

Tesis de Posgrado

Poder antibiótico de cepas de streptomyces : Aisladas de muestras de tierra de la República Argentina

Adler, Edda

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Adler, Edda. (1963). Poder antibiótico de cepas de streptomyces : Aisladas de muestras de tierra de la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1195_Adler.pdf

Cita tipo Chicago:

Adler, Edda. "Poder antibiótico de cepas de streptomyces : Aisladas de muestras de tierra de la República Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1195_Adler.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PODER ANTIBIOTICO DE CEPAS DE STREPTOMYCES

Aisladas de muestras de tierra de la
República Argentina

EDDA ADLER

RESUMEN DE LA TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL
TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA

AÑO 1963

Esta tesis ha sido efectuada en forma conjunta por las
Licenciadas Diana Isabel Fernández y Edda Adler, bajo
la dirección del Profesor Dr. Pablo Negroni.

La resistencia que ofrecen los microorganismos, pe^ogenes frente a los antibióticos hasta ahora conocidos, hace necesaria la búsqueda constante de nuevos agentes bactericidas. El estudio del género Streptomyces y la clasificación de las cepas que ofrezcan interés desde el punto de vista de la inhibición del crecimiento in vitro de dichos microorganismos, sigue siendo tema de pacientes investigaciones en el campo de la Microbiología. Ello constituye el motivo de esta tesis que resumimos a continuación.

Se hizo un compendio bibliográfico presentando los métodos de estudio, aislamiento, conservación y clasificación del género Streptomyces, y de las propiedades antibióticas de los mismos.

Se estudiaron cepas del género Streptomyces, analizando sus propiedades macromorfológicas, micromorfológicas y culturales, incluyendo ensayos de utilización de fuentes de nitrógeno en función del peso de micelio aéreo producido.

Con el fin de conocer la influencia de la composición de la tierra y de las distintas plantaciones sobre el crecimiento preferencial de Streptomyces, se tomaron veinticinco muestras de tierra del Jardín Botánico de Buenos Aires, aislando de esa manera ochenta y una cepas del género en estudio.

Las cepas aisladas fueron conservadas mediante desecación por vacío en suelo estéril, encontrando luego de seis meses una supervivencia que alcanzaba solamente al 17.3 %. Fueron emprendidos nuevos ensayos de aislamiento con muestras de tierra de Córdoba, Buenos Aires y Chaco, aislando treinta cepas más de Streptomyces, que sumadas a las sobrevivientes del primer aislamiento nos permitió totalizar 44 cepas. Se observó un decrecimiento de norte a sur en el porcentaje de Streptomyces aislados. Se ensayaron distintos substratos, así como el agregado de agentes bactericidas y funguicidas con el fin de facilitar el aislamiento del microorganismo en estudio.

Nuestros cuarenta y cuatro aislamientos y once cepas tipo pertenecientes a colecciones de cultivo oficiales, fueron analizadas desde el punto de vista de sus características micromorfológicas, macromorfológicas y culturales, con el objeto de su cla-

sificación. Las cepas tipo fueron incluidas a fin de compararlas con nuestros aislamientos.

Fueron efectuadas coloraciones de Gram, colonias gigantes sobre agar nutritivo, estudio de características taxonómicas y pigmento del micelio aéreo sobre agar-extracto de levadura y agar, pasta de tomate-avena; pigmento melanoideo sobre agar-peptona y agar tirosina y las siguientes reacciones bioquímicas: prueba de hidrógeno sulfurado, utilización de rafinosa, ramnosa, xilosa, arabinosa y manitol, reducción de nitratos, y leche.

Las observaciones de los colores del micelio aéreo y del micelio substratal, así como el pigmento soluble, se hicieron teniendo como guía un diccionario de colores. Se han incluido las fotografías de las coloraciones de Gram y de las colonias gigantes, como una ayuda adicional para la evaluación de las cepas.

Para la clasificación de las mismas fueron tenidas principalmente en cuenta las claves del Manual Bergey y los esquemas de Pridham, Hesseltine y Benedict; de Gottlieb; de Benedict, Pridham, Lindenfelser, Hall y Jackson; de Pridham y Gottlieb, y de Kurosawa, Kuroya e Ishida. Es de hacer notar que dado que el concepto de grupo es mucho más seguro que la definición de especies dentro del género Streptomyces, en algunos casos sólo se podrá asegurar el grupo más que la especie particular.

Sobre cuarenta y cuatro aislamientos se encontraron diez cepas únicas, ocho duplicadas, dos triplicadas y una cuadruplicada, correspondiendo en total a veintidós especies distintas. No se logró determinar la especie en seis de las cepas aisladas, ubicándolas solamente en Secciones y Series, de acuerdo con el esquema de Pridham, Hesseltine y Benedict.

Se efectuó un breve estudio al microscopio electrónico con el fin de conocer la estructura de los esporos en lo que atañe a la presencia de apéndices característicos en su superficie.

Para los ensayos de poder antibiótico se utilizó el método de "screening" por estría múltiple, testando cada organismo potencialmente antagónico contra microorganismos

Gram negativos, Gram positivos, ácido resistentes, esporulados, levaduras y hongos, tabulando en milímetros la zona de inhibición de cada microorganismo ensayado.

Se encontró que tres cepas de Streptomyces inhibían el desarrollo de E.coli, trece inhibían al S.aureus, dos al S.cereviciae, diez al B.subtilis, doce al Trychophyton mentagrophytes y quince al M. phlei.

Además quince cepas no presentaron poder antibiótico (nueve de las cuales correspondían al primer aislamiento y habían sido conservadas alrededor de diez y ocho meses en el laboratorio), catorce actuaban sólo contra un microorganismo, ocho contra dos, cuatro contra tres, una contra cuatro y una sola también contra cinco de los seis microorganismos de prueba.

Por comparación de los espectros antibióticos obtenidos en cepas clasificadas como especies idénticas, pudo inferirse la inutilidad del mismo como criterio auxiliar en la clasificación de Streptomyces.

Se ha incluido un apéndice con medios de cultivo seleccionados para la conservación y estudio del género Streptomyces, además de citas bibliográficas que podrán orientar a los interesados en el tema.

Creemos que nuestra contribución será de utilidad en un momento en que los Streptomyces no sólo llaman la atención como agentes bactericidas y funguicidas, sino que también ofrecen un campo de exploración como antagonistas potenciales en la lucha contra el cáncer.



FCEN-BA.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PODER ANTIBIOTICO DE CEPAS DE STREPTOMYCES

Aisladas de muestras de tierra de la

República Argentina

EDDA ADLER

TESIS: 1135

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL
TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA

AÑO 1963

Esta tesis ha sido efectuada en forma conjunta por las
Licenciadas Diana Isabel Fernández y Edda Adler, bajo
la dirección del Profesor Dr. Pablo Negroni.

Agradecimientos

Se agradece al Profesor Dr. Pablo Negroni, quien dirigió esta tesis brindando toda su experiencia, al Profesor Dr. Armando S. Parodi, quien facilitó los medios para su ejecución en los laboratorios de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires; a los Profesores Dres. Luis Verna y Anibal Sánchez Marroquin por su solícito asesoramiento y a los Profesores Dres. Humberto Ruggiero y Zenón Lugones por su constante estímulo.-

A mis padres

I N D I C E

	pág.
1- Propósito del trabajo.....	1
2- El género <u>Streptomyces</u>	2
3- Aislamiento de cepas. Conservación.....	18
4- Esquemas de clasificación.....	26
5- Antibiosis.....	57
6- <u>Conclusiones experimentales</u>	
6-I Estudio del género <u>Streptomyces</u>	65
6-II Aislamiento de cepas.....	71
6-III Conservación de las cepas aisladas.....	77
6-IV Requerimientos nutritivos.....	77
6-V Supervivencia de las cepas conservadas al vacío en suelo esteril.....	78
6-VI Nuevos ensayos de aislamiento.....	79
6-VII Clasificación de las cepas aisladas.....	82
6-VIII Somero estudio al microscopio electrónico.....	160
6-IX Investigación del poder antibiótico de las cepas aisladas.....	162
6-X Apéndice.....	166
7-Bibliografía.....	174

- - - - -

1) PROPOSITO DEL TRABAJO

La resistencia que ofrecen los microorganismos patógenos frente a los antibióticos hasta ahora conocidos, hace necesaria la búsqueda constante de nuevos agentes bactericidas.

El estudio del género Streptomyces y la clasificación de las cepas que ofrezcan interés desde el punto de vista de la inhibición del crecimiento "in vitro" de dichos microorganismos, sigue siendo tema de pacientes investigaciones en el campo de la Microbiología.

Ello constituye el motivo de esta tesis.-

2) EL GENERO STREPTOMYCES

Los Actinomycetes (1) comprenden un grupo de organismos unicelulares, ramificados, que se reproducen por fisión o por conidios especiales. El micelio puede ser de una clase: vegetativo, o de dos clases: vegetativo y de fructificación. Por el hecho de tener el micelio y las esporas de diámetro similar al de las bacterias, se clasifican entre las mismas, creándose el orden de los Actinomycetales (del griego actino: rayo y myces: hongo), para distinguirlos de las verdaderas bacterias o Eubacteriales.

Estos organismos tienen la particular propiedad de producir antibióticos.

Waksman y Henrici, en 1943, (2) proponen el nombre de Streptomyces para separar los actinomycetes aerobios y en su mayoría no patógenos, los cuales producen micelio aereo y se multiplican por formación de verdaderos esporos en cadena, de las formas anaerobias, por un lado, y de los tipos sin esporos o con esporos únicos, por el otro. La designación combina los dos primeros nombres dados a los Actinomycetes: Streptothrix y Actinomyces. Se reserva la nomenclatura de Actinomyces para las verdaderas formas anaerobias.

La clasificación de Waksman y Henrici se basa en la actividad en medios naturales con respecto a la acción patógena o no patógena en las características culturales, como pigmentación y licuefacción de gelatina y en la morfología, en especial la forma de esporulación. Esta clasificación es en resumen la siguiente:

A - Micelio rudimentario o ausente: Mycobacteriaceae

I. Organismos ácido resistentes - Mycobacterium

B - Producen verdadero micelio.

I. Micelio vegetativo fragmentado en elementos bacilares o cocoides.....

Actinomycetaceae

a - Anaeróbico o microaerófilo, parásito, sin ácido resistencia

Actinomyces

b - Aeróbico, parcialmente ácido resistente o sin ácido resistencia

Nocardia

II. Micelio vegetativo no fragmentado en elementos bacilares o coccoides.....

Streptomycetaceae

a) Multiplicación por esporos en cadenas de hifas aereas.....

Streptomyces

b) Multiplicación por espora terminal única sobre cortos esporóforos.....

Micromonospora

El Bergey's Manual (3) los ubica taxonómicamente dentro de los Schizomycetes (bacterias) como sigue:

Orden II : Actinomycetales

Familia I : Mycobacteriaceae

Género I : Mycobacterium

Familia II : Actinomycetaceae

Género I : Nocardia

Género II : Actinomyces

Familia III : Streptomycetaceae

Género I : Streptomyces

Género II : Micromonospora

En cuanto a la Familia III, Streptomycetaceae, que nos interesa en particular, puntualiza: micelio vegetativo no fragmentado en formas bacilares o coccoides. Esporos nacidos sobre cortos esporóforos. Se encuentra principalmente en el suelo. A veces es terrefílico en estiércol descompuesto (4). Pocas especies son parásitas.-

Y dentro del Género I. Streptomyces, específica: esporos en cadena presentados en hifas aéreas. Organismos que cultivan en forma de micelio muy ramificado, con un típico micelio aéreo. Conidióforos dispuestos en cadena - Aerobios -. Formas saprófitas del suelo, menos comunmente parásitos de plantas o animales. A su vez divide a este género en cinco grupos, de acuerdo con la estructura de la hifa esporulante.-

Menciona 73 especies, dando como tipo al Streptomyces albus, con las siguientes características:

Tipo: Streptomyces albus (Rossi Doria)

I - Saprófitos, de psicrófilicos a mesófilicos.

A - Pigmentos solubles en medios orgánicos - Marrón tenue, amarillo dorado o azul.

El pigmento puede estar totalmente ausente.

1 - Pigmento ausente o débil pigmento marrón formado al principio y luego perdido.

Abundante micelio aéreo blanco.

1. Streptomyces albus.

Especie tipo. Hifa vegetativa ramificada, 1μ de diámetro. Micelio aéreo: abundante, blanco, con hifas de 1.3 a 1.7μ de diámetro. Esporos elipsoidales, de 1μ de largo, arrollados en cadena sobre ramas laterales de las hifas aéreas. Gelatina: la licua - Colonias grises - Pigmento insoluble. Agar - calcio-malato: Colonias medianas con el centro solamente cubierto con el micelio aéreo blanco.

Agar - almidón: Micelio aéreo blanco, cubriendo toda la superficie.

Agar - glucosa: Micelio aéreo gris, pasando a marrón.

Peptona y caldo - agar : Sin micelio aéreo. En las colonias viejas se forma un depósito blanco tiza.

Olor: terroso o mohoso.

Caldo: cultivo escamoso o botonoso con película superficial en los cultivos viejos.

Papa: colonias y micelio aéreo blanco.

Zanahoria y otros vegetales: excelente desarrollo.

No desarrolla en celulosa.

No hidroliza almidón.-

Activamente protcolítico.

Reduce nitratos a nitritos.

Leche: Coagulación y luego peptonización. La reacción se hace alcalina.

Aeróbico.

Fuentes: de aire y suelo; de jardines.

Lugar donde se encuentra: polvo, suelo, granos y paja. Muy distribuido en la naturaleza.

Los Streptomyces tienen características comunes con los hongos y con las bacterias (1).

Por esta razón podría hacerse la tentativa de colocarlos en un grupo taxonómico entre los Schizomycetes (verdaderas bacterias) y los Hyphomycetes (verdaderos hongos).

Las formas anaerobias de los Actinomycetales, los Actinomyces, son altamente patógenos para animales. Algunas especies de Nocardia son también patógenas.

El grupo Streptomyces es característico del suelo y el tipo Micromonospora se ha encontrado en estiercol a alta temperatura, así como en ríos, lagos y lechos de río.

Así como la división del orden Actinomycetales, lo anteriormente expuesto es un tanto arbitrario.

Krassilmikov (5) ilustra en forma didáctica las formas típicas de esporulación de especies de Streptomyces.-

Para la obtención de preparados para la observación microscópica de los Actinomycetes, son recomendables los métodos de Henrici y Dreschsber.

En el método de Henrici (2) se coloca una gota de agar estéril, fundido, sobre un portaobjetos; se deja enfriar a 45°C y se inocula con un cultivo de Actinomycetes.

Se extiende en una película delgada. Se incuba luego el portaobjetos en una cámara estéril. Cuando tiene lugar el desarrollo se seca, fija con alcohol y se colorea con Gram o con azul de metileno. Puede observarse así la colonia entera, con micelio aéreo y vegetativo, sin sufrir disturbios.

En el método de Drechsler (1) el cultivo se desarrolla en medio sintético y la colonia totalmente desarrollada se corta cuidadosamente del agar. Se pone en contacto un portaobjetos untado con albúmina con el micelio superficial de la colonia, apoyando firmemente una superficie sobre la otra. Si el cultivo no es demasiado joven, la porción superior del micelio aéreo se adherirá sin mucho desgarramiento. El cultivo adherido se fija por calor, se tiñe, y la preparación se cubre con bálsamo. Las preparaciones en las cuales las cadenas de esporos han comenzado a desintegrarse, están perjudicadas por amplias masas de esporos libres.

