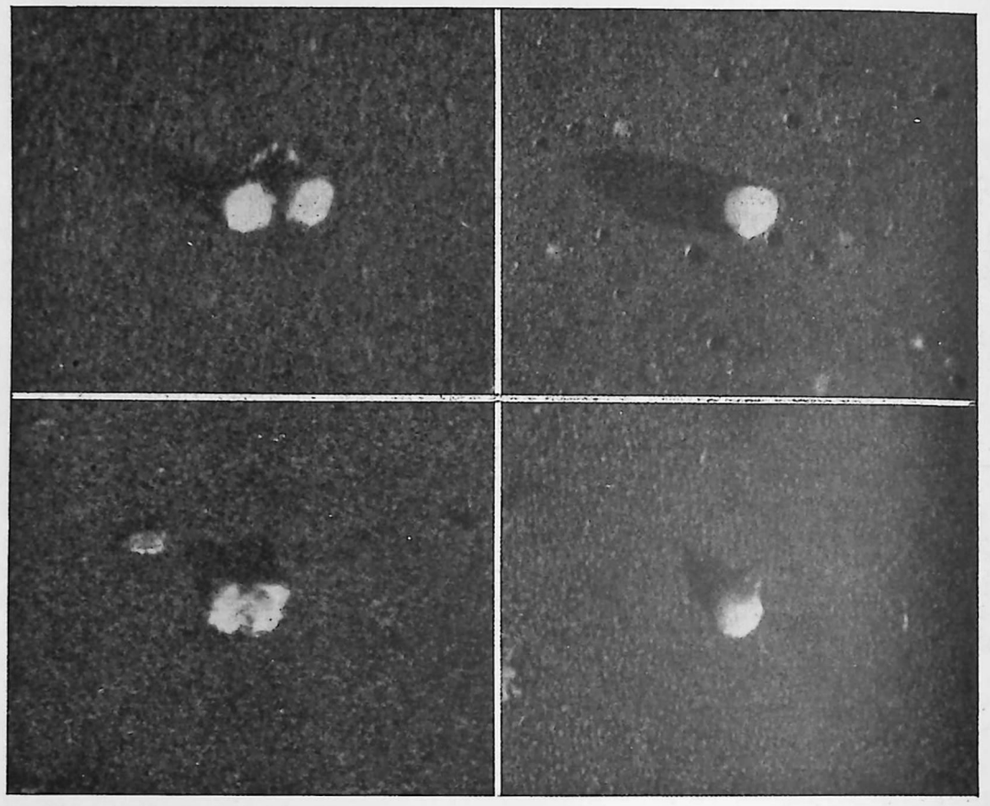


Fig. 261.—Micrografías electrónicas de virus de varicela aislado de casos humanos, con sombreado de oro. Aumento: 1:24.800. (Según Nagler y Rake.)

Prevención y tratamiento. Las personas infectadas deben aislarse durante el período de contagiosidad. Desinfección de las excreciones nasales y faríngeas, y de los objetos contaminados por ellas.

Véase más información en Nagler y Rake (1948), Rake, Blank, Coriell, Nagler y Scott (1948) y Stokes (1948).

Viruela. Virus capaz de atravesar la mayoría de los filtros, resistente a bajas temperaturas, glicerina al 50 % y fenol al 0,5 %, pero sensible al calor, que lo destruye a 55° C o más. Se cree que los corpúsculos de Paschen son las partículas del virus causante de la enfermedad, y pueden demostrarse en el líquido vesicular (fig. 262).

Enfermedad producida. Enfermedad infecciosa específica aguda, caracterizada por un comienzo súbito, generalmente con intensos escalofríos, subida rápida de temperatura, seguida de una erupción que pasa por fases papulosa, vesicular y pustulosa; suele dejar señales permanentes. La erupción es más abundante y precoz en la cara, y luego en los antebrazos, las muñecas y las manos, con preferencia más bien por los miembros que por el tronco. Las lesiones son más numerosas en los hombros y el pecho que en la región lumbar y el abdomen.

La vacuna y el alastrim son formas leves de la enfermedad, probablemente causadas por el mismo virus, alterado en su virulencia.

Focos de infección. Lesiones de las membranas mucosas y de la piel de personas infectadas.

Modo de transmisión. Contacto con personas enfermas o con objetos contaminados por sus excreciones.

Período de incubación. De siete a dieciséis días, generalmente doce. Los tipos benignos suelen tener períodos de incubación más largos.

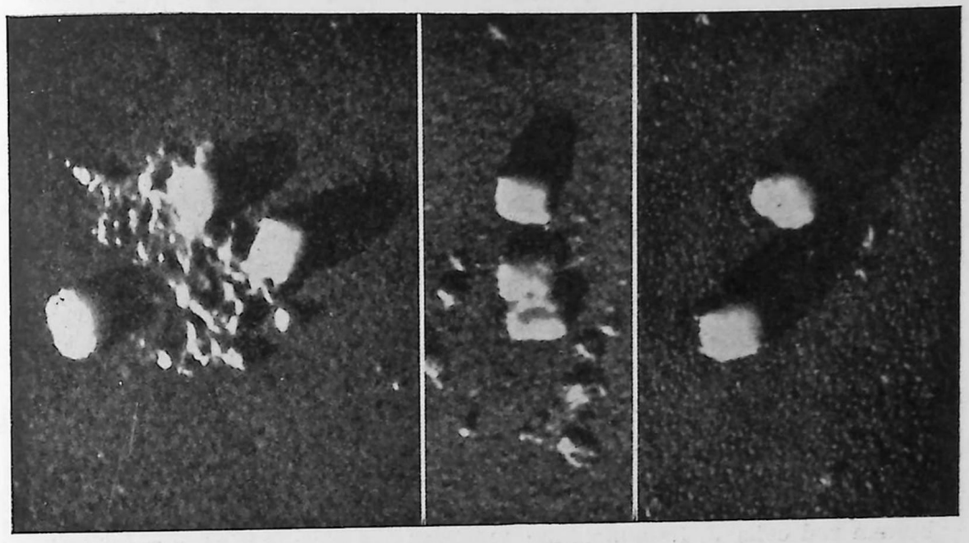


Fig. 262. — Virus variólico de un caso humano de viruela, sombreado con oro. (Según Nagler y Rake.)

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es universal, pero no enferman todos los individuos expuestos. La recuperación suele ir seguida de inmunidad activa permanente. La inmunidad activa artificial puede persistir cinco años.

Según Smadel y Rivers (1952), Shedlovsky y Smadel (1942) y Rivers (1943), la vacuna contiene dos antígenos solubles, componentes *L* y *S*. El antígeno *L* es termolábil, y el *S*, termostable. Ambos se presentan como un complejo constituido por una sola substancia proteínica, con dos partes serológicamente activas, cada una de las cuales se puede degradar independientemente de la otra. Este solo antígeno complejo *L-S* precipita a concentraciones iguales con cantidades óptimas de anticuerpos *L* y *S*, y se elimina por completo de la solución absorbiéndolo con uno u otro anticuerpo.

El suero vacunal inmunizante parece contener anticuerpos aglutinantes, precipitantes, fijadores del complemento y neutralizantes.

Frecuencia. Distribución esporádica o endémica, casi cosmopolita. Es más corriente en invierno y menos en verano.

Prevención y tratamiento. Los individuos enfermos deben ser aislados en salas protegidas. Desinfección de objetos contaminados por secreciones de personas infectadas. Limpieza y desinfección minuciosas de locales.

Vacunación general en la primera infancia, que confiere protección durante unos cinco años. Los niños deben ser revacunados al ingresar en la escuela, y hay que tratar de igual modo a toda la población cuando se presente la enfermedad en forma grave.

La vacuna más generalmente empleada se obtiene de linfa de ternera, frotando el virus en el abdomen escarificado de terneras de seis meses. A los cinco días se raspan las zonas escarificadas en condiciones asépticas. La pulpa recogida se mezcla con dos veces su peso de agua, y se pasa por un tamiz. La emulsión se conserva por adición de glicerina y fenol, para una concentración final de 50 % de la primera y 0,5 % del segundo. La pulpa se conserva a 10° C.

Otra vacuna que se ha empleado mucho se prepara cultivando el virus en un medio compuesto de tejidos desmenuzados de embrión de pollo suspendidos en solución de Tyrode; éste es un medio de tejidos vivos.

Para más información, véanse Brownlee y Hamre (1951), Levaditi y Vaisman (1951), y Smadel (1948).

Otros particulares a propósito de virus se encontrarán en American Public Health Association (1950), Burnet (1945) Evans (1950), Fildes y Van Heyningen (1953), Horsfall (1950), Luria (1953), Rhodes y Van Rooyen (1953), Rivers y otros (1948), Smadel (1950), Van Rooyen y Rhodes (1948), y Warren (1950).

REFERENCIAS

American Public Health Association: «The control of Communicable Diseases», Nueva York, 1950.

Beveridge, W. I. B., y P. E. Lind: Mumps. III. Immunization experiments in man, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **25**: 337, 1947.

Briody, B. A.: Characterization of the «enzymic» action of influenza viruses on human red cells, *J. Immunol.*, **59**: 115, 1948.

Brownlee, K. A., y D. Hamre: Studies on chemotherapy of vaccinia virus. I. An experimental design for testing antiviral agents, *J. Bact.*, **61**: 127, 1951.

Burnet, F. M.: «Virus as Organism», Cambridge, Mass., Harvard University Press, 1945.

Carlson, H. J., G. M. Ridenour, y C. F. McKhann: Effect of the activated sludge process of sewage treatment on poliomyelitis virus, *Am. J. Pub. Health*, **33**: 1083, 1943.

Chu, C. M.: Inactivation of haemagglutinin and infectivity of influenza and Newcastle disease viruses by heat and by formalin, *J. Hyg.*, **46**: 247, 1948.

Commission on Acute Respiratory Diseases: Studies of the 1943 epidemic of influenza, *Am. J. Hyg.*, **48**: 253, 1948.

Dawson, I. M., y W. J. Elford: The investigation of influenza and related viruses in the electron microscope, by a new technique, *J. Gen. Microbiol.*, **3**: 298, 1949.

Dingle, J. H.: Experimental studies of the «common cold» in human volunteers, *Trans. & Studies Coll. Physicians Phila.*, **15**: 113, 1947.

Evans, E. A., Jr.: Studies on the mechanism of reproduction of a virus, *Bact. Rev.*, **14**: 210, 1950.

Fildes, Sir P., y W. E. Van Heyningen: «The Nature of Virus Multiplication», Londres y Nueva York, Cambridge University Press, 1953.

Francis, R. D., A. Milzer, y F. B. Gordon: Inmunization of mice against viruses of the Psittacosis Group with ultraviolet- inactivated vaccines, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **6**: 184, 1947.

Ginsberg, H. S., W. Goebel, y F. L. Horsfall, Jr.: The inhibitory effect of polysaccharide on mumps virus multiplication, *J. Exp. Med.*, **87**: 385, 1948.

—, —, y —: The effect of polysaccharides on the reaction between erythrocytes and viruses, with particular reference to mumps virus, *ibid.*, **87**: 411, 1948.

Habel, K.: Cultivation of mumps virus in the developing chick embryo and its aplication to studies of immunity to mumps in man, *Pub. Health Reports*, **60**: 201, 1945.

Hammon, W. McD.: Immunity in poliomyelitis, *Bact. Rev.*, **13**: 135, 1949.

— y E. C. Roberts: Serum neutralizing antibodies to the infecting strain of virus in poliomyelitis patients, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**: 256, 1948.