El agente fijador más conveniente es el alcohol al 95 %. Para colorear la estructura protoplasmática se recomienda la hematoxilina - hierro-alumbre de Haidenhain. La hematoxilina de Delafield puede dar una intensa coloración actuando durante 24 horas.

Las preparaciones lavadas muestran las diferencias de coloración entre las diversas estructuras de los micelios de los organismos. En general todos los Actinomycetes son Gram positivos, aunque ciertas formas termofílicas pueden ser Gram negativas a temperaturas mayores de 50° C (6).

La mayoría de los Actinomycetes no presentan ácido resistencia excepto algunas especies de Nocardia y muchas de las formas patógenas. El micelio tiñe uniformemente excepto en cultivos viejos.

Se han observado gránulos (1) que para algunos investigadores sugieren pleomorfismos. Se tiñen fácilmente con azul de metileno (1 : 1000) y se decoloran con ácido sulfúrico. Frecuentemente, pueden verse en el microscopio gotitas de grasa, a menudo pigmentadas. Se observa también la formación de vacuolas.-

MORFOLOGIA GENERAL

El micelio vegetativo desarrolla dentro del medio, en tanto que el micelio aéreo desarrolla en la superficie. Las hifas esporulantes y las esporas reproductivas son producidas en el micelio aéreo (7). Algunos Actinomycetes forman solo micelio vegetativo. Otros producen ambos tipos.

El micelio vegetativo es brillante, de aspecto gelatinoso, presentándose en varias medidas, formas y grosores.

El desarrollo puede ser coloreado, blanquizco o crema, así como rojo, amarillo, rosa, anaranjado, verde o marrón. Los pigmentos pueden ser solubles o insolubles. Cuando se inoculan esporos en medio fresco, germinan rápidamente (2 a 6 horas).

Las hifas pueden ser largas o cortas. En los cultivos viejos el micelio se rompe en fragmentos muy pequeños.-

Micelio aéreo: Muchos Actinomycetes, sobre todo del género Streptomyces, son capaces de formar micelio aéreo en la superficie del cultivo. Usualmente las hifas aéreas son cortas, rectas u onduladas y ramificadas. Algunos organismos producen hifas largas y poco ramificadas, rectas o ligeramente curvas. El micelio aéreo puede cubrir la colonia en forma de masa algodonosa o pulverulenta, con aspecto de tiza o granular. Algu

nos organismos presentan micelio en forma de penacho o de zona concéntrica sobre el cultivo.

La esporulación es favorecida por la sequedad, aerobiosis y nutrición con hidratos de carbono (8) y (9).

En el género Streptomyces la esporulación por fragmentación consiste al comienzo del proceso en la formación de esporos en el extremo de las hifas aéreas, siguiendo luego por la base. En medio líquido se considera que los Streptomyces forman pseudo colonias, a diferencia de lo que sucede con los hongos y las bacterias.

REQUERIMIENTOS BIOLÓGICOS Y CULTURALES.

Como regla general los Actinomycetes prefieren las proteínas a los hidratos de carbono como fuentes nutricias. Liberan nitrógeno en forma de amoníaco. El hidrato de carbono se usa como regulador del pH, dado que el amoníaco liberado alcaliniza el medio. Además los carbohidratos aumentan el desarrollo (10).

La gran mayoría de los Actinomycetes licúan gelatina. Además coagulan la leche y luego la peptonizan. En la práctica la peptonización ocurre sin previa coagulación. La coagulación de la leche es un efecto proteolítico debido más a la formación de enzimas que a un efecto ácido.

Se ha encontrado que los fosfolípidos favorecen el desarrollo de los Actinomyces. Nunca producen turbidez en el medio de cultivo como lo hacen las bacterias. Los únicos casos de turbidez pueden ser debidos a algunas de las llamadas variantes bacterianas. Desarrollan mejor en cultivo sumergido y aireado que en cultivo estacionario. En general hay una relación definida entre la concentración y disponibilidad de las fuentes de carbono y la cantidad de material celular sintetizado por los Actinomycetes (1).

Como resultado del desarrollo de los Actinomycetes en diferentes medios de cultivo, hay siempre una tendencia a alcalinizar dichos medios, a menos que las únicas fuentes de nitrógeno sean sales de amonio o ácidos orgánicos, en cuyo caso se produce una acumulación de iones ácidos. Sin embargo, en presencia de carbohidratos, algunos organismos son capaces de producir ciertos ácidos orgánicos. Tarde o temprano el ácido

será descompuesto o el organismo producirá substancias neutralizantes, con el resultado que la reacción tenderá a hacerse alcalina. El máximo de alcalinidad es usualmente de 8.6 - 8.8. Se debe a la acumulación de iones básicos (Na^+ , K^+) o a la formación de iones amonio.-

Fue aislado un Actinomycetes que reacciona acidificando el medio y al que se llamó S. acidophilus. Para desarrollar los Actinomycetes prefieren reacción neutra o ligeramente alcalina. Son sensibles a la acidez alta. Muchas especies no crecen a pH de 4.8.- La temperatura óptima para su desarrollo oscila entre 23 y 37°C.

Las formas más comunes son rápidamente destruídas a altas temperaturas.

La resistencia de las esporas es solo ligeramente más alta que la del micelio. Cuando un cultivo se mantiene 10 minutos a 70° C pierden su capacidad vital tanto el micelio como las esporas.-

Para el Streptomyces lavendulae la producción óptima de estreptomycin oscila entre 20 y 28°C.- A 37°C se produce muy poco antibiótico.

La producción de olores es una de las características de los Actinomycetes.

De acuerdo con Lieske (11) sólo aquellas formas aerobias que producen micelio blanco tiza, con esporos esféricos, son capaces de producir olor. Las formas no esporuladas del tipo Nocardia y aquellas con esporas cilíndricas, no dan ningún olor. La presencia de carbohidratos en el medio favorece la producción de olores. Los Actinomycetes termofílicos son responsables de la mayor parte de los olores de fruta que se manifiestan particularmente en los cultivos jóvenes.

La substancia odorífera es soluble en eter. Otras de las características de los Actinomycetes es la producción de una variedad de pigmentos en medios orgánicos o sintéticos (12).- Ciertas especies producen más de un color como el S. violaceus-ruber y el S. tricolor.

Algunos pigmentos son sintéticos. Otros se forman como resultado de la transformación de ciertos constituyentes del medio, según estudios de Cohn y Beijerinck. Esto es cierto particularmente en el caso de los pigmentos negros y marrones producidos en medios con proteínas.-

Las variaciones de color dependen de muchos factores, estando involucrados no sólo la naturaleza del medio sino también la edad y los cultivos previos.

Por otra parte, los pigmentos insolubles son más constantes que los pigmentos solubles. Los ácidos y álcalis ejercen una marcada influencia en la naturaleza del pigmento. La producción de pigmento marrón o negro, soluble en agua, en medios de cultivos orgánicos es característica de un gran número de Streptomyces. La acción de la tirosinasa, característica de estos organismos, puede servir para explicar el mecanismo de producción de estos pigmentos (13).-

Producen también proteasas, enzimas celulolíticas, bacteriolíticas, autolíticas y vitaminas. Posee además mecanismos oxidativos.

Las propiedades antagónicas de los Actinomycetes serán analizadas más adelante.

Consideramos de interés puntualizar la diferenciación entre Nocardia y Streptomyces (14).-

Primero: Las Nocardia generalmente no producen micelio aéreo y si lo hacen, tal micelio no se diferencia del vegetativo y además no forma nunca espirales; el Streptomyces, por otra parte, produce un micelio aéreo característico, propiedad que puede perderse, sin embargo, por cultivos continuados o bajo condiciones especiales. Este micelio forma frecuentemente espirales características.

Segundo: La Nocardia se multiplica por concentración y segmentación del protoplasma dentro de una célula filamentosas, seguido por la disolución de la membrana celular, mientras que el Streptomyces produce verdaderos esporos, no fragmentándose espontáneamente el micelio vegetativo en elementos bacilares o coccoides y permaneciendo no septado y coherente aún en cultivos viejos.

Tercero: En la Nocardia el micelio aéreo representa una extensión del micelio vegetativo; no exhibe diferenciación protoplasmática y además es estéril. Por otra parte, cuando un Streptomyces ha perdido su capacidad de producir micelio aéreo, puede resultar una forma análoga a la Nocardia, excepto por la estructura del micelio y por la capacidad del Streptomyces degenerado para regenerar su capacidad perdida (15).

Cuarto: Otra diferencia entre Nocardia y Streptomyces es la ácido resistencia total o parcial de las primeras cuando desarrollan en ciertos medios.

La diferenciación entre especies de Streptomyces y de Micromonospora no es demasiado difícil dada que la formación de micelio aéreo y la esporulación de ambos géneros es muy distinta. Puede presentarse alguna dificultad en diferenciar especies de estos dos géneros de aquellos de Thermoactinomyces dado que las últimas producen esporas únicas, similares a las de Micromonospora, pero más en el micelio aéreo que en el vegetativo, como en el caso de la Micromonospora.

El desarrollo de Streptomyces en medios sólidos es duro, de textura densa, elevada y adherida al medio.

En medios líquidos, en especial en cultivos agitados, el desarrollo se presenta generalmente en forma de copos, o en forma esférica. El primer tipo es el más recomendable desde el punto de vista de la producción de antibióticos.

Muchos de los cultivos ya sea en medios sólidos o líquidos, pueden sufrir autólisis, frecuentemente producida por un fago, lo que es perjudicial debido a la prematura destrucción del micelio.

Han sido las evidencias más recientes con respecto a la sensibilidad de los Actinomyces a los antibióticos y a fagos específicos, así como la naturaleza de su desarrollo circunscripto, factores decisivos en la inclusión de los mismos más cerca de las bacterias que de los hongos.-

Los Streptomyces sufren variaciones cualitativas y cuantitativas que permiten hablar de "razas fisiológicas" (16).- Por ejemplo, la cepa de S. griseus productora de estreptomina ha dado dos tipos de variantes una de las cuales no produce micelio aéreo ni forma estreptomina, y otra que produce un micelio vegetativo rojo y forma otro antibiótico, la rodomicina, pero no estreptomina. Las diferencias cualitativas de las variantes tienen su máxima expresión en la cantidad de antibiótico producido, que puede variar en proporciones de muchos cientos en la misma especie.-

En la bibliografía más moderna (17) encontramos cuidadosamente analizado el problema nomenclatural del orden de los Actinomycetales.

La estrecha relación de los mismos con las bacterias está confirmada por:

- 1) El diámetro de 0.5 a 1.0 μ de las hifas o de las células.
- 2) La ausencia de verdadero núcleo.
- 3) La composición de la pared bacteriana (18)
- 4) La fago especificidad.

Hay además una serie de formas como Nocardia, Mycobacterium y Corynebacterium que se sitúan entre los Actinomycetes y los Eubacteriales, pero no hay series que los conecten con los hongos.

Se ha presentado la moción (19) de designar como cepa ATCC 3004 (American Type Culture Collection), IMRU 3004 (Institute of Microbiology, Rutgers University), como cepa neotipo de Streptomyces albus (Rossi Doria), denominación original dada por Waksman y Henrici en 1943 (2).

Distribución de los Actinomycetes en la naturaleza.

Se encuentran en tierras vírgenes y cultivadas, en suelos fértiles e infértiles en varias regiones del mundo.-

Son particularmente abundantes en suelos alcalinos y en suelos ricos en materias orgánicas.

Pueden usarse cuatro métodos para determinar la presencia de Actinomycetes en el suelo:

- 1) Método microscópico directo en suelo teñido.
- 2) Examen microscópico directo del suelo fijado o sin teñir.
- 3) Método del portaobjetos en contacto con la tierra.
- 4) Método de cultivo por dilución en placa.

Conn demostró que los Actinomycetes están presentes en abundancia en suelos con materia orgánica.

Las colonias de Actinomycetes pueden distinguirse fácilmente de las colonias bacterianas por requerir un mayor período de incubación.

En primavera, el 20 % de las colonias en placas con suelo, son de Actinomycetes (1).

En otoño, aumentan a un 30 % del total. En invierno decrecen a un 13 % por el frío.

Cuando el suelo se trata con estiercol, hay un marcado incremento en el total de organismos. A medida que aumenta la profundidad, aumenta el porcentaje de Actinomyces en relación con la flora total. A 75 cm. de profundidad aumenta a un 75 % del total, pero disminuye éste de 743.000 a 240.000 microorganismos por gramo de suelo. En suelos ácidos hay un menor porcentaje de Actinomyces. Se han efectuado trabajos sobre la distribución de Streptomyces en distintas regiones. Nishimura y colaboradores (20) estudiaron 48 muestras de suelo recogidas en 3 áreas cercanas a Osaka (Japón) y aislaron 848 cepas de Streptomyces que investigaron sobre las bases de clasificación de los mismos autores.

Craveri y colaboradores (21) estudiaron la distribución de Streptomyces productores de antibióticos en suelos de Italia.

GANZE (22) analizó la distribución de microorganismos productores de antibióticos. Encontró que cada gramo de suelo de bosque o de campo contiene algunos miles de esporas de hongos, algunos cientos de miles de Actinomyces y algunos millones de bacterias.

Usualmente, en una misma muestra de suelo, se observan unas pocas formas microbianas aún en centenares de pequeñas submuestras. Pero si se toma otra muestra de distintas condiciones ecológicas, se ve que está poblada por diferentes clases de microbios. Las formas antagónicas son muy frecuentes en este grupo y usualmente oscilan entre el 20 y el 80 % del total de cepas aisladas de suelo. Se observan a menudo fluctuaciones dentro de estos límites en diferentes muestras de suelo de una misma localidad.

El regular incremento de norte a sur, tan característico en bacterias y hongos, no se observa en los Actinomyces.

Streptomyces y cáncer.

La deficiencia respiratoria de las células de tumores malignos, observada originalmente por Warburg, y la acción potencial de ciertos antibióticos que inhiben su desarrollo, como la actinomicina C y la actinomicina 6270, ofrece un renovado interés en el estudio de los Streptomyces (23).-

Se hicieron ensayos en el laboratorio produciendo mutantes con alteraciones en la respiración en levaduras, estafilococos y bacterias del colon (B. coli y B. paracoli) y en algunas bacterias del suelo (B. Mycoides). Las mutantes se indujeron por radiación U.V. y en especial por uretano. Se encontró que el desarrollo de microorganismos con respiración dañada, es selectivamente inhibido por un número de sustancias anticancerosas, como algunos de los denominados agentes alquilantes biológicos, los antimetabolitos de los ácidos nucleicos y los antibióticos anticancer, actinomicina C y 6270 -(24) y (25).

Las mutantes de microorganismos con respiración dañada pueden ser usadas en el estudio de mecanismos de acción selectiva de sustancias anticancer. Las mutantes pueden también emplearse como detectores en la búsqueda de nuevos agentes que inhiben selectivamente a células con respiración dañada (26).

Estos agentes pueden considerarse potenciales sustancias anticáncer, sujetas a posterior screening sobre animales inoculados con tumores varios.

Antes de concluir con esta breve reseña sobre el género Streptomyces consideramos de interés incluir el claro análisis de la morfología de los Actinomycetes, presentado por Negroni en el 6º Congreso de Microbiología en Roma (27).

Diremos entonces que los caracteres fundamentales de este grupo son: a) su pared celular rígida; b) su micelio filamentoso que crece por el vértice y presenta ramificaciones verdaderas; c) la formación de thallosporos especiales como elementos de reposo, que difieren de los endosporos de las bacterias; d) el diámetro de su micelio, igual al de los Eubacteriales; e; la ausencia de núcleos verdaderos o diferenciados de reproducción sexuada y de plástidos.