Heinmets, F., y O. J. Golub: Observations on the growth of psittacosis virus in chorioallantoic membranes by electron microscope, *J. Bact.*, **56**: 509, 1948.

Henle, W., y G. Henle: The effect of ultraviolet irradiation on various properties of influenza viruses, *J. Exp. Med.*, **85**: 347, 1947.

Henle, G., J. Stokes, Jr., J. S. Burgoon, W. J. Bashe, Jr., C. F. Burgoon, W. Henle, y G. R. Hunt, Jr.: Studies on the prevention of mumps. I. The determination of susceptibility. II. The effect of skin testing upon antibody level and resistance. III. The effect of subcutaneous injection of inactivated mumps virus vaccines. IV. The effect of oral spraying of attenuated active virus, *J. Immunol.*, **66**: 535, 1951.

Hirst, G. K.: Influenza. De «Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections», ed. por F. L. Horsfall, Jr., Nueva York, Columbia University Press, 1949.

Horsfall, F. L., Jr.: Common cold. De «Viral and Rickettsial Infections of Man», ed. por T. M. Rivers, Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948*a*.

—: Influenza. *Ibíd.*, 1948b.

—: Approaches to the control of viral diseases, *Bact. Rev.*, **14**: 219, 1950.

Klein, M., J. H. Brewer, J. E. Pérez, y B. Day: The inactivation of influenza virus by mercurials and the reactivation by sodium thioglycolate and BAL, *J. Immunol.*, **59**: 135, 1948.

Knight, C. A.: Amino acid composition of highly purified viral particles of influenza *A y B*, *J. Exp. Med.*, **86**: 125, 1947.

— y W. M. Stanley: The effect of some chemicals on purified influenza virus, *ibíd.*, **79**: 291, 1944.

Lauffer, M. A., H. L. Carnelly, y E. MacDonald: Thermal destruction of influenza *A* virus infectivity, *Arch. Biochem.*, **16**: 321, 1948.

Lensen, S. G., M. Rhian, M. R. Stebbins, R. C. Backus, y C. E. Peterson: Inactivation of partially purified poliomyelitis virus in water by chlorination, *Am. J. Pub. Health*, **39**: 1120, 1949.

Levaditi, C., y A. Vaisman: Le vaccin Jennérien appartient-il au groupe des virus réellement neurotropes?, *Rev. d'immunologie*, **15**: 158, 1951.

Loosli, C. G.: The pathogenesis and pathology of experimental air-borne influenza virus *A* infections in mice, *J. Infectious Diseases*, **84**: 153, 1949.

Luria, S. E.: «General Virology», Nueva York, John Wiley & Sons, Inc., 1953.

Melnick, J. L.: The poliomyelitis, encephalomyocarditis, and coxsackie groups of viruses, *Bact. Rev.*, **14**: 233, 1950.

Murphy, J. S., y F. B. Bang: Observations with the electron microscope on cells of the chick chorio-allantoic membrane infected with influenza virus, *J. Exp. Med.*, **95**: 259, 1952.

—, D. T. Karzon, y F. B. Bang: Studies of influenza *A* (*PR8*) infected tissue cultures by electron microscopy, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**: 596, 1950.

Nagler, F. P. O., y G. Rake: The use of the electron microscope in diagnosis of variola, vaccinia, and varicella, *J. Bact.*, **55**: 45, 1948.

Olitsky, P. K., y J. Casals: Viral encephalitides. De «Viral and Rickettsial Infections of Man», ed. por T. M. Rivers, Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948.

Pearson, H. E., y G. C. Brown: Recovery of virus from throats of poliomyelitis patients, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**: 503, 1947. Pollard, M. y C. D. Caplovitz: Experimental studies with the agent of he common cold, *Science*, **106**: 243, 1947.

Rake, G., H. Blank, L. L. Coriell, F. P. O. Nagler, y T. F. McN. Scott: The relationship of varicella and herpes zoster: electron microscope studies, *J. Bact.*, **56**: 293, 1948.

Rhodes, A. J., E. M. Clark, D. S. Knowles, A. M. Goodfellow, y W. L. Donohue: Prolonged survival of human poliomyelitis virus in experimentally infected river water, *Can. J. Public Health*, **41**: 146, 1950.

— y C. E. van Rooyen: «Textbook of Virology», Nueva York, Thomas Nelson & Sons, 1953.

Rivers, T. M.: Virus diseases with particular reference to vaccinia. De «Virus

Diseases», ed. por T. M. Rivers, Ithaca, N. Y., Cornell University Press, 1943.
Rivers, T. M.: «Viral and Rickettsial Infections of Man», Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948.
Sabin, A. B.: Dengue. De «Viral and Rickettsial Infections of Man», ed. por T. M. Rivers, Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948.
—: The dengue group of viruses and its family relationships, *Bact. Rev.*, **14**: 225, 1950.
Salk, J. E.: Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis, *J. Am. Med. Assoc.*, **151**: 1081, 1953.
Schlesinger, R. W.: The diagnosis of dengue. De «Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections», ed. por F. L. Horsfall, Jr., Nueva York, Columbia University Press, 1949.
Sharp, D. G.: Enumeration of virus particles by electron micrography, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**: 54, 1949.
Shedlovsky, T., y J. E. Smadel: The *LS*-antigen of vaccinia. II. Isolation of a single substance containing both *L*-and *S*-activity, *J. Exp. Med.*, **75**: 165, 1942.
Smadel, J. E.: Smallpox and vaccinia. De «Viral and Rickettsial Infections of Man», ed. por T. M. Rivers, Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948.
—: Laboratory diagnosis of viral and rickettsial diseases, a reappraisal after ten years, *Bact. Rev.*, **14**: 197, 1950.
— y T. M. Rivers: The *LS*-antigen of vaccinia. I. Inhibition of *L*-and *S*-antibodies by substances in treated vaccine dermal filtrate, *J. Exp. Med.*, **75**: 151, 1942.
Stanley, W. M.: Chemical studies on viruses, *Chem. Eng. Nexs*, **25**: 3786, 1947.
Stokes, J., Jr.: Varicella-herpes zoster group. De «Viral and Rickettsial Infections of Man», ed. por T. M. Rivers, Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948.
Syverton, J. T., W. F. Scherer, y G. Butorac: Propagation of poliomyelitis virus in cultures of monkey and human testicular tissues, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **77**: 23, 1951.
Topping, N. H., y L. T. Atlas: The common cold: A note regarding isolation of an agent, *Science*, **106**: 636, 1947.
Van Rooyen, C. E., y A. J. Rhodes: «Virus Diseases of Man», Nueva York, Thomas Nelson & Sons, 1948.
Warren, J.: Progress in the purification of viruses of animals, *Bact. Rev.*, **14**: 200, 1950.
Weil, M. L., D. Beard, D. G. Sharp, y W. Beard: Purification and sedimentation and electron micrographic characters of the mumps virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**: 309, 1948.
Weller, T. H., F. C. Robbins, y J. F. Enders: Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**: 153, 1949.
Wenner, H. A., y W. A. Tanner: Widespread distribution of poliomyelitis in households attacked by the disease, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**: 92, 1947.

CAPíTULO XXX

ENFERMEDADES HUMANAS POR RICKETTSIAS

Las enfermedades humanas producidas por rickettsias se pueden definir como infecciones provocadas por microorganismos bacilares a cocoides, pequeños, a menudo pleomórficos, que se encuentran en el interior de las células de piojos, pulgas, garrapatas y ácaros. Presentan cierta semejanza morfológica con las bacterias, pero biológicamente son afines a los virus. Las rickettsias se ven fácilmente en preparaciones microscópicas. Las lesiones patológicas que originan se observan sobre todo en los vasos sanguíneos, y se deben a la presencia de los gérmenes, no de sus toxinas.

De acuerdo con el artrópodo específico vector, las enfermedades por rickettsias se pueden dividir en transmitidas por insectos (tifus exantemático propagado por piojos y pulgas), por garrapatas (fiebre purpúrea de las Montañas Rocosas, fiebre *K*), y por ácaros (fiebre fluvial japonesa, rickettsiosis pustulosa).

Microorganismos productores. Las rickettsias se llaman así en homenaje a Howard Taylor Ricketts, el primero que describió estos gérmenes con ocasión de sus estudios sobre la fiebre purpúrea de las Montañas Rocosas, y, más tarde, sobre el tifus exantemático. Consiguió aislar de la sangre de los enfermos de esta última dolencia unos microbios bacilares inmóviles, de 0,3 μ de diámetro y 2 μ o menos de longitud aproximada. Estos microorganismos tomaban bien el giemsa, y poseían una raya débilmente teñida a través de la parte central, que les hacía parecer diplobacilos. Más tarde, Roche-Lima (1916) confirmó las observaciones de Ricketts.

Con posterioridad al descubrimiento de Ricketts, comunicaron Hegler y Prowazek (1913) y otros la presencia de microorganismos similares en la sangre de enfermos de tifus exantemático y en los piojos que habían picado a personas infectadas.

Las rickettsias son, como queda indicado, gérmenes cocoides o bacilares, gramnegativos, y se encuentran típicamente en artrópodos. Las especies patógenas para el hombre se encuentran en las células

de los tejidos de sus huéspedes animales y artrópodos. No se han cultivado en los medios corrientes de laboratorio; sin embargo, se desarrollan en los diversos medios de cultivo hísticos. En cuanto a dimensiones, las rickettsias ocupan una posición intermedia entre bacterias y virus. Con excepción de una especie patógena, no pasan por los filtros que retienen las bacterias.

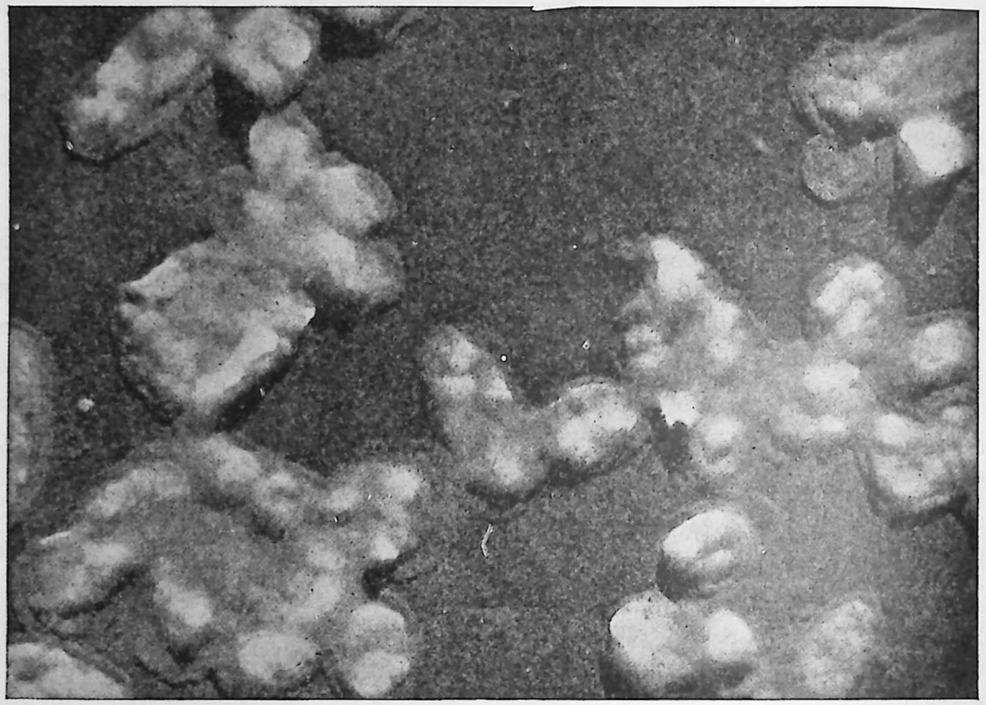


Fig. 263. — Micrografía electrónica de *Rickettsia prowazekii*, agente etiológico del tifus exantemático epidémico o clásico (transmitido por piojos). Aumento: 20.000 diámetros. (Según Van Rooyen y Scott.)

Tifus exantemático. Esta enfermedad se diferencia generalmente en dos tipos: *A*, tifus exantemático epidémico o clásico (por piojos), y *B*, tifus endémico o murino (por pulgas).

A. *Tifus exantemático epidémico o clásico (por piojos).* El agente etiológico es la *Rickettsia prowazekii.* Los gérmenes varían entre formas cocoides elipsoidales diminutas y formas ovoides a bacilares, y a veces son bacilos largos, hasta filamentosos, a menudo apareados, eventualmente en cadenas. Las células sueltas miden 0,25 por 0,4 hasta 0,3 por 0,45 μ (fig. 263). Se encuentran dentro de células vasculares endoteliales y de células serosas y son inmóviles.

Los microorganismos se cultivan en el tejido plasmático de células de mamíferos, en el intestino del piojo, y en la membrana corioalantoica y el saco vitelino del embrión de pollo. Las células se inactivan fácilmente a 50 ° C en quince a treinta minutos, con fenol al 0,5 % y con formol al 0,1 %

Enfermedad producida. Comienzo frecuentemente súbito. Se caracteriza por cefalalgia, fiebre y dolores generalizados, con una erupción maculosa a los cinco o seis días, y toxemia. La fiebre suele remitir por lisis rápida al cabo de catorce días. Pueden encontrarse gérmenes en los vasos sanguíneos de la piel, los riñones, los músculos, el cerebro y los testículos.

El índice de mortalidad oscila entre 10 y 40 %, según la epidemia y la edad. Es patógeno para simios, monos, cobayos y ciertas especies de ratas.

El suero de los enfermos de tifus exantemático epidémico aglutina algunas cepas de *Proteus* conocidas por *Proteus* OX_{19} y OX_2. Esta prueba se denomina reacción de Weil-Felix; la primera cepa se aglutina más comúnmente, y es la que suele emplearse. La reacción se hace generalmente positiva durante la segunda semana de enfermedad, alcanza su culminación hacia la convalencia, y desaparece con bastante rapidez.

Focos de infección. Personas infectadas.

Modo de transmisión. Transmisión de gérmenes de una persona a otra por el piojo *Pediculus humanus,* después de picar a un sujeto infectado. Se encuentran gérmenes en las heces del piojo. Las células se inoculan con las heces al rascar la picadura o a través de otras lesiones cutáneas superficiales. Las ropas sucias contaminadas por heces del piojo diseminan microorganismos en el aire, de donde pueden pasar a las vías respiratorias.

Período de incubación. De seis a quince días, generalmente doce.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Al restablecimiento sigue una inmunidad adquirida, que no siempre es permanente.

Frecuencia. Es corriente la enfermedad en personas que viven en condiciones de aglomeración y sin higiene, sobre todo en los meses fríos.

Prevención y tratamiento. Despiojamiento de personas infectadas, que deben aislarse de las demás. Empleo de insecticidas en la ropa de vestir y de cama del paciente y tratamiento especial del cabello para destruir las liendres. Inmunización mediante vacuna; ésta se prepara cultivando rickettsias en el saco vitelino del embrión de pollo. La suspensión, previamente depurada, se inactiva con formol. La vacuna suele aplicarse en dos inyecciones y preserva bastante. Debe repetirse la inmunización cada pocos meses, cuando amenace la enfermedad. La vacunación reduce el peligro de infección, modifica el curso de la dolencia y disminuye el índice de letalidad.

La frecuencia puede reducirse mucho mejorando las condiciones de vida, bañándose a menudo y disminuyendo el número de piojos.

El empleo de agentes antibióticos o quimioterápicos adecuados abrevia el curso de la enfermedad.

B. *Tifus exantemático endémico o murino (por pulgas).* El agente etiológico es la *Rickettsia typhi.* Las células se parecen a las de *R. prowazekii* por sus propiedades morfológicas y de coloración (fig. 264); son inmóviles, gramnegativas.

Los microorganismos se cultivan en tejido plasmático de células de mamíferos, en pulgas, en la cavidad peritoneal de ratas tratadas con rayos Roentgen, en los pulmones del ratón blanco y las ratas blancas, después de inoculaciones nasales; en los pulmones de conejos, después de inoculación endotraqueal; en la membrana corioalantoica y el saco vitelino del embrión de pollo.

Enfermedad producida. Los caracteres clínicos de este tipo de dolencia son idénticos a los del epidémico o transmitido por piojos, salvo que los síntomas suelen ser mucho menos graves. La erupción, en el tipo endémico, no se presenta habitualmente antes del quinto día, y puede consistir sólo en unas pocas manchas que tienden a desaparecer en un día aproximadamente. Índice de mortalidad para todas las edades, 2 %.

Se distingue de las rickettsias de la fiebre purpúrea de las Montañas Rocosas, de la fiebre Q y de la fiebre fluvial japonesa por las reacciones de fijación del complemento, de aglutinación y de precipitación, y menos fácilmente de la *R. prowazekii* mediante otros ensayos.

El suero del tifus exantemático endémico aglutina también ciertas cepas de *Proteus* OX_{19} y OX_2, más a menudo las primeras, que son las que se usan habitualmente.

Focos de infección. Ratas infectadas, especialmente la especie *Rattus norvegicus*, y otros roedores.

Modo de transmisión. El germen se transmite del roedor al hombre por picadura y heces infectadas de pulgas, comúnmente de la especie *Xenopsilla cheopis*.



Fig. 264. — Micrografía electrónica de *Rickettsia typhi*, agente etiológico del tifus exantemático endémico o murino (transmitido por pulgas.) Aumento: 20.000 diámetros. (Según Van Rooyen y Scott.)

Período de incubación. De seis a catorce días, generalmente doce.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. El restablecimiento va seguido de inmunidad adquirida, no siempre permanente.

Frecuencia. Ampliamente difundida en climas templados, semitropicales y tropicales. Se transmite durante todo el año, pero sobre todo en los meses de calor.

Prevención y tratamiento. Represión de las ratas mediante trampas, venenos y medios de protección. Los dos primeros recursos deben ser continuos si han de dar buen resultado; la protección contra las ratas es lo único que puede estimarse de utilidad permanente.

Se prepara una vacuna contra el tifus exantemático endémico, del mismo modo que para el epidémico, y está considerada como de eficacia equivalente.

Véase más información en Bovarnick y Snyder (1949), Castañeda (1948), Ris y Fox (1949), Topping y otros (1945), Van Rooyen y Scott (1949).

Fiebre purpúrea americana o de las Montañas Rocosas (por garrapatas). El agente etiológico es la *Rickettsia rickettsii*; microorganismos apareados en el centro de una estrecha zona clara o halo, a menudo semejantes a un minúsculo par de neumococos. Miden 0,2 a 0,3 por 1 μ, son inmóviles (fig. 265) y se encuentran en el citoplasma y el núcleo de todos los tejidos de la garrapata, así como en el endotelio vascular, las células serosas de la cavidad peritoneal, las células de la musculatura lisa de las paredes arteriolares, y los macrófagos de mamíferos.

Pueden ser cultivados en tejidos plasmáticos de células de mamíferos, en la membrana corioalantoica y el saco vitelino del embrión de pollo y en garrapatas.

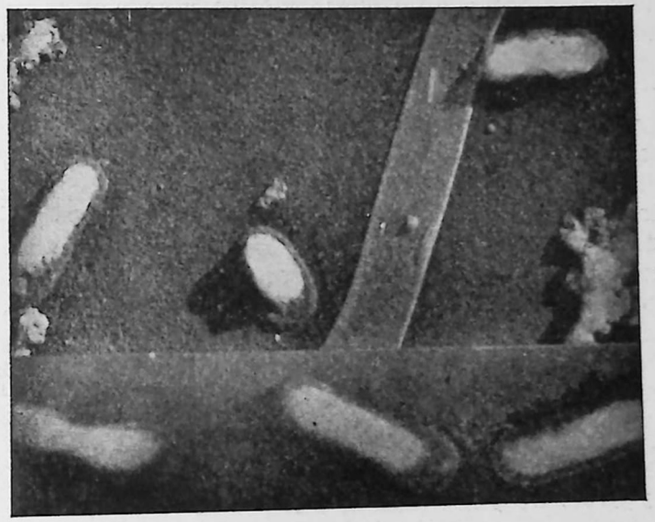


Fig. 265. — Micrografía electrónica de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico de la fiebre purpúrea de las Montañas Rocosas. Aumento: 20.000 diámetros. (Según Van Rooyen y Scott.)

El recuento de leucocitos da una cifra algo superior a la normal. El suero de enfermos de fiebre purpúrea aglutina cepas de Proteus OX_{19} y OX_2. Como lo hace también el suero de tifus exantemático, no es posible distinguir las dos enfermedades por esta reacción. Lo mismo que en infecciones de tifus exantemático, la reacción de aglutinación suele volverse positiva hacia el final de la segunda semana, alcanza su apogeo en la convalecencia, y desaparece luego con cierta rapidez.

Las células se inactivan a una temperatura de 50° C en diez minutos, con formol al 0,1 %, y con fenol al 0,5 %. Se destruyen por desecación en unas diez horas.

Enfermedad producida. Es una dolencia infecciosa específica, caracterizada por comienzo brusco, fiebre, cefalea, dolores en músculos y articulaciones, escalofríos, erupción maculosa, comúnmente primero en las extremidades, y que se extiende con rapidez por casi todo el cuerpo; irritabilidad e hiperestesia de la piel, esplenomegalia y catarro de las vías respiratorias. Los enfermos tienen antecedentes de picadura de garrapata o exposición a ella. El índice de mortalidad varía con la edad y el sitio; en Norteamérica es de un 20 % para todas las edades.

Focos de infección. Garrapatas infectadas. En los Estados Unidos del Este y el Sur, el vector común es la garrapata *Dermacentor variabilis* del

perro; en los del Noroeste, el *D. andersoni*, de la madera; en los del Sudoeste puede ser a veces el *Amblyomma americanum*, garrapata de Tejas o de la estrella solitaria. En el Brasil suele serlo el *A. cajennense*. La infección ha pasado por varias generaciones de garrapatas, probablemente mantenida por larvas que pican a roedores silvestres sensibles.

Modo de transmisión. La enfermedad se transmite por picadura de una garrapata infectada o por contacto con sangre o heces de este artrópodo a través de la piel intacta.

Período de incubación. De tres a diez días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. El restablecimiento va seguido de inmunidad adquirida, no siempre permanente.

Frecuencia. Se observa en Norteamérica y en ciertas zonas sudamericanas. Es más corriente en primavera y principios de verano, coincidiendo con la aparición de garrapatas adultas.

Prevención y tratamiento. Hay que eliminar de los pacientes todas las garrapatas y destruirlas. Asimismo deben evitarse los territorios que se sepan infestados. Las garrapatas se desprenderán del cuerpo lo antes posible, sin estrujarlas; se destruyen las dos zonas infestadas aclarando y quemando la vegetación, y exterminando los animales pequeños notoriamente infestados de ellas.

Existe una vacuna, preparada del saco vitelino del embrión de pollo. La vacunación disminuye las ocasiones de infección, así como el índice de mortalidad, y protege durante uno a dos años; no es eficaz una vez contraída la dolencia.