El micelio vegetativo es continuo, carácter que se pierde en algunas cepas en el curso de las 24 horas de su desarrollo, o algo más tarde. La ramificación de este micelio es por regla general monopodial, pudiendo presentar también una dicotomía verdadera o falsa (seudodicotomía).

El diámetro de los filamentos varía poco para una misma cepa, oscilando entre 0.5 y 1.2 . Los filamentos jóvenes son, a veces más finos. Las cepas aerobias pueden formar un micelio aéreo cuyas hifas doblan en diámetro las del micelio substratal. Los filamentos pueden ser rectos, poco flexuosos o, por el contrario tan ondulados en algunas cepas que dan la impresión de ser espiralados o en barreno. El micelio continuo de ciertas formas aerobias y el de las cepas anaerobias, comienza a tabicarse al cabo de 24 a 48 horas de su desarrollo. Los tabiques están regularmente espaciados y los artículos que delimitan (esporos por segmentación de Lachner - Sandoval), sufren un desplazamiento en zig-zag, probablemente por el hecho de continuar su crecimiento. Estos artículos pueden aún, emitir brotes por debajo de los tabiques formando cortas ramitas que los prolongan, y con las que forman un ángulo muy abierto. Este proceso se extiende del centro a la periferia de la colonia y a veces en ambas direcciones, completándose al cabo de 4 a 6 días. Orkov, en 1923, llamó a estos artículos células finales o terminales, porque se forman más abundantemente cuando el desarrollo está por detenerse. Ciertas especies tienen tendencia a pasar a otro tipo de desarrollo, el desarrollo angular, sin que sea posible, entonces, establecer límite alguno con los Mycobacterium y Corynebacterium. Los artículos formados se tabican en su parte media, el tabique se abre sin separarse completamente las dos ramas, que pueden presentar aún cierto grado de crecimiento, forman un ángulo de grado variable, tomando aspecto de una V, Y o H.

En los cultivos viejos se han observado ocasionalmente abultamientos terminales o subterminales, recordando a los clamidosporos de los Eubacteriales.

Micelio de fructificación: Se lo observa exclusivamente en ciertas cepas aerobias, formando parte del micelio aéreo y disponiéndose a veces, en un aparato esporífero. Las hifas esporógenas detienen su desarrollo en longitud y aumentan luego su diámetro hasta sobrepasar el del filamento vegetativo que le dió origen. Las hifas fructíferas pueden ser fértiles o emitir ramas de segundo o más orden. En ocasiones existe un filamento axial rígido y robusto del cual nacen, a intervalos regulares, las

hifas esporógenas dispuestas en verticilos.

Estas hifas son rectas o espiraladas. Las espirales comienzan a formarse, en este último caso, cuando la hifa esporógena ha alcanzado aproximadamente la mitad de su crecimiento en longitud y se detienen antes de la esporulación.- El número de vueltas y la orientación de las mismas (levógira o dextrógira) parece ser variable para una misma cepa.

La esporulación comienza por el vértice y progresa hacia la base de la hifa esporógena, separada del filamento vegetativo o de la rama estéril por un tabique. El contenido celular se condensa a intervalos regulares formando una cadeneta de esporos separados por otros tantos espacios vacíos. Probablemente se forme una membrana por condensación lipoproteica en la zona de separación. Las paredes de la hifa esporógena se contraen y estrangulan en los espacios huecos hasta rodear casi completamente al espora, manteniendo la formación de la cadeneta merced a sendos istmos membranosos comparables a los conectivos de las cadenas de conidios de ciertos Eumycetes. Estos esporos son esféricos (de 0.3μ a 0.8μ de diámetro) u ovales o cilíndricos (de 0.8 a 1μ x 0.7μ). En ciertas cepas de Actinomyces aerobios (grupo III, Micromonospora, de Orkov), carentes de micelio aéreo, los esporos comienzan a formarse en el centro de la colonia, son únicos y terminales, y están separados de la rama esporógena mediante un tabique. Las ramas esporógenas son cortas, de 5 a 10μ de longitud, rectas y frecuentemente ramificadas en racimo. El espora terminal es esférico, de 1 a 1.3μ , oval o suboval, de 1.3 - 1.5 x 1.2μ .

Los esporos germinan al cabo de un plazo variable según la temperatura de incubación y otras condiciones mesológicas. A 37°C lo hacen al cabo de 4 a 5 horas, y a la temperatura del laboratorio en el lapso de 24 a 48 horas.

También los esporos viejos requieren más tiempo para germinar. Los esporos globulares emiten de 2 a 4 tubos germinativos cilíndricos en sitios opuestos.

Significado de los esporos de los Actinomyces.

La formación de los elementos reproductores de los Actinomyces, ha motivado una

gran confusión en la terminología e interpretación de los mismos.

Los elementos reproductores son siempre thallosporos, puesto que se originan a expensas de una parte del thalo que desaparece en su formación.

Los artículos formados por tabicamiento del micelio vegetativo, del substratal o del aéreo, sin diferenciación de micelio fructífero alguno, corresponden a los artrósporos de los Mycetes (esporos por segmentación de Lachner - Sandoval; oidiósporos de Newkirch; células finales o terminales de Orskov; elementos artrosporoides de Balducci). Estos son elementos vegetativos que asumen, secundariamente, las funciones de propagación de la especie, no poseen mayor resistencia que la del micelio vegetativo frente a los agentes físicos o químicos y detienen completa o incompletamente su vida vegetativa. En este último caso se produce un desplazamiento en zig-zag o se multiplican con el tipo de crecimiento angular. Este crecimiento, propio de los Mycobacterium y Corynebacterium, sería, en los Actinomycetes, una especie de thalo reducido por el desarrollo acelerado y el tabicamiento precoz.- La liberación de los artrósporos comienza por el "clivaje" de los tabiques que los separan y se termina por la ruptura de la membrana en el punto de su inserción.-

Los esporos formados en cadenas en un micelio de fructificación aéreo corresponden a un tipo particular de thallosporos designados por Vuillemin con el nombre de "entosporos" (aleurias, artrosporos, conidias y endoconidias según distintos autores). Estos esporos han recibido erróneamente la designación de conidias.

La "conidia vera", en el sentido de Vuillemin y de Mason, es un espora asexual formado en el vértice de un esporóforo afilado (fialide), fácilmente caduco. El vértice de este esporóforo representa un punto meristémico abierto, en crecimiento.- Al separarse la conidia queda, a ese nivel, un collar ligeramente infundibiliforme que proyecta la membrana del conidióforo indicando, también, que la conidia se reviste de una membrana propia. La hifa fértil de los Actinomycetes detiene su crecimiento en longitud, aumenta de espesor, se separa mediante un tabique del micelio vegetativo o del aparato esporífero del cual forma parte y, en su interior, se delimitan los "entosporos" comenzando por el vértice. Adquiere así el significado de una "proconidia".

Como los hemisporos de los Eumycetes, estos entosporos son thallosporos con las propiedades biológicas de los esporos verdaderos, en cuanto detienen su vida vegetativa, tienen un contenido celular denso y son capaces de resistir, en mayor o menor grado que el micelio vegetativo, la acción de los agentes químicos y físicos. Finalmente, los esporos únicos terminales (microaleurias) del género Micromonospora, tienen su equivalente en las aleurias de los Eumycetes.

3) AISLAMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS DE STREPTOMYCES.-

Es deseable aislar los Actinomycetes aerobios del suelo con un mínimo de interferencia con bacterias asociadas y hongos superiores (28).

Crook y colaboradores (29) encontraron que el propionato de sodio es un efectivo inhibidor de hongos.

Corke y Chase, en 1956 (30), en sus investigaciones microbiológicas de tierras altamente infectadas de suelos ácidos y boscosos, estudiaron el uso de propionato de sodio y de cicloheximida como medios aditivos. Encontraron que la cicloheximida es el más efectivo de los dos y recomendaron su uso en concentraciones de 40 µg por ml de agar. Por otra parte, la cicloheximida, aún en concentraciones de 100 µg por ml de agar, no produjo supresión en ninguno de los 85 cultivos de Streptomyces estudiados por los autores.-

Dulaney y colaboradores (31) aislaron selectivamente Streptomyces de un medio conteniendo, por ml, 20 unidades de cicloheximida, 20 unidades de polimixina, 20 unidades de subtilina y 20 unidades de penicilina.

Benedict y colaboradores (32) encontraron que seleccionando la fuente de nitrógeno puede favorecerse el desarrollo de colonias de Streptomyces en relación con las bacterias, en placas de agar. Observaron que la L_ arginina es fácilmente atacada por la mayoría de los Streptomyces, recomendando el uso de este aminoácido en reemplazo de la glicina del medio de Lindenbein (33).

Porter y colaboradores (28) lograron condiciones muy favorables para el aislamiento preferencial de Actinomycetes del suelo, combinando el principio de inhibición selectiva de tierras con el uso de la modificación de Benedict del medio de Lindenbein para limitar el desarrollo bacteriano. Para acrecentar la efectividad del procedimiento de aislamiento, los autores prepararon las placas de agar de acuerdo con el método de Kelner (34).- Esta técnica asegura el desarrollo de los microorganismos como colonias superficiales y acelera en mucho las tentativas de identificación y comparación. Consiste en colocar una alicuota de 15 ml de un medio apropiado en una caja de Petri,

dejando solidificar para tener una capa o lecho basal. Las muestras de suelo se suspenden en agua destilada estéril, en la dilución apropiada, y se pipeta un ml de cada dilución en una porción de 14 ml del medio de agar, manteniendo a 48°C en baño de agua. Se agregan 5 ml de esta suspensión sobre las superficies solidificadas de dos cajas de Petri, para tener placas duplicadas para cada dilución. Se usa la misma composición de agar en el medio basal y en las capas superficiales.

Un número de medios nutritivos, como los de asparagina-glucosa, Emerson, Czapek, extracto de levadura y agar Bennett, se usan comunmente para investigar el cultivo y el desarrollo de los Actinomycetes aerobios. Cuando las bacterias son numerosas en el suelo, ninguno de estos medios son particularmente satisfactorios para el aislamiento de Streptomyces, y algunos, como el agar -extracto de levadura, en realidad potencian la propagación de colonias bacterianas.-

Porter y colaboradores (28) han obtenido buenos resultados con la modificación de Benedict del medio de Lindenbein (Ver apéndice). Con este medio pueden obtenerse placas en las cuales desarrollan casi exclusivamente los Streptomyces.

Comparando con los medios de ágar -extracto de levadura, agar-asparagina-glucosa, y agar Bennett, los autores destacan la imposibilidad de aislar solamente Streptomyces usando los tres medios citados y preconizan las grandes ventajas del medio de Benedict. Aunque el medio de Benedict favorece el desarrollo de Actinomycetes sobre bacterias, se llama la atención con respecto al uso de agentes antifungales.

Un antibiótico, designado como A-5283, e identificado como pimaricina, es muy útil para eliminar mohos usado en concentraciones de 50 μ g por ml. No produce efectos observables sobre el desarrollo de los Streptomyces aún en concentraciones de 100 μ g por ml.-

El antibiótico A-5283 es insoluble en agua y puede esterilizarse a una atmósfera de presión durante 15 minutos con menos del 10 % de pérdida de su actividad. Para su uso se prepara una solución stock en concentración de 1 mg por ml en N_N'_ dimetilformamida y se dispersa en el medio de agar, en la concentración deseada, antes de esterilizar. Según la experiencia de Porter y colaboradores el medio de agar conteniendo

A-5283 tiene la gran desventaja de no poder guardarse durante más de tres días aún en refrigerador, sin sufrir pérdida de su actividad antibiótica.

La facilidad con que los Streptomyces pueden ser selectivamente aislados de suelo, mediante agar Benedict A 5283, hace que esta combinación haya sido incorporada a las técnicas de rutina en los programas de aislamiento.

Así como el A-5283 es un agente antifungicida eficaz en los trabajos de aislamiento de Streptomyces de suelo, se ha sugerido también su uso para decontaminar cultivos infectados con hongos.

Para ensayarlo se preparó una suspensión de esporos de una cepa de Streptomyces lavendulae en una solución salina estéril, y varias porciones se mezclaron separadamente con cada uno de los siguientes hongos: Rhizopus nigricans, Penicillium chrysogenum, Sacharomyces cereviciae y Neurospora crassa. Aproximadamente 0.5 ml de cada mezcla se incorporaron a un medio de agar-levadura-malta conteniendo 50 μ g por ml de A-5283, en cajas de Petri. Se comprobó que el antibiótico A-5283 no tiene efectos visibles sobre el desarrollo del Streptomyces, pero que inhibe completamente en todos los casos el desarrollo del hongo contaminante. Varios cultivos de Streptomyces de la colección de Porter y colaboradores (28), contaminados con hongos, han sido librados exitosamente del contaminante usando este antibiótico. Se encontró también que el nystatin, es concentraciones de 50 μ g por ml, es eficaz para eliminar contaminaciones por hongos.- Otro procedimiento aconsejado para el aislamiento de Streptomyces, consiste en mezclar 10 gramos de suelo con 30 ml de solución fisiológica estéril, en un recipiente de vidrio esterilizado (35). Esta suspensión se filtra a través de gasa o algodón y se agrega penicilina y estreptomina a razón de 5000 y 1000 unidades respectivamente, para contrarrestar la acción de las bacterias existentes. Se deja reposar por espacio de una hora y se retira el sobrenadante con pipeta estéril.- Se siembra en caja de Petri, en los medios adecuados.-

Es importante el problema de la conservación de los Streptomyces aislados, por la degeneración o pérdida de algunas cepas durante el mantenimiento en cultivos activos, así como por la marcada variación que ocurre en este género, probablemente debidas,

al menos en parte, al hecho de cultivarse en medios poco óptimos para el crecimiento y la esporulación. Pridham y colaboradores (36) estudiaron la selección de substratos para el mantenimiento y la investigación taxonómica, cultural y morfológica de cepas de Streptomyces.

Para preparar cultivos en suelo se colocan aproximadamente 2 gramos de tierra finamente pulverizada en tubos de ensayo comunes. Se esteriliza 30 minutos a 120°C en días alternados. Después de cuatro esterilizaciones se efectúa control de esterilidad en tubos seleccionados al azar, por adición de caldo Bennett e incubación entre 25-30°C durante una semana.

Los cultivos en suelo se preparan para inocular 10 ml de caldo Hickey-Tresner en tubos de 25 x 150 mm con cada cepa particular desarrollada en agar inclinado.

Los tubos inoculados se colocan en un agitador rotatorio y se incuban durante 2 días a 28°C. Se introducen 2 ml de este caldo en los tubos con suelo estéril y la suspensión se mezcla con la punta de la pipeta.

Los tubos se tapan y se dejan al aire seco, a temperatura ambiente durante 2-3 semanas. Aparece usualmente una superficie cubierta con abundante micelio aéreo.-

En las fases iniciales de la investigación (36), un cierto número de cultivos debilitaba al crecer, por lo que se ha dejado de lado el medio de Bennett para la preparación de cultivos de suelo.

En la preparación del inóculo para los ensayos comparativos, se dispersa una pequeña porción del cultivo de suelo en 5 ml de agua destilada estéril. Cada medio en pico de flauta se inocula dejando deslizar 0.1 ml del inóculo sobre la superficie. Se estría con la punta de la pipeta. Los cultivos se incuban 14 días a 28-30°C. Se examina cada cultivo y se estima visualmente el grado de formación del micelio aéreo.