Puede emplearse un antibiótico adecuado, que reduce los casos fatales y abrevia el curso de la enfermedad.

Se encontrará más información en Harrell (1949), Lackman y Parker (1948), Van Rooyen y Scott (1949).

Fiebre Q o de Queensland. El agente etiológico es la *Rickettsia burneti*. Microorganismos pleomórficos pequeños, bacilares y cocoides, que se encuentran dentro de las células, en el citoplasma, y fuera de ellas, en las garrapatas infectadas. Los pequeños bacilos lanceolados miden 0,25 por 0,4 a 0,5 μ (fig. 266); las formas bipolares, 0,25 por 1 μ, y los diplobacilos, 0,25 por 1,5 μ. Son gramnegativos e inmóviles.

Pueden ser cultivados en tejido plasmático y en el saco vitelino del embrión de pollo.

El germen pasa fácilmente por filtros N de Berkefeld, que retienen las bacterias corrientes, y los W, impermeables a las rickettsias del tifus exantemático y de la fiebre purpúrea americana. Resiste una temperatura de 60° C durante una hora, formol al 0,5 % y fenol al 0,1 %, ensayando con huevos fecundados.

Enfermedad producida. La fiebre Q se caracteriza por un comienzo rápido, sensaciones de escalofrío, dolores de cabeza, malestar y sudores profusos. En la mayoría de los casos sobreviene neumonía viroide o atípica, acompañada de tos benigna, ligera expectoración y dolor torácico; las vías respiratorias altas se mantienen esencialmente normales. La enfermedad se diagnostica por medio de la reacción de fijación del complemento.

Focos de infección. El enfermo suele tener antecedentes de contacto con ganado vacuno, ovino o cabrío, y con garrapatas, agente patógeno para el hombre, el cobayo y el ratón blanco. Se observan infecciones benignas en monos, perros, ratas blancas, conejos y vacas. El germen abunda en la

glándula mamaria y la leche de vacas infectadas, y también se encuentra en las de oveja y de cabra.

Modo de transmisión. No se conoce bien. Se ha atribuido a contacto con animales infectados (vacas, ovejas, cabras) un buen número de los casos comunicados. La leche es un medio importante de diseminación de los microbios; éstos se destruyen mediante la pasteurización. Las garrapatas infectadas participan asimismo a veces en la transmisión.

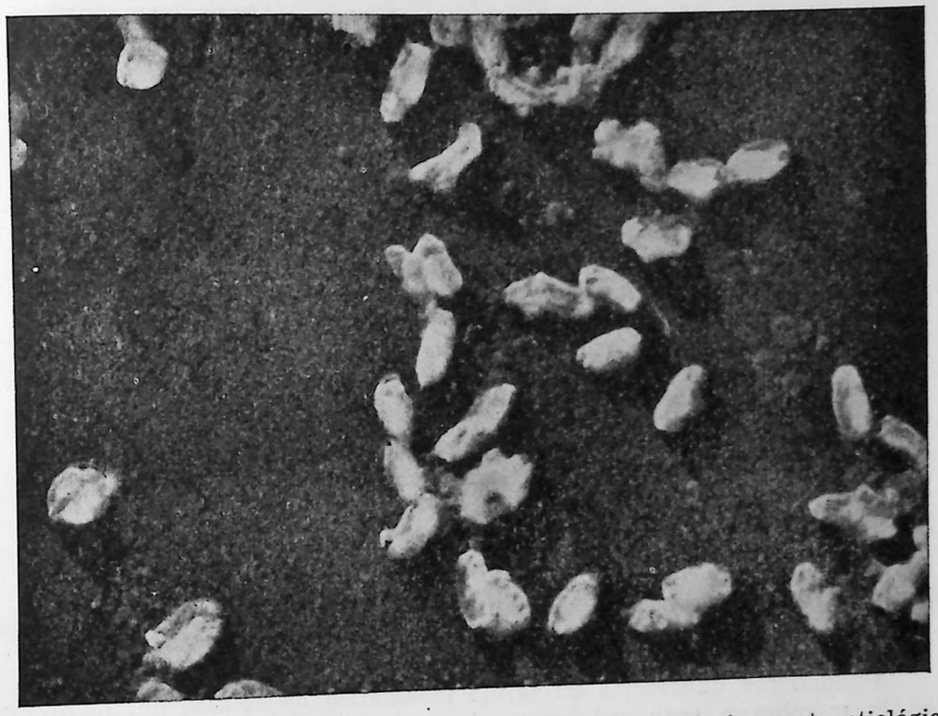


Fig. 266. — Micrografía electrónica de la *Rickettsia burneti*, agente etiológico de la fiebre Q. Aumento: 20.000 diámetros. (Según Van Rooyen y Scott.)

Período de incubación. Generalmente, dos a tres semanas.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Un ataque deja inmunizado por un período indefinido.

Frecuencia. La enfermedad está muy difundida. Se han producido brotes entre el personal de mataderos de Tejas y de Illinois; existen focos endémicos en California del Norte y del Sur, y se han dado a conocer casos de varios estados norteamericanos.

Prevención y tratamiento. Pasteurización de la leche de vaca, oveja y cabra.

Vigilancia de la importación de animales domésticos.

El empleo de vacuna se halla aún en la parte experimental.

Véase más información en Bell, Parker y Stoenner (1949), Dyer (1949), Huebner, Jellison y Beck (1949), Huebner, Jellison, Beck y Wilcox (1949), Jellison, Bell, Huebner, Parker y Welsh (1948), Jellison, Ormbee, Beck, Huebner, Parker y Bell (1948), Jellison, Welsh, Elson y Huebner (1950), Meiklejohn y Lennette (1950), Oliphant, Gordon, Meis y Parker (1949), Parker, Bell y Lackman (1948), Parker, Bell y Stoenner (1949), Shepard y Huebner (1948), Stoker (1950), Sulkin y Strauss (1948).

Fiebre fluvial japonesa (enfermedad de Tsutsugamushi). El agente etiológico es la *Rickettsia-tsutsugamushi* (fig. 267). Microorganismos pleomórficos pequeños, semejantes a bacterias, generalmente más gruesos que *R. Prowazekii, R. typhi* y *R. rickettsii*, y no tan bien definidos; elipsoidales o bacilares, a menudo en forma de diplococo o de bacilo corto con coloración bipolar. Difusamente distribuidos en el citoplasma celular. Miden 0,3 a 0,5 por 0,8 a 2 μ; son inmóviles y no toman el gram.

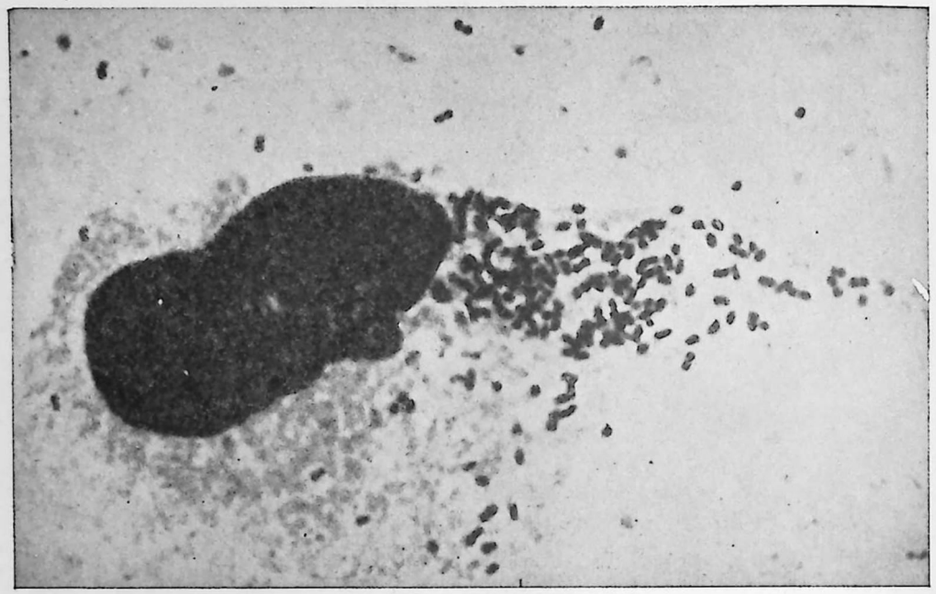


Fig. 267. — *Rickettsia tsutsugamushi* en una célula de tejido animal infectado. (Según Philip.)

Pueden ser cultivados en tejido plasmático de células de mamíferos, en la membrana coriolantoica y el saco vitelino del embrión de pollo, en testículos de conejo y en las células endoteliales del ojo de este animal.

El calor y los agentes químicos inactivan con facilidad las células, que se destruyen a una temperatura de 50° C durante diez minutos, con formol al 0,1 % y con fenol al 0,5 %.

Enfermedad producida. Es una infección específica aguda del hombre, corriente en el Japón, y que se caracteriza por un comienzo brusco, con fiebre, malestar, escalofríos y cefalalgia. Las lesiones primarias se desarrollan en el punto de la picadura del insecto, por obra de las secreciones de éste, y van asociadas a inflamación de los ganglios regionales. Aparece una erupción en el tronco, la cual puede propagarse a brazos y piernas, y suele desaparecer al cabo de unos días. Se congestionan el bazo y el hígado, y puede sobrevenir tumefacción turbia de los órganos parenquimatosos y necrosis celular. La convalecencia se inicia habitualmente a las dos o tres semanas.

Focos de infección. Larvas infectadas del ácaro *Trombicula akamushi* y especies afines. La infección se transmite de una generación de ácaros a otra, y se mantiene por parasitismo en roedores silvestres enfermos, especialmente ratones y ratas.

Modo de transmisión. Por picadura de ácaros infectados, que adquieren el mal en la fase larvaria por alimentarse a expensas de roedores infectados (fig. 268).

Período de incubación. Generalmente, siete a diez días; puede llegar hasta catorce.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Al restablecimiento sigue inmunidad adquirida, que no siempre es permanente.

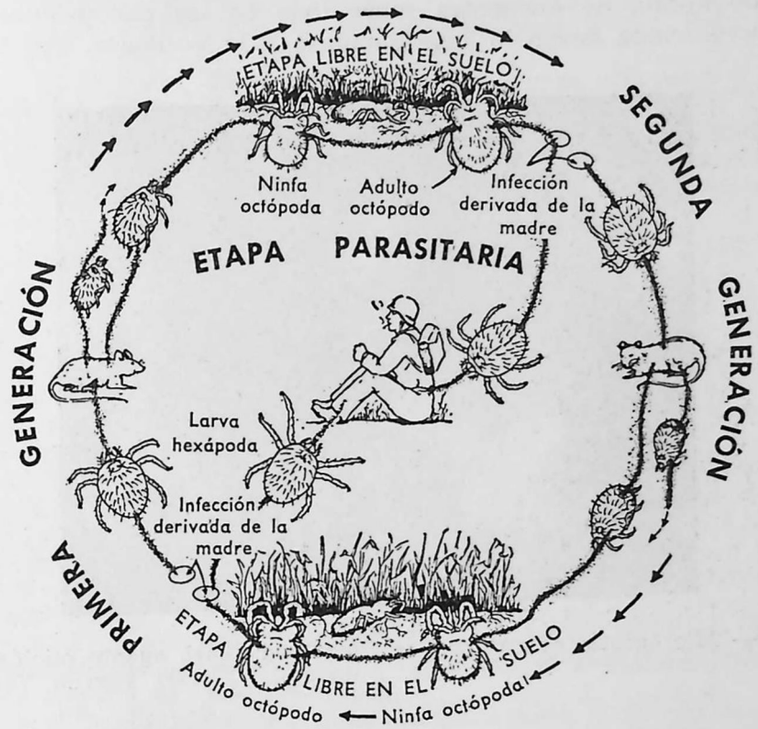


Fig. 268. — Ciclo de la *Rickettsia tsutsugamushi* en la Naturaleza, a través de dos generaciones de ácaros. (Según Philip.)