Un cultivo con el 75-100 % de su superficie cubierta con micelio aéreo se clasifica como excelente. Con 50-75 % como bueno y con menos del 50 % como pobre.

Además se tienen en cuenta el color del micelio aéreo, el color del reverso del cultivo y el pigmento soluble eventualmente producido.

Para inducir formación de micelio aéreo se recomiendan los siguientes medios: pasta

de tomate - avena, agar - extracto de levadura, agar Hickey - Tresner, agar pasta de tomate, agar Bennett, agar papa glucosado, medio de Carvajal con avena y asparagina glucosa.

Además han dado buenos resultados los de agar almidón con sales inorgánicas y el agar Czapek.

Algunos medios, como el agar - asparagina - glucosa, el Czapek, el agar - harina de maíz y el medio de Difco de papa glucosada, dan desarrollo muy pobre con varias cepas de Streptomyces. Fue atribuido inicialmente al bajo pH de los mismos, pero sin embargo no mejoraron los resultados al modificar el medio.

De los ocho medios seleccionados, el agar - pasta de tomate no se usa habitualmente, a pesar de ser bastante similar al agar - pasta de tomate - avena.

El agar - papa - glucosado no se usa rutinariamente dado que su preparación insume bastante tiempo y además debilita el desarrollo de algunas cepas.

El medio de Bennett podría eliminarse ya que el agar Hickey - Tresner es el substrato preferido entre estos dos últimos medios. Sin embargo los medios de pasta de tomate, de papa glucosada y de Bennett se recomiendan como substratos útiles para el estudio de los Streptomyces, aunque no para su mantenimiento. El agar pasta de tomate - avena se recomienda para el mantenimiento, determinación de morfología de esporóforos y de terminación del color de las esporas (color del micelio aéreo esporulante maduro). No se recomienda para la determinación del reverso de las colonias ni del pigmento soluble.

El agar extracto de levadura se recomienda para el mantenimiento, determinación de morfología de esporóforos, color de esporas, color del reverso de las colonias y color del pigmento soluble de Streptomyces, al igual que los medios de Hickey - Tresner, agar - asparagina, glucosa y Czapek.- Este último no es aconsejable para mantenimiento de cepas.-

El medio de Carvajal con agar - avena es útil para determinar la morfología de los esporóforos y el color de las esporas. La determinación de la morfología de los esporóforos es a menudo difícil debido a la opacidad del medio.

Por el mismo motivo no pueden ser observados el color del reverso de las colonias y el del pigmento soluble, a menos que sean totalmente distintos.

El medio de agar almidón con sales inorgánicas se recomienda para determinar la morfología de los esporóforos y el color de las esporas de los Streptomyces. Da asimismo información de la habilidad de las cepas para hidrolizar el almidón, lo que es especialmente útil en la determinación de la morfología de Streptomyces verticilados (Para la preparación de los medios de cultivo, ver apéndice). El resultado del estudio de Pridham y colaboradores indica claramente que aún hay mucho que aprender en lo que respecta a la fisiología de Streptomyces, particularmente en lo que se refiere a factores que influyen en la formación de esporos. Parecería que ciertos factores de crecimiento y algunas sales inorgánicas, juegan un papel importante en el proceso de esporulación.

La mayor parte de los medios recomendados contienen fuentes nutricias complejas, por ejemplo extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne y pasta de tomate. La preferencia de muchos autores por los medios de sales inorgánicas complejos, parte de la tesis que el uso de sustancias químicamente definidas es un prerrequisito para el adecuado estudio taxonómico de los Streptomyces. Sin embargo, para el desarrollo de elementos morfológicos que pueden usarse para la separación de un conjunto heterogéneo de Streptomyces en grupos morfológicos bien definidos, esos medios dejan mucho que desear.

El medio de Emerson de excelente desarrollo vegetativo pero sólo un débil micelio aéreo. En estudios taxonómicos se ha observado que el uso de este substracto produce estructuras morfológicas aberrantes o deformadas en un número apreciable de cepas. Esto no ocurre con los medios recomendados anteriormente.-

Con respecto a las características morfológicas de las cepas estudiadas, se encontró considerable dificultad en la interpretación de los colores del pigmento soluble, aún con la ayuda de un manual de colores. Esto es especialmente cierto cuando están presentes el marrón oscuro, el amarillo o el marrón amarillento. En opinión de Pridham es muy cuestionable el uso del pigmento soluble como un criterio primario para se-

paración de Streptomyces. Esta característica tiene solo un valor limitado, por ejemplo cuando el pigmento soluble tiene un color poco usual, como los particulares rojos y azules del S. coelicolor o los amarillos brillantes de ciertas cepas productoras de actinomicina.

La interpretación del color del micelio aéreo de cultivos esporulantes maduros (color de las esporas), ofrece también dificultades. El uso de un manual de colores, sin embargo, permite una razonable seguridad en la apreciación de esta característica.

Con respecto al color del reverso de las colonias, hay que hacer notar que en ciertos medios por ejemplo agar - extracto de levadura o agar - Emerson, la mayoría de las cepas pueden ubicarse en uno o varios grupos definidos. El color del reverso puede ser a veces cuestionable para el adecuado tratamiento de los géneros, pero puede emplearse eventualmente reforzando el uso de la micromorfología para establecer una clasificación más natural de las especies de Streptomyces.

La morfología de los esporóforos) el color de las esporas y el del reverso del cultivo, son tres criterios que eventualmente permiten la determinación de rangos de variación en una especie particular.

Waksman y Lechevalier (14) preconizan la necesidad del uso de medios standard, así como de condiciones tipo para el desarrollo de Streptomyces.- Lo mismo sucede con la aireación y el control de la temperatura.

Encuentran que los medios sintéticos son útiles en el estudio de la morfología y fisiología de estos organismos, y especialmente en el reconocimiento de la pigmentación. Los medios orgánicos, a menudo muy específicos, son recomendados para obtener evidencias suplementarias, especialmente para cepas que desarrollan débilmente en los medios inorgánicos comunes.

La gran mayoría de los Actinomycetes son aerobios, muy pocos son anaerobios y muchos son microaerófilos. Proporcionando la aireación adecuada, los organismos desarrollan sobre la superficie de los medios sólidos, en la parte superior de los medios líquidos o en cultivos sumergidos muy bien aireados.

Las temperaturas entre 25-30°C se usan habitualmente para la incubación de la gran

mayoría de los Streptomyces, Nocardia y Micromonospora. Para formación de antibióticos se usan frecuentemente temperaturas algo diferentes. Los organismos patógenos requieren para su crecimiento temperaturas de 37°C y los termofílicos necesitan 50-60°C o aún más.

El almacenaje de los cultivos en suelo, o bajo aceites minerales, o la conservación por liofilización, son métodos aceptables para una larga conservación de cepas de Streptomyces.

Más recientemente (37) las técnicas a temperaturas por debajo del punto de congelación, ofrecen igual importancia como medios de mantenimiento de cultivos. En experiencias de Tresner y colaboradores, una colección de alrededor de 400 cultivos del género Streptomyces, incluyendo algunas de las 135 especies descritas en la literatura, han sido conservadas bajo frío intenso (-22°C) durante largo tiempo.

Alrededor del 60 % permanecieron congelados durante más de tres años, y el resto por períodos variables en el término de tres años.

En registros generales se observó una viabilidad excepcionalmente buena y dentro de las averiguaciones factibles no se observó modificación en los cultivos originales o en las formas morfológicas.

La capacidad de producción de antibióticos de 16 cultivos se encontró esencialmente sin cambios después de 2 años de almacenamiento.-

4) Esquemas de clasificación

Desde que se encontró la habilidad de algunos Actinomycetes para producir antibióticos, se postularon una serie de sistemas de clasificación de este grupo de microorganismos, varios de los cuales analizaremos a continuación. La utilización de carbohidratos ha sido considerada desde hace mucho tiempo una ayuda valiosa en tales esquemas. Ya en 1948, Pridham y Gottlieb (38) postularon la utilización de compuestos de carbono por algunos Actinomycetes, como un auxiliar para la determinación de especies. Los procedimientos determinantes usados están basados en el estudio de la morfología, pigmentación y desarrollo característico en medios compuestos por mezclas naturales de substratos. En tales medios se puede observar a menudo una variedad de pigmentos y colonias típicas producidas por algunos organismos.

En manos inexpertas puede haber dificultad en la interpretación de los resultados y a veces podrá designarse una especie particular como una de las muchas especies antes descritas más bien que como uso espécimen distinto.

Pridham y Gottlieb, como identificación de rutina, determinaron reacciones de Gram, medidas de los esporos e hifas y el desarrollo característico de varios aislamientos en los medios siguientes: caldo nitrato, caldo triptona, agar almidón, medio doble de azúcar de Kliger, gelatina, leche, caldo **tirosina**, caldo nutritivo, agar D. glucosa, agar Czapek glucosado, agar n-butirato de calcio, medio de huevo de Dorset, medio de suero de **Loeffler**, papa y zanahoria. Algunos de los resultados fueron usados en la identificación de especies aisladas, siguiendo las reglas del Manual Bergey. Los aislamientos desconocidos fueron difíciles de identificar por los inconvenientes en la evaluación de la producción de pigmentos y colonias típicas.

Los desarrollos en los distintos medios fueron bien definidos y similares en los diferentes experimentos que realizaron durante un período de 18 meses.

Encontraron que todas las especies probadas podían ser diferenciadas una de otra sobre la base de su desarrollo en varias fuentes de carbono, y que esta característica podía ser complementada con ayuda de otras reacciones bioquímicas.

Los autores mencionados (38) usaron un medio básico para utilización de compuestos de carbono, cuya composición se da en el apéndice. Después de esterilizado, se enfrió a 45°C y se agregó la solución estéril acuosa de los hidratos de carbono en las siguientes concentraciones finales: D.l inositol, alcoholes polihidroxiados y salicina, al 1 %; fenoles, al 0.1 % y sales de ácidos orgánicos, al 0.15 %.

Concluimos con los autores que el conocimiento en la utilización de compuestos de carbono en medios químicamente definidos, podría reportar una ayuda en lo que respecta a determinación de reglas para la identificación de los miembros del orden Actinomycetales, y en especial del género Streptomyces.

En 1955, Benedict y colaboradores (39) reseñaron los últimos estudios en la evaluación de ensayos de utilización de carbohidratos como ayuda en la diferenciación de especies de Streptomyces.

Los ensayos sobre la habilidad de varias especies de Streptomyces para utilizar ciertos hidratos de carbono individuales como sola fuente carbonada en un medio sintético, fueron primero realizadas por Waksman (40) y subsecuentemente por Pridham y Gottlieb (38) quienes estudiaron 27 cultivos de Streptomyces, Nocardia y Micromonospora para probar su habilidad en la utilización de 33 distintas fuentes de carbono, en un medio químicamente definido.- Encontraron que todos los cultivos utilizaban D.glucosa, D. manosa, almidón, dextrina y glicerol, pero que no usaban eritrol, fenol, o cresol, formiato de sodio, oxalato de sodio o tartrato de sodio. Las sustancias remanentes fueron atacadas por algunas especies pero no pudieron ser utilizadas por otras.

Verificando unas pocas cepas, cuatro años más tarde (41) Pridham, Hall y Shekleton, encontraron que los patrones de asimilación no habían sufrido cambios considerables. Ciertos investigadores japoneses, incluyendo a Kurosawa (42) y Okami (43) han utilizado la técnica de asimilación de hidratos de carbono como auxiliar en la identificación de varios Streptomyces productores de antibióticos.

Dulaney (44) ensayó una cepa de Streptomyces griseus, en cuanto a su habilidad para iniciar el desarrollo sobre 49 hidratos de carbono, azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos.-

En el trabajo de Benedict y colaboradores (39) se ensayaron un gran número de cepas, así como algunas fuentes carbonadas no usadas previamente por Pridham y Gottlieb (38). Fueron utilizadas con este fin alrededor de 75 especies distintas de Streptomyces, variando el número de cepas de cada especie entre 1 a 8. Además se incluyeron 52 cultivos de cepas únicas de varias especies.

Aunque no parece justificable presentar los datos de utilización de carbohidratos en cepas únicas de cada especie, parecería notarse que no hay exacta duplicación en los esquemas de utilización de las 52 especies representadas por cepas únicas.

Además no encontraron duplicación para dos cualesquiera de las 75 especies estudiadas

Infieren los autores que hay suficiente variación en los esquemas de asimilación de carbono como para que dichos ensayos sean promisorios como una ayuda en la diferenciación de especies de Streptomyces.

Aunque no han sido hechas comparaciones críticas, es interesante notar que la trehalosa permite la formación de micelio aéreo en el medio basal en dos cultivos que no lo producen sobre las otras 23 fuentes de carbono, ni en los medios de avena, asparagina - glucosa-agar, Bennett, Emerson, Kelner, Morton y Czapek.

En una evaluación de sales de ácidos orgánicos, Pridham y colaboradores (41) encontraron que la sal de sodio del ácido cítrico parece más promisoria que la sal de sodio del ácido succínico. Observaron que poco o nada de desarrollo fue alcanzado en 36 especies de Streptomyces sobre formiato de sodio, oxalato de sodio o tartrato de sodio, pero que prácticamente todas las cepas pueden utilizar el citrato de sodio. De los carbohidratos estudiados la L_ sorbosa no es atacada por ninguna especie de Streptomyces, y en cuanto al eritrol y a la maltosa, se encontró que tienen valor limitado en estos ensayos. Se obtuvieron también resultados relativamente pobres sobre melicitiosa, sorbitol y esculina.

En 1953, Waksman y Lechevalier (14) publican en "Actinomycetales and their antibiotics" una guía para la identificación y clasificación de dichos organismos y de los

antibióticos por ellos producidos. Clasifican a ciertos grupos importantes de especies de Streptomyces desde el punto de vista de la producción de antibióticos.

Dos de los grupos seleccionados para esta comparación son típicamente cromógenos, siendo capaces de producir pigmentos solubles que oscilan entre el marrón y el marrón oscuro o casi negro. Estos pigmentos se producen en medios con proteínas, debidos principalmente a la formación de la enzima tirosinasa (S. antibioticus y S. lavendulae). Otro de los grupos no es cromógeno, aunque produce un debil pigmento soluble, color marrón, sobre ciertos medios; este pigmento puede deberse a la lisis del desarrollo y en algunas cepas, o bajo ciertas condiciones, es verde oliva (S. griseus) Otro grupo, que comprende un gran número de especies, se caracteriza por el desarrollo amarillo sobre varios medios y la subsiguiente producción de un pigmento soluble amarillo, anaranjado, dorado, o amarillo verdoso (S. flavus).

Los grupos 5 y 6, que no son cromogénicos, se caracterizan por la producción de un crecimiento entre rojo a rojo-naranja y rojo claro, con un micelio aéreo pobremente desarrollado entre blanco y blanco rosado o con micelio aéreo rosado, bien desarrollado (S. ruber y S. fradiae).

Finalmente, fue agregado un grupo en razón de su distribución universal, su fácil reconocimiento y por el hecho de incluir la especie típica del género Streptomyces (S. albus).

Además del género Streptomyces, los autores analizan el género Nocardia, con la clasificación de Krassilnikov y la de Waksman y Henrici; el género Micromonospora, con los sistemas de Krassilnikov y de Jensen; el género Thermoactinomyces, y finalmente el género Actinomyces, incluyendo una descripción de especies de todos los géneros mencionados.-

En 1958, Pridham y colaboradores (45) proponen una acabada guía para la clasificación de Streptomyces en grupos selectivos.

En el trabajo se recalca la conveniencia de la cuidadosa evaluación, mantenimiento y conservación de las cepas de interés, antes de asignarles nuevos nombres. Los re-

sultados de estudios de Pridham y colaboradores de descripciones de cepas originales, indican claramente que algunos investigadores han ignorado los tratados taxonómicos, faltando el conocimiento de las técnicas ideales adecuadas para la evaluación de estas formas.

Han intentado seguir un esquema lógico y práctico para postular un sistema de clasificación de acuerdo con el Código de Nomenclatura Botánica.

Formalizaron la creación de cuatro de las secciones propuestas con inscripciones latinas, e incluyeron 3 secciones adicionales no formalizadas aún en 1958.

La dificultad encontrada en identificar cepas desconocidas de Streptomyces, estriba principalmente en que las claves están basadas casi exclusivamente sobre criterios morfológicos. Haciendo una reseña cronológica de las mismas veremos que:

- 1) La clasificación de Krainsky (46) se basa en la medida de colonias y de esporos, proponiendo dos grupos principales.
- 2) La de Waksman y Curtis (47) se apoya en criterios de proteolisis y formación de pigmento soluble, postulando cuatro grupos principales.
- 3) El esquema de Dreschler (48), referido a morfología de esporóforos, no incluye grupos definidos.
- 4) El de Waksman (49), basado en la formación de pigmento soluble, separa a los Streptomyces en dos grupos.
- 5) Millard y Burr en 1926 (50), basaron su clasificación sobre el desarrollo característico en soluciones sintéticas glicerinadas, proponiendo cinco grupos.
- 6) Jensen, en 1930 (51) postuló dos grupos en base a la formación de pigmento soluble.
- 7) En 1934, Duché (52) estudiando características culturales, separó los Actinomycetes en varias clases y grupos.
- 8) Waksman y Henrici, en 1948 (53) los separan en cuatro grupos basándose en la ecología y requerimientos de temperatura.
- 9) Krassilnikov, en 1949 (54) se basa para su esquema en la morfología de esporóforos, proponiendo dos grupos principales.

10) La clasificación de Baldacci y colaboradores, presentada en 1953 (55) y perfeccionada en 1954 (56) se funda en el color del micelio vegetativo, separando los Streptomyces en dos grupos.

11) En 1954, Hesseltine y colaboradores (57) basaron su clasificación en el color de las esporas y la morfología de los esporóforos, determinando ocho grupos principales.

12) En el esquema de Yagamuchi y Saburi, en 1955 (58) encontramos cuatro grupos separados de acuerdo con la morfología de los esporóforos.

13) Ganze y colaboradores (59), en 1957, fundaron su esquema de clasificación en quince grupos, en el color del micelio aéreo y en el color del micelio vegetativo.

La mayor seguridad sobre criterios fisiológicos para agrupar y distinguir especies del género Streptomyces, ha llevado a la creación de un gran número de "especies nuevas" (más de 100 desde el descubrimiento de la actinomicina en 1946). Esta tendencia continuará en tanto sean aislados nuevos antibióticos u otros productos metabólicos interesantes, a menos que la seguridad se refiera a características taxonómicas más constantes. Esta continua adición de nuevas especies es sorprendente si se considera la marcada diversidad fisiológica demostrada por este género. En realidad, muchas de las nuevas especies no son más que variedades o formas fisiológicas de una variedad ya descripta.

Poniendo énfasis en la morfología de los Streptomyces, el concepto de grupo, basado previamente en criterios fisiológicos, puede tener un fundamento más estable. Además, puede lograrse, reevaluando los muchos ensayos fisiológicos actualmente aplicados, una posterior diferenciación de las cepas dentro de cada "sección morfológica", y seleccionando para la aplicación de rutina los ensayos que parezcan ser más útiles.

Según Pridham y colaboradores (45), la morfología de los esporóforos de una cepa particular no cambia apreciablemente variando los medios substratales, siempre que en los mismos haya formación óptima de micelio aéreo y de esporas. Aconsejan apreciar la morfología de los esporóforos por observación directa en placas de Petri con aumentos de 100 x a 500 x. Con aumentos mayores pueden verse claramente los detalles de las ca

denas de esporos.

Los métodos y medios recomendados para determinar la morfología de esporóforos ya han sido registrados (Ver Sección 3, cita (36) y apéndice).

El género Streptomyces puede dividirse en varias "secciones morfológicas" distintas. Para ello se cultiva la cepa en estudio sobre agar Czapek, medio de Hickey.-Tresner y medio de pasta de tomate-avena, haciendo observaciones morfológicas después de dos semanas de incubación a 28-30°C. Si queda alguna duda razonable con respecto a la ubicación de la cepa en la sección apropiada, o si se requiere una caracterización más completa, puede subcultivarse en los siguientes medios conteniendo agar: Bennett, almidón-sales inorgánicas, extracto de levadura, pasta de tomate, papa glucosada, harina de avena (Carvajal) y asparagina-glucosa.

Basándonos en el color de las esporas, más precisamente en el color del micelio aéreo esporulante, podemos subdividir posteriormente en series a cada una de las secciones morfológicas. Cada serie puede ser probablemente subdividida luego en grupos de formas estrechamente relacionadas, que representan especies, utilizando criterios fisiológicos. Si fuera necesario podría entonces usarse una determinación adicional para crear "variedades" o "formas fisiológicas".

Considerando la variedad de entidades morfológicas que existen en el género Streptomyces se ha sugerido (45) un esquema filogenético para la evolución de los distintos tipos a partir de un antecesor común caracterizado por estructuras reproductivas extremadamente simples, partiendo de un tipo de hifas rectas hasta llegar a las formas fasciculadas con espirales abiertos y biverticiladas con espirales. Puede inferirse de ahí una explicación para las anomalías que han sido encontradas ocasionalmente en varias especies.

Por ejemplo, pueden observarse en algunos casos, en un cultivo aislado, esporóforos rectos, entrelazados y en curvas abiertas simultáneamente. Estas cepas podrían representar formas evolutivas "intermediarias" o de "transición" de los tipos rectos o flexuosos. Este esquema filogenético es meramente especulativo y se incluye a los

efectos de definir claramente el sistema propuesto por Pridham y colaboradores.

En efecto, los autores citados proponen la subdivisión del género Streptomyces en siete secciones morfológicas de acuerdo con la taxonomía de los esporóforos.

Además han subdividido cada sección en seis series basadas en el color de las esporas (color del micelio aéreo esporulante maduro)

En el mismo sistema han sido incluidas tres secciones provisionarias para que sirvan de orientación al lector.

Las secciones han sido formalizadas con designaciones latinas.

Cada descripción de las secciones incluye una guía provisoria para las series y especie componentes y para las cepas individuales.

La mayoría de las especies de importante valor económico por su poder productor de antibióticos están tabuladas en la guía.

Krassilnikov (60), en 1960, aconseja nuevamente el uso de propiedades culturales, morfológicas y fisiológicas como una base para el reconocimiento de especies, revelando la heterogenicidad de las mismas por los grupos pigmentados en la gama de los verdes, los rosa-rojo y los naranja.

Aconseja la ayuda de propiedades fisiológicas para diferenciar especies dentro de cada grupo. En este caso podrían subdividirse convenientemente las especies de acuerdo con la asimilación de carbohidratos, usando los métodos de Kurosawa (42) y Pridham. Gottlieb, en 1959 (61) puntualiza las dificultades en los sistemas de clasificación, debidas al gran número de criterios interpretados de diversas maneras por cada uno de los investigadores, a las dificultades para reproducir algunos medios, a la ausencia de muchos cultivos tipo y a los cambios y variabilidad en los cultivos, proponiendo la discusión de los criterios en lo que respecta a características morfológicas, olores característicos, desarrollo en función de la temperatura, características metabólicas, serología y fago especificidad.

Küster, también en 1959 (62) presenta el protocolo de la mesa redonda sobre Streptomyces, efectuada en ocasión del 7º Congreso Internacional de Microbiología, realizado en Estocolmo entre el 4 y 5 de agosto de 1958.

Horvath, de Hungría, refirió la gran variedad que existe entre los Streptomyces. Esto podría atribuirse parcialmente al menos a la heterokariosis. Este fenómeno consiste en la presencia de varios núcleos de diverso origen en un micelio común. En la formación de esporos cada "conidio" recibe sólo uno de los varios núcleos, de manera que las colonias derivadas de este "conidio" exhiben propiedades diferentes entre ellas mismas, así como de los cultivos relacionados.

Frommer, de Alemania, observó que ciertas características podían permanecer constantes dentro de un grupo, pero variar en otro. Esto conduce a la ineptitud para clasificar una característica dada como estrictamente constante o como variable. Además, sugirió el examen del color del micelio substratal y de los pigmentos solubles, suplementado por el uso de ensayos químicos elementales (solubilidad de los pigmentos en diferentes solventes, cambios del color con el pH, etc.)

Pfennig, también de Alemania, considera la importancia, desde el punto de vista de las investigaciones ecológicas, del uso de una clasificación basada en la morfología. Después, de Francia, hace notar el serio defecto, en los últimos trabajos, de considerar esencialmente sólo los organismos productores de antibióticos. Considera a la morfología y al color del micelio aéreo como las propiedades más importantes para la caracterización.

Krassilnikov, de Rusia, complementa sus primeras comunicaciones, recordando que especies que antes se consideraban uniformes se dividen ahora en varias especies, basándose la diferenciación de las mismas principalmente sobre la producción de diferentes antibióticos.

Hizo referencia al fenómeno, que los organismos que producen antibióticos no están usualmente influidos por sus propios productos. En consecuencia, es posible a veces clasificar los productores de antibióticos ensayando uno contra otro. Esta regla, sin embargo, no es válida en todos los casos, porque hay algunas especies que se inhiben a sí mismas. Krassilnikov considera también la importancia del criterio morfológico para la caracterización de las especies.

Gottlieb, de los Estados Unidos, analiza los temas de discusión presentados por él anteriormente (61) como la dificultad para reproducir algunos medios, la discusión de criterios y el concepto de especie.

En cuanto al primer tópico, se aconseja para la elección de un medio de cultivo para Streptomyces, diferenciar los substratos usados para mantenimiento de aquellos empleados exclusivamente para caracterización. Ettlinger, de Suiza, preconiza que los medios para mantenimiento deben permitir esencialmente un desarrollo satisfactorio del micelio aéreo.

Una de las dificultades esenciales para la preparación de los medios estriba en la diferencia en la constitución de los componentes entre un laboratorio y otro.-

En cuanto al punto que se refiere a discusión de criterios, fueron establecidas las siguientes características.

1) CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

a) Colonia: Es aconsejable para la caracterización la consideración de la morfología general de las colonias. Para cepas que no forman micelio aéreo sobre ningún medio, debe apreciarse la naturaleza del micelio substratal.

b) Micelio: Como resultado de discusiones previas respecto a la manera de designar el micelio, fueron establecidas las siguientes definiciones:

Micelio substratal: La totalidad de las hifas que desarrollan en el agar o en la solución.

Micelio aéreo: La totalidad de las partes del micelio que se elevan por encima de la superficie del substrato.

Micelio vegetativo: La totalidad del micelio que no está dividido en esporas (micelio substratal más las partes estériles del micelio aéreo).

Esporóforos: Las partes del micelio divididas en esporas.

En general, la morfología del micelio substratal no juega un papel importante en la descripción de las cepas.

c) Estructura de esporóforos: Hubo un completo acuerdo sobre la importancia de la des

cripción de la morfología del micelio aéreo. La división en siete tipos morfológicos, que fue sugerida por Pridham y colaboradores (45) fue discutida y recomendada para su aplicación general. Baldacci, de Italia, sugirió algunos cambios mínimos, entre otros:

	<u>Pridham</u>	<u>Baldacci</u>
<u>Sectio</u>	{ recto - - - - - flexuoso fasciculado	recto
<u>rectus</u>		
<u>flexibilis</u>		flexuoso
<u>Sectio retinaculum apertum</u>	{ espirales primitivas curvas abiertas - - - - -	curvas abiertas
<u>Sectio spira</u>	{ espirales abiertas espirales cerradas - - - - -	espirales

Kutzner, de Alemania, llamó la atención sobre la disposición de las espirales sobre el micelio aéreo, así como la forma y número de arrollamientos espiralados. La constancia en la dirección de rotación (diestro, siniestro), no se consideró esencial para la clasificación.

d) Método de formación de esporas: Se hizo una diferenciación entre segmentación y fragmentación como método en la formación de esporas. Dentro del género Streptomyces, se considera generalmente que la esporulación se produce por fragmentación, mientras que la segmentación es típica de las Noocardia. El método de formación de esporas debe usarse más para la diferenciación de estos géneros que para la determinación de especies.

e) Morfología de los esporos.

La observación de los esporos mediante microscopía óptica o por contraste de fase, permite un reconocimiento demasiado limitado de las diferencias que podrían usarse como criterio de referencia en la identificación de especies.

Con el uso del microscopio electrónico fueron puestas en evidencia por primera vez,

incuestionables diferencias morfológicas de los esporos. Pudo reconocerse los detalles de la superficie fina de los mismos (lisa, espinosa, vellosa), considerándose una característica muy constante, así como una importante propiedad para la caracterización.

Se recomendó el uso de un medio que favorezca una buena formación de micelio aéreo y de esporas, dado que en un medio inadecuado pueden desaparecer los apéndices característicos. La preparación debe efectuarse por el método de impresión, porque las esporas pueden perder sus apéndices por suspensión.

La descripción de los esporos como se aprecian al microscopio electrónico, se considera esencial para una adecuada determinación de especies. Sin embargo deben reconocerse las dificultades que implica el uso de esta característica, dado que el microscopio electrónico está fuera del alcance de muchos centros de estudio.

2) Colores característicos.

Los tres componentes del cultivo de Streptomyces, micelio aéreo, micelio substratal y el substrato en sí (medio de cultivo) suelen desarrollar colores que pueden ser útiles en la clasificación.

a) Color del micelio aéreo: El color del micelio aéreo fue definido como el color del mismo en su etapa de madurez, sobre un medio de cultivo óptimo para la producción de micelio aéreo y de esporas. Este color se considera generalmente como una constante, y su descripción es esencial para la caracterización.

Baldacci sugirió que además de la descripción en la etapa de madurez, deben evaluarse las etapas intermedias. Basándose en una observación del cambio de color del micelio del S. griseus por acción de vapores de yodo, de Vries, de Holanda, encaró la posibilidad de caracterizar el micelio aéreo por reacciones químicas.

b) Color del micelio substratal: Esta apreciación del color se considera menos importante, dado que es más variable que el color del micelio aéreo y en muchos casos no es característico. En aquellas cepas que muestran un color característico del micelio substratal, puede ser interesante registrarlo. En tales casos debe especificarse

la dependencia del color con la composición y el pH del medio.

c) Color del medio: El color del medio, también llamado a menudo pigmento soluble, no presenta importancia, salvo contadas excepciones, dado que, o no es característico, o cuando está notablemente pigmentado tiene el mismo color del reverso del micelio substratal, aunque menos intenso.

Además, se ha observado que es más variable que el del micelio substratal. Después de varios pasaje puede frecuentemente perderse la pigmentación del medio, pero según Wallhäuser puede regenerarse mediante un solo pasaje por suelo. Debe puntualizarse que el color del micelio no incluye la pigmentación melanoidea de un cultivo conteniendo peptona. Además debe hacerse una distinción entre "pigmento" y "color". Krassilnikov definió estos términos como sigue: Pigmento: es el producto metabólico, químicamente uniforme, que puede ser extraído y que no está sujeto a cambios por factores externos. Por ejemplo los tres tipos de pigmento del S. violaceus, una antocianina, un carotenoide y un lipocromo.