El suero del enfermo suele aglutinar *Proteus OXK*, pero no *Proteus* OX_{19} ni OX_2. La reacción de aglutinación se hace generalmente positiva hacia fines de la segunda semana, culmina durante la convalecencia, y luego desaparece con bastante rapidez.

Frecuencia. Muy difundida: Sudeste de Asia, islas del Oeste y el Sur del Pacífico, Japón, Formosa, Indias Orientales y Australia.

Prevención y tratamiento. Se recomienda llevar ropas a prueba de ácaros en comarcas infestadas de ellos. El monte bajo, en localidades donde se acampe, debe ser arrasado y quemado, igual que el terreno del propio campamento, mejor con lanzallamas. Deben utilizarse catres o camillas para que la ropa de cama no toque el suelo, y se evitará dormir sobre éste. El cuerpo ha de mantenerse limpio, restregando la piel con agua muy enjabonada, y se impregnará la ropa con líquidos y polvos acaricidas.

Es muy provechoso emplear cuanto antes un antibiótico apropiado.

Véase más información en Fox (1948), Jackson y Smadel (1951), Philip (1948, 1949), Rights y Smadel (1948), Smadel, Ley, Diercks, Traub, Tipton y Frick (1951).

Rickettsiosis pustulosa. El agente etiológico es la *Rickettsia akari*. Diplobacilos diminutos intra y extracelulares, y bacilos con coloración bipolar; morfología similar a la de rickettsias típicas. Son inmóviles y gramnegativos (fig. 269).

Puede ser cultivado el germen en el saco vitelino del embrión de pollo, pero no en medios artificiales.

Enfermedad producida. Se ha descubierto recientemente, y se caracteriza por una lesión inicial, escalofríos, fiebre, exantema y curso benigno a grave, no fatal. La lesión primaria aparece en forma de pápula firme, seguida de fiebre. Se encuentra sobre todo en las partes cubiertas del cuerpo; evoluciona desde la fase papulosa a la vesicular, con formación

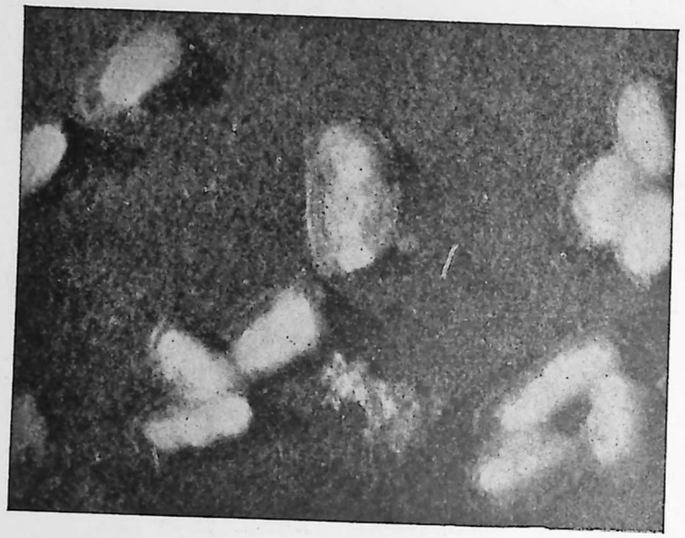


Fig. 269. — Micrografía electrónica de *Rickettsia akari*, agente etiológico de la rickettsiosis pustulosa o varioliforme. Aumento: 1:20.000. (Según Van Rooyen y Scott.)

de escara, y deja finalmente una cicatriz pigmentada. La fiebre va acompañada de cefalagia, dolores musculares y malestar general. La reacción de fijación del complemento se vuelve positiva entre la segunda y la tercera semanas, y puede utilizarse para el diagnóstico.

Focos de infección. Ratones domésticos *(Mus musculus)* infectados.

Modo de transmisión. El microorganismo pasa de un ratón a otro, y probablemente del ratón al hombre por intermedio de un ácaro de los roedores *(Allodermanyssus sanguineus)*.

Período de incubación. Se estima en diez a veinticuatro días.

Sensibilidad e inmunidad. La sensibilidad a la infección es general. Un ataque confiere inmunidad, pero se desconoce la duración de ésta.

Prevención y tratamiento. Exterminio de los roedores.

Conviene emplear un antibiótico adecuado.

Se encontrará más información en Dolgopol (1948), Greenbert, Pellitteri y Jellison (1947), Huebner, Jellison y Armstrong (1947).

Para información general pueden consultarse: American Public Health Association (1950), Breed, Murray y Hitchens (1948), Rivers (1948), Smith y Martin (1948).

REFERENCIAS

American Public Health Association: «The Control of Communicable Diseases in Man», Nueva York, 1950.

Bell, E. J., R. R. Parker, y H. G. Stoenner: Q fever, *Am. J. Pub. Health,* **39**: 478, 1949.

Bovarnick, M. R., y J. C. Snyder: Respiration of typhus rickettsiae, *J. Exp. Med.,* **89**: 561, 1949.

Breed, R. S., E. G. D. Murray, y A. P. Hitchens: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1948.

Castañeda, M. R.: Preparation and properties of purified rickettsial suspensions, *J. Immunol.,* **58**: 283, 1948.

Da Rocha-Lima, H.: Zur Aetiologie des Fleckefiebers, *Vorläufige Mitt. Berl. klin. Wochshr.,* **53**: 567, 1916.

Dolgopol, V. B.: Histologic changes in rickettsialpox, *Am. J. Path.,* **24**: 119, 1948.

Dyer, R. E.: Q fever, *Am. J. Pub. Health,* **39**: 471, 1949.

Fox, J. P.: The long persistence of *Rickettsia orientalis* in the blood and tissues of infected animals, *J. Immunol.,* **59**: 109, 1948.

Greenberg, M., O. J. Pellitteri, y W. L. Jellison: Rickettsialpox — a newly recognized rickettsial disease, *Am. J. Pub. Health,* **37**: 860, 1947.

Harrell, G. T.: Rocky Mountain spotted fever, *Medicine,* **28**: 333, 1949.

Huebner, R. J., W. L. Jellison, y C. Armstrong: Rickettsialpox — a newly recognized rickettsial disease. V. Recovery of *Rickettsia akari* from a house mouse *(Mus musculus), Pub. Health Reports,* **62**: 777, 1947.

—, —, y M. D. Beck: Q fever — a review of current knowledge, *Ann. Int. Med.,* **30**: 495, 1949.

—, —, y F. P. Wilcox: Q fever studies in Southern California. III. Effects of pasteurization on survival of *C. burneti* in naturally infected milk, *Pub. Health Reports,* **64**: 499, 1949.

Jackson, E. B., and J. E. Smadel: Immunization against scrub typhus. II. Preparation of lyophilized living vaccine, *Am. J. Hyg.,* **53**: 326, 1951.

Jellison, W. L., E. J. Bell, R. J. Huebner, R. R. Parker, y H. H. Welsh: Q fever studies in Southern California. IV. Occurrence of *Coxiella burneti* in the spinose ear tick. *Otobius megnini, Pub. Health Reports,* **63**: 1483, 1948.

—, R. Ormsbee, M. D. Beck, R. J. Huebner, R. R. Parker, y E. J. Bell: Q fever studies in Southern California. V. Natural infection in a dairy cow, *ibíd.,* **63**: 1611, 1948.

—, H. H. Welsh, B. E. Elson, y R. J. Huebner: Q fever studies in Southern California. XI. Recovery of *Coxiella burneti* from milk of sheep, *ibíd.,* **65**: 395, 1950.

Lackman, D., y R. R. Parker: Comparison of the immunogenic and anaphylactogenic properties of Rocky Mountain spotted fever vaccines prepared from infected yolk sacs and from infected tick tissue, *Am. J. Pub. Health,* **38**: 1402, 1948.

Meiklejohn, G., y E. H. Lennette: Q fever in California. I. Observations on vaccination of human beings, *Am. J. Hyg.,* **52**: 54, 1950.

Oliphant, J. W., D. A. Gordon, A. Meis, y R. R. Parker: Q fever in laundry workers, presumably transmitted from contaminated clothing, *Am. J. Hyg.,* **49**: 76, 1949.

Parker, R. R., E. J. Bell, y D. B. Lackman: Experimental studies of Q fever in cattle. I. Observations on four heifers and two milk cows, *Am. J. Hyg.,* **48**: 191, 1948.

—, —, y H. G. Stoenner: Q fever—a brief survey of the problem, *J. Am. Vet. Med. Assoc.,* **114**: 55, 124, 1949.

Philip, C. B.: Tsutsugamushi disease (scrub typhus) in World War II, *J. Parasit.,* **34**: 169, 1948.

—: Scrub typhus, or tsutsugamushi disease, *Sci. Monthly,* **669**: 281, 1949.

Rights, F. L., y J. E. Smadel: Studies on scrub typhus (tsutsugamushi disease). III. Heterogenicity of strains of *R. Tsutsugamushi* as demostrated by cross-vaccination studies, *J. Exp. Med.*, **87**: 339, 1948.
Ris, H., y J. P. Fox: The cytology of rickettsiae, *J. Exp. Med.*, **89**: 681, 1949.
Rivers, T. M.: «Viral and Rickettsial Infections of Man», Filadelfia, J. B. Lippincott Company, 1948.
Shepard, C. C., y R. J. Huebner: Q fever in Los Angeles County, *Am. J. Pub. Health*, **38**: 781, 1948.
Smadel, J. E., H. L. Ley, Jr., F. H. H. Dercks, R. Traub, V. J. Tipton, y L. P. Frick: Immunization against scrub typhus. I. Combined living vaccine and chemoprophylaxis in volunteers, *Am. J. Hyg.*, **53**: 317, 1951.
Smith, D. T., y D. S. Martin: «Zinsser's Textbook of Bacteriology», Nueva York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1948.
Stoker, M. G. P.: Q fever in Great Britain, *Lancet*, **259**: 616, 1950.
Sulkin, S. E., y E. Strauss: Studies on Q fever: Persistence of complement-fixing antibodies after naturally acquired infection, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**: 142, 1948.
Topping, N. H., I. A. Bengtson, R. G. Henderson, C. C. Shepard, y M. J. Shear: Studies of typhus fever, National Institute of Health, U.S. Public Health Service, *Bull.* 183, 1945.
Van Rooyen, C. E., y G. D. Scott: Electron microscopy of typhus rickettisiae, *Can. J. Research*, E, **27**: 250, 1949.

ÍNDICE ALFABÉTICO

A

Acetobacter, 436.
Achromatium, 481.
Achromobacter, 466.
Ácido adenílico, 366.
— cítrico, 150.
— *d*-glucónico, 151.
— fumárico, 152.
— láctico (Esquema de la producción), 435.
— tricarboxílico, 388.
Ácidos producidos por mohos, 153.
— nucleicos, 690.
Acromatiáceas, 481.
Acromobacteriáceas, 466.
Actinobacillus, 469.
Actinomicetáceas, 477.
Actinomicetales, 477.
Actinomyces, 478, 723.
Aerobacter, 467.
Agar (Digestión), 546.
Agente bacteriostático, 230.
Aglutininas, 714.
Agua (Análisis bacteriológico cuantitativo), 557.
— (Bacteriología del), 555.
Aguas embalsadas, 555.
— meteóricas, 555.
— subterráneas, 556.
— superficiales, 555.
Aire (Composición), 516.
Alcaligenes, 466.
Alcohol (Oxidación aeróbica), 437.
— (Oxidación anaeróbica), 438.
Alergia, 722.
Algas, 4, 132.
Alimentos (Bacteriología), 619.
— (Conservación), 621.
Almidón (Hidrólisis), 343.
Amoebobacter, 474.
Amoníaco (Producción), 658.
— (Producción en cultivos bacterianos), 414.
Anaerobiosis, 369.
Anafilaxia, 722.
Angiococcus, 483.
Angiospermas, 7.
Angström, 187.
Antibiosis, 503, 508.
Antibióticos producidos por mohos, 156.
Anticuerpos, 712.
Antígenos, 707.
Antihistaminas, 723.
Antiséptico, 229.
Antitoxinas, 713.
Arcangiáceas, 482.
Archangium, 482.
Ascas, 106.
Ascomicetos, 5, 134, 136, 139.
Ascosporas, 106.
Aspergillus (Morfología), 146.
Atiorrodáceas, 475.
Autociaminas, 391.
Azotobacter, 461.
Azotobacteriáceas, 461.
Azufre, 10.
— (Ciclo en el mar), 548.

B

Baciláceas, 470.
Bacillus, 470, 730.
Bacterias, 3, 7, 730.
— (Acción sobre las proteínas), 401.
— (Acción sobre los aminoácidos), 402.
— (Asimilación y respiración), 387.

Bacterias (Asociaciones), 503.
— (Ciclos vitales), 499.
— (Cocientes respiratorios), 386.
— (Conservación), 194.
— (Cultivos de repuesto), 195.
— (Destrucción), 176.
— (Efecto del calor), 178.
— (Efectos de la temperatura baja), 177.
— (Fotorreactivación), 188.
— (Funciones), 10.
— (Identificación), 411.
— (Individualidad), 488.
— (Influencia de la presión hidrostática), 194.
— (Morfología), 66.
— (Multiplicación), 176.
— (Nomenclatura), 454.
— (Número en el aire), 517.
— (Nutrición), 264.
— (Protección contra la reacción), 189.
— (Respiración), 351.
— (Tamaño), 68.
— (Variaciones), 488.
— autotróficas, 676.
— de la leche, 9.
— de los alimentos, 8.
— de plantas, 792.
— del agua, 8.
— del aire, 8.
— del cuerpo, 9.
— del suelo, 8.
— eubacteriales, 66.
— fotógenas, 550.
— fotosintéticas, 684.
— gramnegativas, 58.
— grampositivas, 58.
— lácticas, 434.
— marinas, 193, 194, 539.
— nitrificantes, 677.
— proteolíticas, 548.
— psicrófilas, 599.
— sulfurosas, 549, 679.
— termodúricas de la leche, 603.
Bacteriáceas, 470.
Bactericida, 229.
Bacterioclorofila, 186.
Bacteriófagos, 781.
Bacteriología de los moluscos, 549.
— de los peces marinos, 549.
Bacteroideas, 469.
Bacteroides, 469.
Bacterium, 470.
Bartoneláceas, 485.
Basidiomicetos, 5, 134, 139.
Beggiatoa, 480.
Begiatoáceas, 480.
Bioluminiscencia, 362, 540.
Bios, 275.
Borrelia, 484, 734.
Borrelomitáceas, 485.
Briófitas, 6.
Bruceleas, 469.
Brucella, 738.
Bujías de Chamberland, 217.
Butyribacterium, 465.

C

Candida (Morfología), 145.
Cáñamo (Enriamiento), 440.
Cápsulas de las bacterias, 72.
— de las levaduras, 101.
Caráceas, 5.
Carbohidratos y otras substancias, 419.
Carotenoides, 391.
Caseína (Hidrólisis), 346.
Catalasa, 358.
Caulobacter, 471.
Caulobacteriáceas, 471.
Caulobacteríneas, 470.
Cardiolipina, 720.
Carne (Bacteriología), 628.
Caroteno, 583.
Catabolitos bacterianos, 701.
Cellfalcicula, 461.
Cellvibrio, 461.
Célula bacteriana, 71.
Celulosa, 440.
— (Descomposición), 546.
— (Digestión), 660.
— de levadura, 101.
Cephalothecium (Morfología), 144.
Chlorobacterium, 476.
Chlorobium, 476.
Chlorochromatium, 476.
Chondrococcus, 483.
Chondromyces, 483.
Chromatium, 475.
Chromobacterium, 461.
Cianofíceas, 4.
Ciclo del nitrógeno, 649.
Cigospora, 107.

Citocromo y oxidasa de citocromo, 356.
Citofagáceas, 482.
Cladiosporium (Morfología), 147.
Clamidobacteriáceas, 479.
Clamidobacteriales, 479.
Clamidosporas, 114.
Clamidozoáceas, 485.
Clathrochloris, 476.
Clonothrix, 479.
Clorobacteriáceas, 475.
Clorofíceas, 4.
Clostridium, 470.
— perfringens, 597.
Cocarboxilasa, 366.
Codeshidrogenasas, 363.
Coenzima de la oxidasa de *d*-aminoácidos, 366.
Coenzimas, 363.
Coloración acidorresistente, 58.
— de bacterias, 63.
— de Feulgen, 62.
— de Gram, 51, 52.
Colorantes ácidos, 39.
— acinas, 43.
— alquitrán, 36.
— aminoacinas, 44.
— anilina, 36.
— antraquinona, 42.
— azoicos, 42.
— azul de metileno, 52.
— básicos, 39.
— biológicos, 36.
— carmín, 48.
— cochinilla, 48.
— diferenciales, 52.
— fenilmetano, 44.
— fenolftaleína, 46.
— flourano, 46.
— fucsina fenicada, 51.
— hematoxilina, 48.
— indaminas, 43.
— índigo, 47.
— indofenoles, 43.
— indulinas, 44.
— naturales, 47.
— nitro, 42.
— orceína, 48.
— oxiacinas, 43.
— pironina, 45.
— quinoninina, 43.
— rodamina, 45.
— safraninas, 44.
Colorantes simples, 51.
— sulfonftaleína, 46.
— tiacinas, 43.
— tornasol, 48.
— violeta cristal, 52.
— xanteno, 45.
Comensalismo, 504.
Compuestos nitrogenados (fermentación), 420.
Concentración de hidrogeniones, 201.
Conidio, 135.
Conjugadas, 5.
Conodióforo, 135.
Contaminación, 698.
Copulación isogámica de las levaduras, 107.
— heterogámica, 108.
Corinebacteriáceas, 465.
Corynebacterium, 465.
Crenothrix, 480.
Crenotricáceas, 480.
Cristispira, 484.
Cromóforos, 38, 40.
Cromogénesis, 389.
Cuerpos diversos producidos por mohos, 156.
Cultivos bacterianos (Fases de desarrollo), 292.
— en agar inclinado, 160.
— en agar por picadura, 160.
— en caldo, 147.
— en estrías, 159.
— en placa, 159.
— en placa estriada, 161.
— inclinados, 159.
— líquidos, 159.
— mixtos, 159.
— por difusión, 161.
— por picadura, 156.
— por picadura y en estrías, 168.
— puros (Técnica), 159.
Cumis, 614.
Curds, 614.
Cylindrogloea, 476.
Cytophaga, 482.

D

Dengue, 805.
Descomposición anaeróbica, 420.
Deshidrogenasa, 354.
Desinfección, 230.

Desinfectante, 230.
Diaforasa, 366.
Dialister, 469.
Diatomáceas V. Diatomeas.
Diatomeas, 4.
Dicotiledóneas, 7.
Dina, 202.
Dióxido de carbono (Reducción), 381.
Diplococcus, 463, 747.
Disipación, 401.
Disulfovibrio, 433.
Dopaoxidasa, 362.

E

Encefalitis letárgica, 805.
Encefalitis transmitida por artrópodos, 806.
Endotoxinas, 712.
Enfermedad (Período de incubación), 698.
Enfermedades transmitidas por el agua, 559.
Ensilajes (Fermentación), 442.
Enterobacteriáceas, 466.
Enzimas (Actividades sintéticas), 338.
— (Especificidad), 338.
— (Reacciones), 335.
— de adaptación, 341.
— de bacterias, 306.
— de constitución, 341.
— extracelulares, 343.
— intracelulares, 347.
— oxidantes y reductoras, 348.
— proteolíticas, 399.
Equisetíneas, 6.
Ervineas, 467.
Erwinia, 467.
Erysipelothris, 466.
Escarlatina, 775.
Escherichia, 467, 749.
— coli, 9, 276.
Espermatófitas, 7.
Espirileas, 460.
Espiroquetáceas, 483.
Espiroquetales, 483.
Esporas, 90, 134.
— Asexuadas (Formación), 105, 135, 136.
— de las bacterias, 90.
— levaduras, 106.
Esporas sexuadas, 135.
— — (Formación), 136.
Esporulación provocada de las levaduras, 128.
Esqueriqueas, 466.
Esquizomicetos, 5, 66, 133.
Esterilización, 212, 230.
Estreptocóceas, 463.
Estreptomicetáceas, 478.
Eubacteríneas, 458.
Eubacteriales, 458.
Eumicetos, 133.
Exotoxinas, 701, 710.

F

Factor Rh, 726.
Feofíceas, 4.
Fermentación, 419.
— acética o del vinagre, 409.
— acetónica, 429.
— alcohólica, 150, 421.
— — (Subproductos), 426.
— butílica, 429.
— butírica, 428.
— etílica, 431.
— láctica, 415, 434.
— propiónica, 432.
Fermentos, 100.
Ficomicetos, 5, 134, 136, 138.
Fiebre amarilla, 806.
— de Queensland, 826.
— fluvial japonesa, 828.
— purpúrea americana. 825.
Filicíneas, 7.
Filtros (Limpieza), 227.
— (Carga eléctrica), 223.
— de amianto, 220.
— de Berkefeld, 218.
— de Mandler, 218.
— de porcelana, 217.
— de vidrio poroso, 220.
— de yeso, 219.
Flagelados, 4.
Flagelos de las bacterias, 80.
Flavobacterium, 466.
Fósforo, 10.
Fusobacterium, 469.

G

Gaffkya, 462, 750.
Galioneláceas, 471.

Gallionella, 471.
Gameto, 107.
Gelatina (Licuación), 346, 414.
Gen (Tamaño), 177.
Germen, 3.
Germicida, 229.
Germicidas (Evaluación), 253.
Gimnospermas, 7.
Giodu, 614.
Glóbulos de grasa de las bacterias, 79.
— — de las levaduras, 103.
Glucógeno, 103.
Glutatión, 367.
Gramidicina, 509.
Gránulos metacromáticos de las bacterias, 77.
— — de las levaduras, 103.
Gripe endémica, 807.
Grupos sanguíneos, 724.

H

Helados (Contenido bacteriano), 609.
Hemicelulosas, 440.
Hemofelias, 469.
Hemophilus, 469, 750.
Hepáticas, 6.
Hibridación de levaduras, 124.
Hidrofobia o rabia, 809.
Hidrogeniones (Medida de la concentración), 296.
Hidrogenomonadeas, 459.
Hierro (Sedimentación), 544.
Hifas (Estructura), 132.
Hipersensibilidad, 722.
Histaminas, 723.
Hongos, 5, 100.
— imperfectos, 5, 133, 136, 139.
Huevos (Bacteriología), 635.
— (Conservación), 633.
Hydrogenomonas, 459.