Color: está sujeto a la influencia de factores externos en el cultivo, como trazas de elementos, valores de pH, etc. Para terminar digamos que debería anotarse siempre el color del micelio aéreo maduro (esporas en masa).

En algunos casos puede registrarse también el color del micelio substratal u, ocasionalmente, el color del medio, describiendo para el último el medio específico, los cambios de pH y demás datos similares.

3) Desarrollo en función de la temperatura.

La mayoría de los Streptomyces son mesofílicos y tienen requerimientos muy semejantes en cuanto a temperatura.

Sólo en los casos en los cuales la temperatura óptima es muy superior a la de las especies mesofílicas, puede usarse este dato como una característica en la diferenciación de especies.

4) Características metabólicas.

a) Producción de ácido sulfhídrico: no se considera necesario este ensayo.

b) Reducción de nitratos: A pesar de la experiencia un tanto limitada al respecto, este ensayo representa una buena característica, siendo en consecuencia recomendado.

c) Licuación de gelatina: Se observaron diferencias únicamente en el grado de licuación. Esta prueba es aplicable para la descripción sólo cuando es notable el tiempo en que comienza la licuación.

d) Peptonización de la leche

Este ensayo parece depender en gran medida de las condiciones externas del experimento. Por ejemplo, de Vries observó la influencia de la temperatura y tiempo de esterilización de la leche, así como del origen de la misma, en el grado de peptonización. El resultado puede depender también del tamaño del inóculo.

Otra dificultad es la variabilidad en la descripción de los resultados. Dadas las dificultades de llevar a cabo este ensayo en medio líquido, se sugirió el uso de agar leche o, en algunas circunstancias, de agar caseína.

También se recomendó el uso del método de Gorin, que consiste en cubrir los cultivos viejos en agar con una capa de leche. De esta manera se observa mucho más frecuentemente la coagulación, en comparación con el procedimiento usual en tubos de ensayo. Pese a todas las dificultades enunciadas se considera que este ensayo tiene cierto valor siempre que se efectúe el experimento en condiciones tipificadas.

e) Utilización de carbohidratos.

1) Sanchez Marroquín (de Méjico), Wallhäuser y Pfenning, de Alemania y Pinnert y de Vries, de Francia, entre otros, recomendaron esta prueba como útil, pero limitándola a unos pocos carbohidratos, dado que muchos resultados no son reproducibles.

2) Hütter, de Suiza y Ciferi, de Italia, rechazaron completamente este ensayo basándose en sus propios estudios. Hütter, por ejemplo, encontró que esporos aislados de una única cepa poseían diferente espectro de asimilación de carbono.- Pinnert, por otra parte, encontró que después de una reacción rotulada como negativa aparecían colonias individuales positivas que designó como mutantes. Además Giolitti encontró que algunas cepas desarrollaban en el medio basal sin la adición de carbohidratos.

3) En cuanto a la metodología del ensayo, se hizo notar que puede efectuarse el mismo ya sea en agar, en medio líquido o en cultivo sumergido.

Los cultivos flotantes han dado resultados poco satisfactorios - Wallhäuser utilizó con éxito el cultivo sumergido, encontrando que la cantidad de micelio puede determinarse cuantitativamente por centrifugación.

A pesar de los comentarios críticos, el uso de los ensayos de utilización de hidratos de carbono, fue recomendado para la caracterización de cepas.

f) Utilización de nitrógeno: Los resultados que se tienen hasta el momento son demasiado escasos para dar opinión concluyente sobre el mismo.

g) Producción de antibióticos: Por las razones que se exponen a continuación se rechazó la producción de antibióticos como criterio para la caracterización de especies:

1) Esta propiedad no se considera constante, dado que en las condiciones de laboratorio puede perderse frecuentemente la formación de antibióticos.

2) Hay numerosas especies de Streptomyces que contienen tanto cepas inactivas como cepas capaces de producir antibiótico.

3) En varios casos una sola cepa forma más de un antibiótico.

4) Un mismo antibiótico puede ser formado por diferentes especies. Kutzner estableció que en muchos casos cepas muy similares en cuanto a sus características morfológicas y culturales sobre diferentes medios, exhiben también un espectro antibiótico correspondiente, contra cinco diferentes organismos de prueba. Sobre la base de esta observación, concluyó que podía utilizarse el espectro antibiótico para la clasificación de subgrupos.

Debe especificarse que el espectro antibiótico sólo es útil para la descripción de una cepa, pero no para la definición de especies.

h) Sensibilidad a los antibióticos. Hasta la fecha existe una experiencia muy limitada con este ensayo. Krassilnikov lo usa para fines de diagnóstico.

5) Serología.

Los miembros presentes en el 7º Congreso de Microbiología de Estocolmo, no tenían experiencia en este método de investigación.

6) Fago especificidad

Kutzner realizó investigaciones con cinco fagos diferentes en su grupo I, correspondiente aproximadamente al grupo griseus.

Dos fagos demostraron ser bastante específicos, esto es, sólo unos pocos subgrupos de Streptomyces fueron sensibles a ellos; los otros tres, entre ellos el fago específico contra el S.griseus, tenían un espectro muy amplio. Esta diferencia en la especificidad de los actinofagos puede ser considerada en cuanto a la evaluación de su utilidad en el diagnóstico de Streptomyces. Baldacci ha hecho estudios con fagos específicos solo contra el grupo griseus, pero no para las otras series de su clasificación.

Especificación

Baldacci presentó un diagrama que resume su concepción de las características sugeridas para una división de especies y cepas.

Para la determinación de especies recomienda basarse en la estructura de esporóforos, color del micelio vegetativo, color del micelio aéreo y morfología de los esporos (microscopía electrónica)

En cuanto a los caracteres infraespecíficos, propone características metabólicas, pigmentos solubles y, con reservas, la producción de antibióticos.

Welsch, en 1959 (63), presentó una nota referente a la clasificación de Streptomyces. Dado que cualquier característica aislada de un microorganismo puede variar dentro de límites más o menos amplios, considera que es importante analizar un gran número de caracteres diferentes, y preferentemente aquellos que la experiencia ha mostrado menos variables.

Estudió personalmente la producción de antibióticos, encontrando que esta propiedad tiene un valor secundario únicamente, dado que está sujeta a variaciones cuantitativas aparte del hecho que un dado antibiótico puede ser producido por organismos no relacionados entre sí.

En cuanto a la sensibilidad a los antibióticos, encuentra que esta propiedad puede ser más útil. Se admite que pueden obtenerse mutantes resistentes a cualquier antibiótico mediante técnicas apropiadas. Sin embargo, la aparición de tales mutantes y su selección bajo condiciones naturales (por ejemplo en ausencia de manipulaciones de laboratorio), no es tan frecuente que ocurra en grado tan apreciable.

En lo que se refiere a la producción de actinofagos lisogénicos, encontramos en la literatura que muchos actinofagos tienen un espectro de actividad muy amplio. Sin embargo, Bradley y Anderson (64) demostraron mediante fagos, la afinidad de especies colocadas en dos géneros, Streptomyces y Nocardia, incluidas en dos familias diferentes.

Por otra parte son también conocidos actinofagos con un rango de actividad mucho más restringido.

Un grupo de fagos mostró actuar exclusivamente sobre cepas pertenecientes al grupo S. griseus (65) y (66) según fue definido por Ettliger y colaboradores (67).

Uno de los virus actuaba (68), aunque con diferencias cuantitativas, sobre todos los organismos ensayados del grupo (pero uno probó ser una cepa lisogénica portadora de un profago relacionado).

No tuvieron acción, excepto en pocos casos, sobre Streptomyces no relacionados, aún empleando altas concentraciones.

Se considera que la fago sensibilidad y los portadores de profagos (69) y (70), son propiedades que podrían ayudar a los taxonomistas. Sin embargo queda mucho por hacer en cuanto al ordenamiento de una metodología apropiada.

Debe hacerse notar que la mayoría de los actinofagos hasta ahora conocidos, actúan sobre el grupo griseus.

Antes de dar una opinión definida sobre el uso de fagos, deberían obtenerse fagos para Actinomycetes no relacionados (71).

Trabajos recientes han mostrado claramente que pueden obtenerse heterokarios y más raramente verdaderos híbridos, por apareamiento de dos cepas mutantes diferentes de un Streptomyces.

Hütter (72) propuso el uso de cuatro grupos de caracteres para la individualización y diferenciación de especies, a saber:

- a) Morfología de las esporas bajo microscopio electrónico.
- b) Color del micelio aéreo.
- c) Morfología del micelio aéreo
- d) Habilidad para formar pigmento melanoideo en medios conteniendo peptona.

En cuanto al punto a), si bien es la característica principal, reviste significación. Es importante observar si el esporo es liso o si tiene apéndices, y en tal caso notar las formas específicas (vellosa, espinosa, etc.), ya que estas formas son también constantes.

b) Hütter distingue los siguientes grupos de colores:

- niveus - - - - - (blanco nieve)
- griseus - - - - - (gris-verdoso-amarillento)
- azureus - - - - - (azul)
- cinnamomeus - - - - - (cinamón - rosa)
- cinereus - - - - - (gris)
- prasinus - - - - - (verde)

No se encontró demasiado práctica la determinación del color mediante tablas, dado que no se puede indicar el rango total del color. Hütter tomó como patrón para cada grupo de colores a cepas tipo de colecciones de cultivos, que mostrarán una buena formación de micelio aéreo y que poseyeran determinado color en un matiz típico.

c) El sistema de definición de la morfología de los esporóforos es en principio similar al sistema de Pridham, Hesseltine y Benedict (57). Pero mientras estos autores agrupan varios tipos en la misma sección, Hütter reconoce cada tipo como una unidad equivalente.

Es importante para el reconocimiento del tipo de morfología del micelio aéreo la presencia o la ausencia de ejes medios estériles, de los cuales ramifican las cadenas de esporos fértiles; la forma de ramificación (simpodial - monopodial); la habilidad o

la inhabilidad para formar penachos (debe notarse que el autor no los separa en penachos simples y dobles); la capacidad o la incapacidad para formar espirales y la clase de estos espirales (abiertos-cerrados, regulares-irregulares).

d) Hütter posee un método por el cual se pueden distinguir fácilmente los tipos cromogénicos de pigmento melanoideo.

De todas las posibles combinaciones de caracteres, se encontraron en la práctica sólo un pequeño número. Así, por ejemplo, los colores griseus y cinnamomeus están siempre asociados con esporos lisos, y las cepas con micelio aéreo de los colores azureus o prasinus, tienen esporos con vellosidades u espinas. Todas las cepas con apéndice en sus esporos muestran formaciones espiraladas en el micelio aéreo y finalmente todas las cepas con micelio aéreo del tipo griseus tienen penachos simpodiales con ramas flexuosas en el micelio aéreo.

Como resultado de estas conclusiones fueron agrupadas un número de cepas en especies. Concluyendo, se considera de primordial importancia para la sistemática del género Streptomyces: a) la determinación de especies con ayuda de cepas tipo provenientes de colecciones oficiales y b) la caracterización de especies empleando sólo caracteres estables.

Küster (73) en la nota preliminar presentada ante el 7º Congreso Internacional de Microbiología (Estocolmo), hizo notar la necesidad de establecer un sistema único para la clasificación de Streptomyces y la creación de una colección de cultivos tipo para este género.-

Krassilnikov (74), presentó en el mismo Congreso un somero análisis de los problemas para la clasificación de Streptomyces.

Wallhäuser (75), con la ayuda de una tabla de clasificación, estudió la forma de los esporos, el color del micelio aéreo y del vegetativo, el pigmento soluble, la producción de antibióticos y los espectros de utilización de carbono y nitrógeno.-

Kutzner (76), en una reseña de los conocimientos sobre la sistemática de los Streptomyces, señaló la importancia del color del micelio aéreo, considerando que es tan ca-

racterístico que puede permitir por sí solo un primer agrupamiento de los microorganismos en estudio.

Waksman (77) analizó los factores de importancia en la clasificación de Actinomycetes. Considera que debe darse prioridad al reconocimiento de géneros y especies, estimando de importancia secundaria la ubicación en grupos característicos.

Divide el orden de los Actinomycetales en tres familias: Actinomycetaceae, Streptomy-
cetaceae y Actinoplanaceae, con diez géneros en total, de cuardo con el siguiente es-
quema:

A) Formación de esporos pero no en esporangios.

I. Micelio substratal fragmentado en elementos bacilares o cocoides.

Familia I - Actinomycetaceae - Buchanan

1) Anaerobios o microaerófilos, parásitos, sin ácido resistencia. 1 - Actinomyces - Harz.

2) Aerobios, algunos parásitos, parcialmente ácido resistentes o sin ácido resistencia.

2 - Nocardia - Trevisan

II. Micelio substratal sin septar, no fragmentado en elementos bacilares o cocoides.

Familia II - Streptomycetaceae - Waksman y Henrici.

1) No producen micelio aéreo.

a) Esporos únicos formados sobre cortos esporóforos.

a₁ - Formas mesofílicas

3 - Micromonospora - Orskov

b₁ - Formas termofílicas

4 - Thermomonospora - Henssen

2) Producen micelio aéreo.

a) Formación de esporos en cadenas, formas mesofílicas y termofílicas.

5 - Streptomyces - Waksman y Henrici

b) Esporos únicos; formas termofílicas.

6- Thermoactinomyces - Tsiklinsky

c) Esporos formados en pares.

a₁ - Formas mesofílicas.

7 - Waksmania - Lechevalier y Lechevalier

(Microbiospora - Nonomura y Ohara)

b₁ - Formas termofílicas

8- Thermopolispora - Henssen

B) Esporos formados en esporangios.

Familia III - Actinoplanaceae - Couch

I - Micelio aéreo usualmente ausente; sin conidióforos en espiral, esporangióforos móviles.

9 - Actinoplanes - Couch

II - Micelio aéreo abundante; conidióforos en espiral así como los esporangios formados en algunas especies, esporangióforos sin movilidad.

10 - Streptosporangium. Couch

En cuanto al problema de la diferenciación de especies, especialmente dentro del género Streptomyces, Waksman aconseja tener en cuenta principalmente criterios morfológicos y culturales. Algunas características bioquímicas ofrecen información suplementaria. Estas propiedades se resumen a continuación:

- 1) La morfología incluye la estructura de la colonia y del micelio substratal, la naturaleza del micelio aéreo o superficial y el modo de esporulación; la medida, forma y estructura superficial de los esporos.
- 2) Las propiedades culturales, incluyen desarrollo característico sobre ciertos medios orgánicos y sintéticos. Se usan principalmente los medios sólidos. Los medios líquidos no ofrecen demasiada información suplementaria. Son más importantes la pigmentación del micelio aéreo y del substratal o vegetativo, la formación de pigmentos solubles, la actividad proteolítica, la licuefacción particular de gelatina y la proteolisis y coagulación de la leche, así como el desarrollo sobre papa y sobre otros medios seleccionados.

3) La actividad bioquímica incluye, además de lo dicho más arriba, la inversión de sacarosa, las propiedades diastásicas y reductoras, la utilización de diferentes fuentes de carbono y la formación de antibióticos.

4) La sensibilidad a fagos específicos y, en alguna extensión, las reacciones serológicas, ofrecen características especiales adicionales.

5) Deben adoptarse medios standard para propósitos de caracterización. Esto comprende tanto los medios sólidos sintéticos bien definidos como los medios sólidos orgánicos cuidadosamente seleccionados y los medios líquidos.

Para propósitos de caracterización de especies, deberían ser constantes las condiciones de desarrollo.

6) Para el establecimiento de cepas o variedades de organismos, dentro de especies aisladas, deberían también reconocerse ciertas características importantes. Estas se basan usualmente en variaciones morfológicas y culturales, en la habilidad para producir sustancias de importancia económica, tales como vitaminas, enzimas y antibióticos y en otros, propiedades como resistencia cruzada y sensibilidad a fagos y a antibióticos.

7) Los cultivos tipo deberían preservarse adecuadamente, depositarse en colecciones de cultivo reconocidas, y poder obtenerse por todos los investigadores del mundo.

8) Ninguna publicación científica debería aceptar contribuciones en las cuales se postule una especie nueva o sin una descripción apropiada del organismo en un lenguaje internacional reconocido o referido a una descripción previamente publicada y sin el depósito previo en una colección oficial de cultivos.

Desde los primeros tiempos del estudio de los Actinomycetes, se reconoció que algunas de las formas, que ahora se clasifican dentro del género Streptomyces, representan grupos de organismos más que especies únicas.

Cualquier sistema de clasificación de un grupo tan variado de organismos como son los Streptomyces, debe reconocer la continuidad entre las diferentes especies.

Deben admitirse las formas de transición, que podrían servir para llenar los claros

que existen entre las cepas individuales. Deben considerarse además de las propiedades morfológicas y culturales, las propiedades ecológicas, la anaerobiosis vs. aerobiosis, patogenicidad frente a saprofitismo, y termofilia vs. mesofilia. También deben tenerse en cuenta las actividades fisiológicas, incluyendo utilización de carbono y nitrógeno y finalmente las actividades bioquímicas, tales como formación de antibióticos, enzimas y vitaminas. Todas estas propiedades pueden utilizarse como características suplementarias para describir especies y variantes de Actinomycetes. Waksman (77) dió al respecto una serie de recomendaciones. Entre otras propone utilizar una combinación de propiedades ecológicas, morfológicas y algunas fisiológicas para caracterizar los géneros de los Streptomyces. Algunas de las propiedades morfológicas, culturales y fisiológicas pueden ser usadas para establecer grupos dentro de estos géneros.

Las propiedades culturales y bioquímicas se utilizan para caracterizar especies. Finalmente se presenta a los investigadores el problema del reconocimiento de variedades, pudiendo considerarse las mismas desde el punto de vista de las actividades bioquímicas específicas, tales como utilización de azúcares y producción de antibióticos.

Como nota complementaria Waksman analizó el apropiado uso de las palabras vernáculas "actinomyces" y "actinomycetes" y "streptomyces" y "streptomycetes".

Desde que Harz, en 1877, dió la primera descripción válida de un actinomycete, hubo considerable confusión en cuanto a la nomenclatura de este grupo de organismos. Hay ciertas razones para esta confusión: 1º) La estrecha similitud entre el nombre científico, Actinomyces y los nombres vernáculos "actinomyces" y "actinomycete", ha llevado a confusión a los investigadores en este campo. 2º) Especialmente desde 1943, cuando Waksman y Henrici propusieron el nuevo género Streptomyces, que incluye muchas, pero no todas las especies consignadas previamente en el género Actinomyces, la situación se hizo más confusa.

La reciente literatura sobre los actinomycetes, está repleta de ejemplos del uso de las palabras "actinomyces" y Actinomyces, siendo virtualmente imposible determinar

cuando el autor se refiere a todos los actinomycetes, al género Streptomyces o al género Actinomyces.

Para atenuar estas dificultades, Waksman propuso los siguientes postulados:

1 - El nombre "actinomyces" puede ser usado como la expresión vernácula sólo para los miembros del género Actinomyces. No deberán considerarse como sinónimo del singular "actinomycete" o del término plural "actinomycetes". Del mismo modo, "streptomyces" es el nombre vernáculo aceptable cuando se usa para referirse exclusivamente a los miembros del género Streptomyces.

2 - Los términos vernáculos "actinomycete" y "actinomycetes" pueden usarse apropiadamente incluyendo miembros de cualquiera de la totalidad de organismos pertenecientes al orden de los Actinomycetales, exclusivo de los Mycobacterium y Corynebacterium sin referirse a familias o géneros. Las palabras "streptomycete" y "streptomycetes" deberán limitarse a los miembros de la familia Streptomycetaceae.

Baldacci, en 1959 (78), proporcionó criterios para mejorar la clasificación de los Actinomycetes.

En lo que se refiere a características y reacciones, y su utilidad en la clasificación, analiza las mejoras logradas resumiéndolos como sigue:

a) Conocimiento de la estructura microscópica y particularidades de la estructura de los esporóforos. En este campo han contribuido Krassilnikov (54) Burkholder y colaboradores (79), Hesseltine y colaboradores (57) y Pridham y colaboradores (45).

b) Conocimiento de la forma de los esporos y de sus apéndices por microscopía electrónica. Relacionado con esto, deben mencionarse los trabajos de Kris (80); Küster (81), (82) y (83) y los de Baldacci y colaboradores (84), (85) y (86).

c) La elección de aquellos caracteres morfológicos que estén menos sujetos a variaciones o que no varíen en absoluto en relación con el uso de substratos culturales varios. En este campo han contribuido Baldacci y colaboradores (55) y (56), Flaig y Kutzner (87), Kutzner (88) y Hesseltine, Benedict y Pridham (57).

d) La producción de productos catabólicos y en particular antibióticos. Dado lo nu-

meroso de las contribuciones en este aspecto, mencionaremos sólo las de Waksman (14) y (89).

El problema mayor estriba en el método de utilización y el montaje adecuado de estos elementos para permitir un reordenamiento de la clasificación de los Actinomycetes. Han sido sugeridas soluciones para este problema, por investigadores aislados, pero las mismas están basadas generalmente en sus propios trabajos. Así, varios investigadores han creado nuevos géneros tales como Micromonospora (Nonomura y Ohara) (90), Streptosporangium y Actinoplanes (Couch) (91) y Thermomonospora, Thermopolyspora, Thermoactinomycetes y Pseudonocardia (Henssen) (92). Otros han preferido formar series, grupos o secciones más bien que géneros, como Baldacci y colaboradores (55) y (56), Flaig y Kutzner (87) y Pridham y colaboradores (45).

Por otra parte, la excesiva multiplicación de especies ha sido el principal trabajo de aquellos que han asumido la tarea de examinar los productos catabólicos tales como pigmentos y sobre todo antibióticos (93).

Un buen examen de la situación muestra la ausencia de un método claro y sistemático de clasificación para este grupo de microorganismos. A esto debe agregarse el hecho que de acuerdo con algunos investigadores, los Actinomycetes deberían considerarse como bacterias mientras que de acuerdo con otros son hongos.

Baldacci analizó también la selección de un medio apropiado, así como la jerarquía de las características a aplicarse en una clave de clasificación, proponiendo:

- a) La confirmación y la nueva formación de géneros utilizando la estructura microscópica de los esporóforos.
- b) La confirmación y nueva formación de especies utilizando caracteres morfológicos del micelio aéreo y vegetativo y el tamaño de los esporos bajo microscopio electrónico. Estas especies deberían reemplazar las actuales secciones o grupos.

Este propósito modificó los esquemas previos del autor (55) y (56).

- c) Agrupamiento sobre el nivel de variedades o clones de las descripciones de especies que utilizan caracteres bioquímicos, ecológicos, productores de antibióticos, etc.-

La nomenclatura de los géneros, especies y variedades debería seguir las reglas del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias y Virus y las Reglas Internacionales de Nomenclatura Botánica.-

Ciferri (94) hizo una distinción entre taxonomía sistemática y taxonomía clasificatoria de los Actinomycetales.-

La taxonomía sistemática (o sistemático) distribuye los microorganismos de un cierto rango considerando todas las afinidades, inmediatas o remotas y la probable herencia. Esta interrelación puede expresarse desarrollando un árbol filogenético. Esto constituye, ciertamente, una taxonomía "natural", que se hace más compleja con el progreso del conocimiento, pero que es bastante objetiva.

La taxonomía clasificatoria (o clasificación) distribuye los microorganismos de un cierto rango sobre la base de un reducido número de características fácilmente reconocibles, buscando divergencias o similitudes, y sin considerar relaciones o herencia. Estas afinidades o divergencias se expresan en claves. Es, por supuesto, una taxonomía artificial, simplificada y bastante subjetiva.-

La mayor parte de las taxonomías son una mezcla de ambas, pero la etapa sistemática ha incrementado evidentemente con el avance del conocimiento de cada grupo de microorganismos.-

La taxonomía de los Actinomycetales está aún en la etapa clasificatoria. Los especialistas, ciertamente, pueden concordar en la selección de ciertas características y establecer la jerarquía de las mismas para desarrollar una clasificación tipo de acuerdo con los conocimientos actuales.

La taxonomía de los microorganismos se complica al nivel de las especies delimitadas sobre la base de criterios profundamente divergentes.

En general pueden distinguirse:

A) Criterios morfológicos.

- a) Características macromorfológicas: En el caso de los Actinomycetales se usan más para géneros que para especies.

b) Características micromorfológicas: Poco usadas.

c) Características biométricas: De aplicación inusual.

B) Criterios biológicos

a) Especialización "in vivo"

1) Especialización de huésped: Usada para Actinomycetales parásitos del hombre, animales o plantas.

2) Especialización organotrópica: Como antes.

3) Características patagnómicas: Como antes.

b) Especialización "in vitro"

1) Características fisiognómicas: Por ejemplo color y medida de las colonias en medios sólidos y líquidos. De uso común.

2) Características físico - químicas: Por ejemplo desarrollo en función de la temperatura; licuefacción de proteínas; peptonización de la leche. De uso común.

3) Características bioquímicas: Por ejemplo producción de ácido sulfhídrico, reducción de nitratos, utilización de carbono y de nitrógeno, producción de antibióticos, sensibilidad a los antibióticos, naturaleza de los pigmentos y de la pared celular, reacciones serológicas (de uso común).

Okami, Hashimoto y Suzuki (95) han examinado la sensibilidad a los antibióticos de actinomicetes y de organismos relacionados, como guía para la clasificación de los mismos.

Colocaron discos de papel conteniendo 100 mg de cada antibiótico sobre placas de agar sembradas con distintos microorganismos provenientes de cultivos agitados, leyéndose el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos.

Los antibióticos fungicidas no mostraron efecto inhibitorio sobre Streptomyces, Nocardia y bacterias, incluyendo Mycobacterium. Los antibióticos antibacterianos inhibieron ampliamente a los Streptomyces pero no a los hongos. Esto sustenta la estrecha relación de los Actinomycetes con las bacterias más que con los hongos.

Cada antibiótico mostró un espectro característico de sensibilidad, lo que según algunos autores podría ser una guía para la clasificación de Streptomyces.

Ryosaku Komi (96) propuso la división del género Streptomyces en ocho tipos morfológicos caracterizados por la morfología de las partes reproductivas terminales y de las otras partes del micelio aéreo.-

Cuatro de los tipos morfológicos están subdivididos en secciones, sobre la base de las propiedades morfológicas de los espirales y ramas laterales que surgen a lo largo de las hifas axiales.

Dada la propiedad que tienen los Streptomyces de producir ácidos a partir de fuentes de carbono y de nitrógeno, Nomi propuso una modificación del medio de Bennett, por la cual al desarrollar los Streptomyces incrementa gradualmente el valor del pH, aumentando la formación de iones amonio hasta sobrepasar la producción de ácido. Los cambios en el valor del pH durante el desarrollo de los cultivos dependen de las cepas y de las fuentes carbonadas, estando esencialmente influidos por la relación C/N en el medio. Una gran relación de carbono a nitrógeno tiene tendencia a decrecer el pH en el desarrollo del cultivo y recíprocamente.

Cuando no se logra un buen desarrollo de micelio aéreo en el agar Bennett modificado, son útiles las siguientes variantes:

- 1) Modificar la cantidad de fuente de carbono a 0.5 o 3 % (según se desee alcalinizar o acidificar el medio)
- 2) Variar el pH inicial entre 5.5 a 8.2, por el mismo motivo que antes.

El profesor Sánchez Marroquin (97), en una conferencia pronunciada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Buenos Aires, destacó la importancia industrial del género Streptomyces, refiriéndose a las reacciones y estudios a seguir para la identificación taxonómica del mismo.-

Analizó los siguientes métodos, expuestos en el Simposio sobre Streptomyces realizado en Filadelfia.

- 1) Micelio aéreo (método de Pridham)
- 2) Micelio substratal.

- 3) Pigmento melanoideo, en medio a base de peptona.
- 4) Auxonograma de hidratos de carbono (menos importante)
- 5) Aspecto superficial de los esporos.

Para ordenar los datos, recomendó el método de las tarjetas perforadas, empleado por Wallhäuser.

Llegó finalmente a las siguientes conclusiones:

- a) La micromorfología es muy importante. Se ha modificado el esquema de Pridham que lo clasificaba como mono, di y triverticilados, tabulándose ahora solamente como verticilados.
- b) Se vió que carece de importancia el estudio del micelio substratal.
- c) Es muy importante el pigmento desarrollado en medios con peptona, no siendo útiles los demás pigmentos.
- d) Para simplificar el trabajo se usan sólo cinco carbohidratos en los estudios de asimilación, a saber: rafinosa, ramnosa, xilosa, arabinosa y manitol.

Se agita 48 horas el Streptomyces en estudio, sembrando luego en placas con cada uno de los azúcares.

- e) Aspecto de los esporos bajo microscopio electrónico . Se encontraron una serie de formas que pueden reducirse fundamentalmente a tres: lisas, espinosas o rugosas y pilosas.

Se vió que las técnicas con fagos, empleadas en los Estados Unidos y en Alemania, son valiosas para la determinación de cepas pero no para la taxonomía de los Streptomyces.

En una comunicación posterior (98), Sánchez Marroquín analiza los siguientes puntos.

- 1) Aislamiento: de muestras de suelo, diluidas usualmente 1/100.000. Se recomienda sembrar las diluciones en medio Czapek o en agar extracto de levadura, incubando a 28°C, durante 4 a 7 días.-
- 2) Conservación: las cepas aisladas pueden conservarse en los medios antes mencionados si solo se tiene interés taxonómico, pero si se trata de estudiar antibióticos es conveniente conservarlas en suelo estériles o liofilizarlas.-

3) Identificación taxonómica: Se recomiendan los medios de agar - extracto de levadura y pasta de tomate - avena, con el fin de estudiar las características micromorfológicas y el pigmento del micelio aéreo.

Para las descripciones micromorfológicas conviene ajustarse al sistema de Pridham y colaboradores (45).

4) La descripción del color del micelio aéreo debe hacerse únicamente en términos de los siguientes colores: rosa, rojo, azul, verde, gris, café y negro. Como a veces es difícil distinguir entre anaranjado, rosa y rojo, se recomienda en estos casos designarlos como "serie roja". Para una descripción más precisa de los colores se recomienda el uso de un diccionario de colores (99).

5) Pigmento del micelio substratal: Aunque no es muy recomendable su descripción, es necesaria a veces como ayuda para la identificación. En estos casos se anotarán los colores ya indicados.-

6) Producción de pigmento melanoideo: Es un dato muy valioso. Se recomiendan los medios de agar peptona y agar tirosina, haciendo observaciones a los 10, 15 y 20 días. Además, todas las observaciones de micromorfología, colores, etc., deben hacerse a los diez días.-

7) De las pruebas bioquímicas sólo son recomendables las siguientes: a) Asimilación de compuesto de carbono (los cinco ya mencionados) siguiendo la técnica de Pridham y Gottlieb (38) y (39). b) Producción de ácido sulfhídrico en el medio de agar - peptona - hierro de Difco enriquecido con 0.1 % de extracto de levaduras. c) Reducción de nitratos. d) Acción sobre la leche; estas dos últimas pruebas se consideran sólo ensayos complementarios.