I

Indicadores de hidrogeniones (Tabla), 299.
Indol, 411.
Infección, 698.
— (Resistencia), 702.
— (Vías de), 700.
— por la leche, 599.
Inmunidad a las infecciones, 702.
— natural, 702.
— pasiva, 706.
Isoetíneas, 7.

K

Kefir, 614.
Klebsiella, 467, 753.

L

Lacasa, 361.
Lactobacileas, 464.
Lactobacillus, 464.
— acidophilus, 9.
Lactobacteriáceas, 463.
Lamprocystis, 473.
Leben, 614.
Leche, 583.
— (Acidificación natural), 584.
— (Análisis cuantitativo), 585.
— (Bacterias termodúricas), 603.
— (Bacterias termófilas), 604.
— (Clasificación), 591.
— (Componentes principales), 415, 583.
— (Fermentación), 415, 434.
— (Infección), 599.
— (Influencia de la temperatura en su conservación), 593.
— (Microorganismos), 595.
— (Pasteurización), 602.
— (Peptonización y fermentación), 415.
— (Propiedad germicida), 594.
— ácida, 615.
— colorada, 598.
— congelada, 594.
— cuajada, 614.
— fermentada, 591.
— fría, 594.
Leptospira, 484.
Leptothrix, 480.
Leuconostoc, 464.
Levaduras, 100, 730.
— (Citología), 101.
— (Multiplicación), 104.
— (Reproducción sexual), 107.
— (Partenogénesis), 112.
— ascoporógenas, 114.
— asporógenas, 120.
— haploides y diploides, 110.
Licopodíneas, 6.

Lino (enriamiento), 440.
Lisinas, 716.
Listeria, 465.
Líquenes, 6.
Luz fría, 362.

M

Macromonas, 481.
Malleomyces, 468.
Manganeso (Sedimentación), 546.
Mantequilla, 605.
Mazun, 614.
Medios de cultivo (Componentes), 264.
— — (Tipos), 270.
Melaninas, 392.
Melittangium, 482.
Membranas celulares, 71.
— — de las levaduras, 101.
Metano (Formación), 381.
Methanobacterium, 381.
Methanococcus, 381.
Methanomonas, 460.
Micobacteriáceas, 477.
Microbacterium, 464.
Microbio, 3.
Microbios (Altitudes que alcanzan), 518.
Micrococáceas, 462.
Micrococcus, 462, 755.
Micromonospora, 479.
Microscopio, 12.
— (Objetivos), 16.
— (Oculares), 23.
— de fase, 29.
— electrónico, 31.
Mixobacteriales. 481.
Mixococáceas, 483.
Mixomicetos, 5.
Mohos, 100, 132, 731.
— (Bioquímica), 149.
— (Clasificación), 138.
— (Efectos nocivos en las lentes), 34.
— (Reproducción), 134.
— (Resistencia de las esporas), 137.
— (Técnica de laboratorio), 148.
— (Tipos de reproducción), 135.
Monodicotiledóneas, 7.
Moraxella, 469, 756.
Mordiente, 51.
Movilidad bacteriana, 79.
Mucor (Morfología), 143.
Musgos, 6.
Mycobacterium, 477, 757.
Mycoplana, 460.
Myxococcus, 483.

N

Neiseriáceas, 462.
Neisseria, 463, 761.
Nevskia, 471.
Nevskiáceas, 470.
Nitratos (Reducción), 377, 547.
Nitrificación, 547.
Nitrobacter, 459.
Nitrobacteriáceas, 458.
Nitrobacterieas, 458.
Nitrocystis, 459.
Nitrógeno (Ciclo en el mar), 547.
— (Fijación), 548.
— (Fijación simbiótica), 664.
Nitrosococcus, 459.
Nitrosomonas, 458.
Nitrosoglea, 459.
Nitrosospira, 459.
Nocardia, 477.
Núcleo de las bacterias, 74.
— de las levaduras, 102.
— de los fermentos, 102.
Nucleoproteínas, 689.

O

Opsoninas, 719.
Oxidasa del ácido ascórbico, 360.
Oxidasas, 355.

P

Parotiditis infecciosa o epidémica, 810.
Paracolibacilos, 579.
Parásitos, 699.
Parvobacteriáceas, 468.
Pasteureleas, 468.
Pasteurella, 468, 794.
Patogenicidad, 699.
Pectinas, 440.
Pelodicthyon, 476.
Penicilina, 508.
Penicillum (Morfología), 147.
Peroxidasa, 358, 360.

Pescado (Bacteriología), 631.
Petróleo (Origen), 545.
Pigmentos bacterianos, 390.
— producidos por mohos, 154.
Plasmólisis, 191.
Plasmoptisis, 191.
Podangium, 483.
Poliangiáceas, 482.
Poliomielitis, 812.
Polisacáridos producidos por mohos, 155.
Polyangium, 482.
Potenciales de oxidación-reducción, 368.
Precipitinas, 714.
Presión osmótica, 191.
Protaminobacter, 460.
Proteas, 467.
Proteína (Estructura de la molécula), 398.
Proteínas, 397.
— (Hidrólisis), 399.
— (Producción de sulfuro de hidrógeno), 413.
— (Putrefacción), 400.
— (Reserva o ahorro), 410.
Proteus, 467.
Protistas, 3.
Protozoos, 730.
Pseudomonas, 459.
Psilotíneas, 6.
Psitacosis, 813.
Pteridófitas, 6.
Punto isoeléctrico, 54.

Q

Quesos, 153.
Quitina, 101.
— (Descomposición), 546.

R

Rayos ultravioleta (Aplicaciones industriales), 189.
Reacción de Wassermann, 720.
Reducción del azul de metileno, 353.
Resfriado común, 814.
Rhabdomonas, 474.
Rhizobium, 461.
Rhizopus (Morfología), 144.
Rhodopseudomonas, 475.
Rhodospirillum, 475.
Rhodothece, 474.
Rickettsiáceas, 485.
Rickettsiales, 484.
Rickettsiosis pustulosa, 829.
Rizobiáceas, 461.
Rodobacteríneas, 471.
Rodofíceas, 4.
Rubéola, 814.

S

Salmoneleas, 468.
Salmonella, 468, 766.
Saprófitos, 699.
Saprospira, 484.
Sarampión, 815.
Sarcina, 381, 462.
Serología de la sífilis, 720.
Serrateas, 467.
Serratia, 467.
Seudomonadeaus, 459.
Seudomonadáceas, 459.
Shigella, 468, 771.
Siderobacterias, 685.
Siderocapsa, 471.
Siderocapsáceas, 471.
Simbiosis, 503.
Sinergia, 506.
Soluciones colorantes, 51.
Sorangiáceas, 482.
Sorangium, 482.
Sphaerotilus, 479.
Spirillum, 461.
Spirochaeta, 483.
Sporocytophaga, 483.
Stelangium, 482.
Streptococcus, 463, 773.
Streptococcus lactis, 8, 584.
Streptomyces, 479.
Substancias antibióticas, 143.
Suelo (Bacteriología), 644.
Suelo (Coloides), 650.
Sulfatos (Reducción), 379, 458.
Synangium, 482.

T

Tabaco (Fermentación), 442.
Talófitas, 4, 132.
Taxonomía (Principios generales), 455.

Tensión superficial, 202.
Thiobacillus, 459.
Thiocapsa, 472.
Thiocystis, 473.
Thiodyctiyon, 472.
Thioploca, 480.
Thiopolycoccus, 474.
Thiopedia, 472.
Thiosarcina, 472.
Thiospira, 461.
Thiospirillum, 474.
Thiospirollopsis. 480.
Thiothece, 473.
Thiothrix, 480.
Thiovulum, 481.
Tifus exantemático, 822.
Tinción (Teorías), 49.
Tiobacileas, 459.
Tiorrodáceas, 471.
Tirosinasa, 361.
Tomaínas, 409, 636.
Treponema, 484, 775.
Treponemataceas, 484.
Triptófano (Descomposición), 411.

U

Ultrafiltros, 222.

V

Vacunas, 705.
— autógenas, 705.
— polivalentes, 705.
Vacuolas de las bacterias, 77.
— de las levaduras, 102.
Varicela, 815.
Veillonella, 463.
Vibrio, 460, 777.
Vinagre (Métodos de fabricación), 439.
Virales, 485.
Viricida, 230.
Viruela, 816.
Virulencia, 700.
Virus de las plantas, 795.

X

Xanthomonas, 460.

Y

Yogurt, 614.

Z

Zooglea, 436.

ÍNDICE GENERAL

Capítulos — Páginas

PRÓLOGO 1

I. **Introducción** 3
Clasificación de las plantas 4
Distribución de las bacterias. 7
Funciones de las bacterias 10

II. **El microscopio** 12
Principios generales de óptica 12
Objetivos. 16
Oculares 23
Condensadores. 25
Microscopio de fase 29
Microscopio electrónico 31
Efectos nocivos del desarrollo de mohos en las lentes. . . 34

III. **Colorantes biológicos** 36
Colorantes 38
Leucoderivados 41
Clasificación de los tintes biológicos 42
Teorías de la tinción 49
Soluciones colorantes 51
Coloración de bacterias 63

IV. **Morfología de las bacterias** 66
Célula bacteriana. 71

V. **Levaduras y fermentos**. 100
Citología de las levaduras 101
Multiplicación de las levaduras 105
Clasificación de las levaduras. 114
Hibridación 124
Técnica de laboratorio. 127

VI. **Mohos** 132
Reproducción de los mohos 134
Resistencia de las esporas de mohos 137
Clasificación de los mohos 138

Capítulos		Páginas
	Morfología de los mohos comunes.	143
	Técnica de laboratorio	148
	Bioquímica de los mohos	149
VII.	**Técnica de los cultivos puros**	159
	Métodos empleados para sembrar en medios de cultivo	160
	Aislamiento de especies en cultivo puro.	161
	Identificación de especies bacterianas	163
	Errores posibles al utilizar las fichas	168
VIII.	**Efecto del ambiente sobre las bacterias**	176
	Efecto de la temperatura baja	177
	Efecto del calor	178
	Efecto de la luz ultravioleta	186
	Efecto de la presión osmótica	191
	Influencia de la presión hidrostática.	194
	Conservación de bacterias.	194
	Concentración de hidrogeniones.	201
	Efecto de la tensión superficial.	202
	Acción antagónica de los iones.	204
	Acción oligodinámica de los metales pesados	206
	Efecto del sacudimiento	208
IX.	**Esterilización**	212
	Esterilización por filtración	217
X.	**Desinfección y desinfectantes**	229
	Dinámica de la desinfección	230
	Agentes físicos	233
	Agentes químicos.	236
	Evaluación de germicidas.	253
XI.	**Nutrición de las bacterias**	264
	Componentes comunes de los medios de cultivo.	264
	Tipos de medios de cultivo	270
	Necesidades nutritivas	271
	Vitaminas y factores de crecimiento.	275
	Vitaminas que necesitan las bacterias	276
	Fases de desarrollo en un cultivo	291
	Concentración de hidrogeniones en medios de cultivo	295
XII.	**Enzimas de bacterias**	306
	Naturaleza de las enzimas	306
	Clasificación de las enzimas.	310
	Factores que influyen en las reacciones de enzimas.	335
	Especificidad de las enzimas.	338
	Actividades sintéticas de las enzimas	338
	Lisozima	339

Capítulos		Páginas
	Enzimas de constitución y de adaptación	341
	Enzimas extracelulares.	343
	Enzimas intracelulares.	347
XIII.	**Respiración de las bacterias**	351
	Actividades oxidantes y reductoras de los microorganismos	352
	Coenzymas	363
	Glutatión.	367
	Potenciales de oxidación-reducción	368
	Anaerobiosis	369
	Reducción de nitratos	376
	Reducción de sulfatos	379
	Reducción de dióxido de carbono y formación de metano.	381
	Necesidad de dióxido de carbono para las bacterias.	382
	Necesidad de oxígeno de las bacterias.	385
	Cocientes respiratorios de las bacterias	386
	Asimilación y respiración.	387
	Ciclo del ácido tricarboxílico.	388
	Cromogénesis	389
XIV.	**Hidrólisis y putrefacción de las proteínas**	397
	Enzimas proteolíticas	399
	Acción de las bacterias sobre las proteínas	401
	Acción de las bacterias sobre los aminoácidos	402
	Reserva o ahorro de proteínas	410
	Algunas reacciones fisiológicas corrientes para identificar bacterias.	411
XV.	**Fermentación de carbohidratos y otras substancias**	419
	Fermentación alcohólica	421
	Fermentación butírica	428
	Fermentación butílica y acetónica	429
	Fermentación acetónica y etílica	431
	Fermentación propiónica	432
	Fermentación láctica	434
	Fermentación acética o del vinagre	436
	Enriamiento de lino y cáñamo.	440
	Fermentación de ensilajes	442
	Fermentación del tabaco	443
	Fermentación por bacterias coliformes	445
	Fermentaciones generales de carbohidratos	446
	Algunas reacciones corrientes de fermentación para identificar bacterias	448
XVI.	**Diferenciación y clasificación de bacterias**	454
XVII.	**Variaciones de las bacterias**	488
XVIII.	**Asociaciones de bacterias**	503

Capítulos		Páginas
XIX.	**Bacteriología del aire**	516
	Número de bacterias en el aire	517
	Altitudes que alcanzan los microbios	518
	Recuento de bacterias del aire	518
	Importancia del estado de suspensión	525
	Gérmenes patógenos del aire y medios de combatirlos	526
XX.	**Bacteriología del mar**	539
	Características de las bacterias marinas	539
	Intercambio de bacterias entre tierra y mar	541
	Abundancia de bacterias en el mar	542
	Las bacterias como agentes geológicos	544
	Acción de las bacterias marinas sobre substancias orgánicas	545
	Ciclo del nitrógeno en el mar	547
	Regeneración de fosfatos	548
	Ciclo del azufre en el mar	548
	Bacteriología de los peces marinos	549
	Efecto de las bacterias en animales marinos	550
	Las bacterias en mares interiores	551
XXI.	**Bacteriología del agua**	555
	Análisis bacteriológico cuantitativo del agua	557
	Enfermedades transmitidas por el agua	559
	Ensayo preliminar	561
	Ensayo de confirmación	563
	Prueba final	567
	Diferenciación entre gérmenes fecales y no fecales del grupo coliforme	568
	Cómputo de las cifras más probables de microorganismos coliformes	574
	Técnica del filtro molecular	574
	Relaciones entre los gérmenes coliformes	576
XXII.	**Bacteriología de la leche y los productos lácteos**	583
	Leche	583
	Acidificación natural de la leche	584
	Análisis cuantitativo de la leche	585
	Clasificación de la leche	591
	Influencia de la temperatura en la conservación de la calidad de la leche	593
	Microorganismos coliformes de la leche	595
	Leche filamentosa y mucilaginosa	596
	El «Clostridium perfringens» en la leche	597
	Leche colorada	598
	Infección por la leche	599
	Pausterización de la leche	602

Capítulos		Páginas
	Mantequilla	605
	Helados	609
	Queso	610
	Leche fermentada	614
XXIII.	**Bacteriología de los alimentos**	619
	Métodos empleados para conservar alimentos	621
	Bacteriología de la carne	628
	Bacteriología del pescado	631
	Bacteriología de la leche condensada azucarada	632
	Bacteriología de los huevos	633
	Intoxicación alimenticia	636
XXIV.	**Bacteriología del suelo**	644
	Microorganismos del suelo	644
	Funciones de los gérmenes del suelo	647
	Análisis cuantitativo de la tierra	650
	Análisis cualitativo de la tierra	655
	Producción de amoníaco	658
	Digestión de la celulosa	660
	Fijación simbiótica del nitrógeno	664
	Fijación asimbiótica del nitrógeno	672
	Bacterias autotróficas	676
	Bacterias nitrificantes	677
	Bacterias sulfurosas	679
	Siderobacterias	685
	Ciclo del fósforo	688
XXV.	**Infección e inmunidad**	698
	Inmunidad natural	702
	Inmunidad adquirida	703
	Antígenos	706
	Anticuerpos y su reacción con antígenos	712
	Serología de la sífilis	720
	Hipersensibilidad	722
	Grupos sanguíneos	724
	Factor Rh	726
XXVI.	**Enfermedades bacterianas del hombre**	730
	Bacterias patógenas para el hombre y los animales	731
	Actinomyces	732
	Bacillus	732
	Borrelia	734
	Brucella	738
	Clostridium	741
	Corynebacterium	744
	Diplococcus	747
	Escherichia	749

Capítulos		Páginas
	Gaffkya	750
	Hemophilus	750
	Klebsiella	753
	Leptospira	754
	Micrococcus	755
	Moraxella	756
	Mycobacterium	757
	Neisseria	761
	Pasteurella	764
	Salmonella	766
	Shigella	771
	Streptococcus	773
	Treponema	775
	Vibrio	777
XXVII.	**Virus bacterianos**	781
XXVIII.	**Bacterias y enfermedades bacterianas de plantas**	791
	Bacterias de plantas	795
	Virus de plantas	795
	Agentes de propagación de los virus	798
XXIX.	**Enfermedades por virus en el hombre**	802
XXX.	**Enfermedades humanas por rickettsias**	821

BIBLIOTECA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
VALPARAISO

EDITORIAL GUSTAVO GILI, S. A.

Calle de Enrique Granados, 45. — BARCELONA, 8

Historia de la Medicina, por ROBIN FÄHRAEUS. (Versión del sueco.) Un volumen de 728 páginas, de 13 × 20 centímetros, con 196 ilustraciones y una tricromía.

Técnica química de laboratorio, por EDUARDO RODRÍGUEZ SANTOS. Un volumen de 294 págs., de 22 × 16 cm., con 238 grabados.

Química física, por A. J. MEE. Un volumen de 804 páginas, de 23 × 15 centímetros, con 216 grabados y 123 tablas.

Tratado de Química analítica aplicada. *Métodos y normas para el examen químico de los principales productos industriales y alimenticios,* por el profesor V. VILLAVECCHIA, director de los Laboratorios químicos de las Aduanas de Italia. Segunda edición. Dos volúmenes de 25 × 16 cm., con 1382 págs., 163 grabados y 120 tablas.

Recetario Industrial de Farmacia. *Colección de fórmulas y procedimientos empleados en Farmacia, Química, Droguería y profesiones afines,* por E. DIETERICH. Un volumen de 882 págs., de 25 × 16 cm., con 155 grabados.

Física moderna. *Exposición sintética, al alcance de todos, de las últimas conquistas de la Física contemporánea,* por el doctor C. CASTELFRANCHI. Un volumen de 890 págs., de 25 × 16 cm., con 102 grabados.

Atlas manual de Anatomía, por V. PAUCHET y S. DUPRET. Segunda edición. Un volumen de 454 páginas, de 19 × 12 centímetros, con 424 láminas en negro y en colores.

Compendio de Anatomía descriptiva, por el doctor J. A. FORT, Segunda edición. Un volumen de 584 páginas, de 14 × 8 cm., con 205 grabados.

Tratado de mineralogía, por F. KLOCKMANN y P. RAMDOHR. 2.ª edición, Un volumen de 706 págs., de 25 × 16 cm., con 664 grabados.

Identificación de compuestos orgánicos, por F. WILD. Un volumen de 338 páginas, de 22 × 15 cm., con 14 grabados y 43 tablas.

La técnica fotográfica, por L. P. CLERC. Dos volúmenes de 25 × 16,5 centímetros, con 1152 páginas, 288 figuras y 14 láms.

Brockhaus. *Diccionario popular de las ciencias y de la técnica.* Un volumen de 660 páginas, de 23 × 14,5 cm., con 2000 grabados y 44 láminas en negro y colores.

Proyecte su casa para vivir mejor. *Obra dedicada a todos los que aspiran a vivir en una casa de su propiedad,* por C. W. DUNHAM y M. D. THALBERG. Un volumen de 302 páginas, de 27 × 19 cm., con 150 fotografías y 278 dibujos de plantas de edificios y detalles arquitectónicos.

Tratado de calefacción y ventilación de edificios, *incluyendo el abastecimiento de agua caliente y las instalaciones de humectación del aire y de disipación de nieblas,* por H. KAEMPER, M. HOTTINGER y W. GONZENBACH. Un vol. de 376 págs., de 27 × 19 cm., con 96 grabados.

Calefacción y ventilación. *Manual para uso de los instaladores,* por O. KALLENBERG y G. A. SCHINK. 2.ª edición. Un volumen de 278 págs., de 25 × 16 cm., con 231 grabados y 46 tablas numéricas.

Ciencia recreativa. *Enigmas y problemas, observaciones y experimentos, trabajos de habilidad y paciencia,* por el Dr. J. ESTALELLA. 4.ª edición. Un volumen de 518 páginas, de 23 × 15 cm., con 882 grabados.

Abastecimiento de agua y alcantarillado, por ERNEST W. STEEL. Un volumen de 748 págs., de 23 × 16 cm., con 271 grabados.

Técnica de las instalaciones frigoríficas industriales, por L. T. ZAMARO. Un volumen de 476 págs., de 14,5 × 24 cm., con 160 figuras, 29 tablas numéricas, 23 gráficos y 63 problemas resueltos.

Tratado de Física, *para las escuelas técnicas y de enseñanza media y para el estudio en privado,* por los profesores KLEIBER y KARSTEN, ampliado por el doctor H. ALT. Un vol. de 520 págs., de 21,5 × 15,5 centímetros, con 863 figuras, una lámina en colores y numerosos ejemplos y problemas resueltos de aplicación a la industria y a la vida práctica.

Una revolución en el concepto físico del mundo. *Exposición popular de las teorías físicas modernas acerca de la materia y el Universo,* por ERNST ZIMMER. Un volumen de 290 págs., de 23 × 15 cm., con 56 grabados intercalados y 11 láminas fuera de texto.

Diccionario Ideológico de la Lengua Española, por JULIO CASARES, Secretario perpetuo de la Real Academia Española. 2.ª edición. Un volumen de 1444 páginas, de 24 × 17 cm.

El arte popular en Europa, por H. TH. BOSSERT. Dos volúmenes, con 196 páginas, de 24 × 32,5 cm., y 88 láminas, la mayor parte en colores.

Radiotecnia. *Teoría y práctica,* por el doctor J. DÜRRWANG. Un volumen de 208 páginas, de 23 × 15,5 cm., con 168 grabados.

Reparación de motores eléctricos, por R. ROSENBERG. Dos volúmenes de 23 × 15 cm. Tomo I : Texto, 389 págs. Tomo II : Láminas, 247 págs., con 804 figuras.

Dibujo de máquinas, por W. POHL, ingeniero. Segunda edición. Un volumen de 246 páginas, de 23 × 15 centímetros, con 345 grabados.

Práctica del automóvil, por ROGER GUERBER. Un volumen de 332 páginas, de 20 × 13 cm., con 223 grabados.

Los catálogos y prospectos de la Editorial Gustavo Gili, S. A., se remiten gratis a quien los solicite