8) Actividad antibiótica: Por el método de la estría cruzada.

Gottlieb, en 1961 (100) presentó una evaluación de los criterios y procedimientos usados en la descripción y caracterización de Streptomyces. De ella se deduce que a pesar que los criterios empleados están lejos de ser ideales, y a pesar también de las variaciones individuales en la interpretación de los resultados, algunos taxonomistas han logrado clasificar adecuadamente un número de cepas del microorganismo en

estudio.

Para finalizar nuestra reseña taxonómica, mencionaremos el trabajo de Cummins (101) sobre la composición química de la pared celular de los Actinomyces y su aplicación en la taxonomía, tarea que ya había llamado la atención, entre otros, a Romano y Sohler (102) y al mismo Cummins, en colaboración con Harris, en 1956 (103).

Se encontró que la Nocardia asteroides, por ejemplo, está caracterizada por tener arabinosa, ácido glutámico, alanina y ácido D L aminopimélico. El Streptomyces hortensis y el Actinomyces hominis se caracterizan por poseer cuatro aminoácidos: alanina, ácido glutámico, glicina y el isómero L L del ácido diaminopimélico.

Además se diferenció la composición de los Actinomycetes aerobios, que parasitan al hombre y al bovino.

Los resultados obtenidos permiten apreciar que la composición de la pared bacteriana de los Actinomycetes tiene importancia taxonómica por la presencia de algunos aminoácidos particulares y de ciertos hidratos de carbono, como la arabinosa en las Nocardia y la ramnosa en algunas cepas anaerobias de origen bovino. También es característica de ciertas cepas la presencia de lisina o de algún isómero del ácido diaminopimélico.-

- - - - -

5) Antibiosis

Desde que en 1852 Mosse refirió el uso de levadura común en una epidemia de forunculosis (104) producida en el oeste de Inglaterra, se sucedieron las comunicaciones refiriendo el uso de distintos microorganismos como antagonistas bacterianos.

Tyndall, veinte años después, describió la acción antagónica de una especie de Penicillium sobre el crecimiento bacteriano (105).

La primera referencia clara con respecto al fenómeno en estudio, fue hecha por Pasteur y Joubert, en 1877, quienes inocularon Bacillus anthracis con bacterias aerobias comunes, observando que el primero o no desarrollaba o lo hacía muy escasamente.

Cantani, en 1885, en "Un tentativo de bacterioterapia" trató por primera vez de curar una enfermedad infecciosa mediante el reemplazo de una población bacteriana por otra.- En la misma época, Soyka y Babés demostraron que ciertos microorganismos eran capaces de elaborar y segregar sustancias capaces de detener el desarrollo de nuevas especies. Otro precursor destacado fue Garré, quien en 1887 escribió un trabajo titulado "Sobre los antagonismos entre las bacterias", en el que detalló métodos para descubrir organismos capaces de anular a otros.

De positiva trascendencia fue la tesis presentada en 1889 por Doehle, en la que figura la descripción de un coco no patógeno, capaz de inhibir al B.anthraxis.

La foto que incluyera en su trabajo parece ser el primer documento gráfico de una antibiosis.

Emmerich, en 1887, llegó a probar que una inyección de estreptococos permitía sobrevivir a una gran proporción de conejos inyectados posteriormente con bacilo de ántrax. En 1889, Freudreich investigó el efecto inhibitorio no sólo de cultivos varios de Pseudomona pyocyanea sino también de filtrados esterilizados, estableciendo que existía una sustancia particular más dañina para los microbios que para las células. Este primer atisbo de toxicidad diferencial fue un factor de primerísima importancia en la evaluación de las propiedades clínicas de los antibióticos.

Metchnikoff, en 1894, al estudiar también los efectos causados por sustancias segre-

gadas por la Ps. pyocyanea, informó acerca de las formas gigantes que aparecían en los microorganismos sometidos a la acción de un antagonista, hecho que luego se observó repetidamente con la penicilina y otros antibióticos de hallazgo más reciente. Llegamos así a 1889, cuando por obra de Vuillemin se introduce en la nomenclatura científica el vocablo antibiosis.

Hacia 1928, dos precursores destacados, Papacostas y Gaté (106) apoyaron esta denominación en los siguientes términos: "Cuando resulta una inhibición de la asociación de dos microbios "in vitro" se le llama antibiosis (anti: contra; bios: vida). Si ambos microbios son inhibidos la antibiosis será recíproca. Si son afectados el desarrollo o la reproducción de uno de los microbios, la antibiosis será orgánica y mientras que si sólo hay interferencia de una actividad metabólica (como la producción de una toxina o de un pigmento) la antibiosis es funcional"

Al mismo tiempo los autores aclararon otro importante par de conceptos: "La palabra antagonismo, como la palabra sinergismo, implica acción y debe ser lógicamente restringida a aquellas instancias en que una afección natural o experimental es atenuada o contenida en su desarrollo por la interacción de dos especies microbianas. Aquí también el antagonismo puede ser unilateral o recíproco de acuerdo a si la virulencia de una o de ambas especies es atenuada o abolida".

Estos últimos términos hallan actualmente mayor aplicación no en lo que atañe a la interrelación de microorganismos sino a la influencia mutua de sustancias antimicrobianas sobre los gérmenes que se pretende atacar.

Sinergismo involucra un efecto superior al esperado de la simple adición de las acciones parciales de cada participante, mientras que el antagonismo está evidenciado por el perjuicio resultante en la capacidad antibiótica de un producto por la presencia simultánea de otro antibiótico.

Un concepto menos conocido, si bien de no inferior interés científico, es el de la hormesis, definido como el efecto estimulante de concentraciones subinhibitorias de cualquier sustancia tóxica sobre un organismo.

Waksman, en 1956 (107) postuló que "los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos y que tienen la capacidad, en solución diluída, de inhibir el crecimiento y aún de destruir a otros microorganismos"

Propiedades antagónicas de los Actinomycetales.

Desde que Waksman, en 1944 (108) diera a conocer su hallazgo de la estreptomycina, producida por el Streptomyces griseus, se intensificó la búsqueda de propiedades antagónicas de estos microorganismos.

Ya en 1890, Gasperini (109) describió una digestión del micelio de un hongo por un miembro de la familia Streptomycetaceae (denominado entonces Streptothrix foersteri).

En 1917, Greig Smith (110) publicó un informe en el que se mencionaba el fenómeno de inhibición de bacilos comunes frente a colonias de Actinomyces.

En 1921, Lieske (111) describió propiedades antagónicas, mencionando igualmente posibles usos terapéuticos.

Gratia y Dath (1923 - 1926) (112), hicieron conocer el hallazgo de un Streptomyces capaz de disolver cultivos vivos o muertos de estafilococos.

Luego de ensayos con lisados producidos por cepas de Streptomyces y después de un fallido intento de utilizar una sustancia denominada actinomicetina por Welsch (1930), surgieron las experiencias de Waksman y colaboradores (113) quienes en 1940 presentaron la primer pareja de antibióticos de la serie: las actinomicinas A y B, infortunadamente demasiado tóxicas para los tejidos animales.

En Inglaterra, Gardner y Chain (114) aislaron, en 1942, la protoactinomicina, a partir de cultivos de Nocardia gardneri.

En 1948, Johnstone y Waksman (115), estudiaron la producción de estreptomycina por el S. bikiniensis, encontrando que esta cepa, aislada de tierra de Bikini, y distinta tanto morfológica como culturalmente del S. griseus, produce un antibiótico que es similar, si no idéntico, a la estreptomycina aislada del S. Griseus.

Waksman, en 1950 (1) recomendó métodos para el aislamiento y dosaje de antibióticos. Para ello, luego del aislamiento de los actinomycetes de suelo, se pasan a un medio

apropiado y se seleccionan los organismos enfrentándolos contra distintas bacterias. Los cultivos seleccionados se siembran en cultivo estacionario y sumergido o con agitación. Se determina luego el espectro antibiótico de la solución del metabolito. Después de establecido el medio adecuado y las condiciones culturales para el organismo particular, se desarrolla hasta obtener una gran cantidad de solución del metabolito determinado.

El metabolito está ahora listo para el aislamiento, concentración y purificación del antibiótico.

Se estudian las propiedades antibióticas, físicas y químicas del antibiótico purificado, porque el espectro del antibiótico aislado puede no corresponder con el de la solución del metabolito. Se ensaya la toxicidad en animales, así como su actividad in vivo.

Se ha logrado cristalizar algunos de los antibióticos aislados.

En muchos casos, organismos que producen inhibición en placas con agar no forman ningún antibiótico cuando desarrollan en medio líquido.

Según Waksman, las formas antagónicas son los representantes más abundantes del género Streptomyces.

Algunos antibióticos, como la actinomicina, son producidos por diferentes organismos.

Por otra parte, algunos organismos (S. griseus) producen más de un antibiótico.

Waksman y Lechavalier (14) presentaron una descripción de los antibióticos aislados de Actinomycetes, hasta 1953, incluyendo métodos de extracción, propiedades físicas y químicas, actividad biológica, toxicidad y referencias bibliográficas.

Vuillemin, Lechavalier y Waksman (116) presentaron en un cuidadoso trabajo un estudio de los antibióticos de Actinomycetes, con especial referencia al papel que juegan en la fisiología de los organismos que los producen. Destacan que la producción de un antibiótico está íntimamente relacionada con el desarrollo del cultivo en un medio nutriente. Los máximos de producción para diferentes antibióticos en varios medios se encuentran en el punto máximo de desarrollo del organismo que los produce o en un

entorno muy cercano. La relación entre el crecimiento de Actinomycetes y producción de antibióticos, puede resumirse como sigue: 1º) no se obtiene apreciable producción de un antibiótico sin un buen desarrollo del organismo; 2º) puede ocurrir un buen desarrollo sin producción de antibiótico. Esto indicaría que los factores nutricios y ambientales tales como aereación y temperatura, son sumamente importantes para la producción de antibióticos.

Además los antibióticos no son productos que se presenten siempre como resultado del metabolismo de los Actinomycetes.

La temperatura óptima para el desarrollo de Actinomycetes y la producción de antibióticos oscila entre 25 y 30°C, siendo el pH más favorable ligeramente superior a 7. El uso de sales reguladoras, como fosfatos, es a menudo útil. Los mejores rendimientos de antibiótico se observan generalmente en medios complejos, requiriéndose fuentes carbonadas, nitrogenadas y ciertos iones metálicos. (como hierro en el caso de la estreptomicina).-

En general se estima que la producción de antibióticos es más una característica de cepas o variedades de Actinomycetes que de especies o grupos.

Podríamos decir que las condiciones que dan lugar a la formación de un antibiótico son en cierta medida anormales desde el punto de vista del metabolismo de los Actinomycetes, ya que los medios que producen un máximo rendimiento de antibióticos son mucho más ricos en cuanto a fuentes nutricias que el suelo donde crecen generalmente estos microorganismos.

Los antibióticos podrían ser el producto final de una cadena metabólica específica; no serían demasiado útiles como metabolitos para la célula y podrían acumularse en el micelio o excretarse en el medio bajo condiciones favorables. Podrían ser entonces eliminados por la célula como productos de desecho.

Thornton y Skinner (117) analizaron la interacción de los Actinomycetes con otros microorganismos del suelo. Destacaron los autores que un antibiótico puede exhibir tres tipos de actividad frente a especies susceptibles de microorganismos, en concordancia con lo expuesto por Reilly, Schatz y Waksman en 1945 (118), aunque el ti-

po exhibido puede depender solamente de condiciones tales como concentración de antibiótico. Ellos son: 1º) pueden producir la lisis de la célula susceptible o de su contenido; 2º) pueden matar tales células y 3º) pueden inhibir solamente su desarrollo. En cuanto a la acción de los Actinomycetes como antagonistas contra otros organismos del suelo, podría deberse no sólo a la producción de antibióticos sino también a una competición por nutrientes, como proceso colateral.

Pratt y Dufrenoy (119) postularon la necesidad de numerosas etapas previas al aislamiento y purificación de un antibiótico, destacando la prueba del screening. Esta prueba representa la primer etapa en la detección de un microorganismo productor de antibióticos. Los métodos más útiles de screening son aquellos que involucran una dispersión de muestras de tierra sobre agar nutriente. Se presume que las áreas claras que aparecen a menudo, son debidas a colonias antagónicas de otros organismos del suelo, pudiendo aislarse para su uso en ensayos contra organismos patógenos específicos. Este segundo paso puede llevarse a cabo por diferentes caminos, usándose generalmente el método de las estrias. El principio involucrado es el mismo en todas las variantes del método, a saber: un gradiente de antibiótico desarrollará en el campo de difusión alrededor del antagonista y el microorganismo de prueba no crecerá en las zonas del campo de difusión donde la concentración del antibiótico exceda su particular umbral de sensibilidad. El método de la estria múltiple, que consiste en la siembra longitudinal, en placas de Petri, del organismo antagónico, enfrentado con estrias transversales de los microorganismos de prueba, permite ensayar simultáneamente un antagonista potencial contra varias cepas de organismos de prueba.

Un cierto número de factores pueden interferir en la detección de organismos antagónicos, debiendo observarse precauciones para obviarlos. Los obstáculos más comunes se enumeran a continuación:

- 1) El uso de un medio inadecuado.
- 2) El uso de suspensiones de suelo demasiado densas en la placa original.
- 3) La excesiva lentitud en el desarrollo del antagonista con respecto a los organismos de prueba.-

4) El uso de organismos de prueba poco sensibles, dado que en las primeras etapas del screening, cuando el antibiótico potencial se encuentra sólo como un metabolito difusible, su concentración en el medio circundante es sumamente baja.

5) El ensayo en etapas inapropiadas del desarrollo del antagonista (por ejemplo la producción de estreptomycinina por el S. griseus en placas de agar, es despreciable hasta que el cultivo esporula).

6) Los antagonistas pueden no liberar el antibiótico en el medio.

Aunque no hay mayores dificultades para demostrar el antagonismo microbiano sobre placas de suelo diluido, el descubrimiento de un antibiótico clínicamente útil, esto es, que posea los atributos que se enumeran a continuación, es un proceso muy largo y está, en gran parte, librado al azar.

Las cualidades que un antibiótico potencial debe poseer para ser clínicamente útil, se consideran desde el punto de vista industrial y clínico.

1) Desde el punto de vista industrial.

a) Posibilidad de obtención por biosíntesis en medios no demasiado caros o de lo contrario por síntesis química.

b) Período de fermentación relativamente corto (2 - 3 días).

c) Posibilidad de obtener el antibiótico en cultivos sumergidos.

d) Al finalizar la fermentación el antibiótico deberá estar presente en el líquido madre y no incluido en las células del organismo productor.

e) El antibiótico deberá ser soluble en agua.

f) El antibiótico deberá ser recuperable del líquido madre por extracción con solventes o por técnicas de adsorción y elución.

g) El antibiótico deberá ser estable, no destruyéndose por calor, ácidos, álcalis, luz, enzimas, etc.

2) Punto de vista clínico.

a) El compuesto deberá ser soluble en agua y en solución salina fisiológica (hay algunas excepciones)

- b) El compuesto deberá tener un amplio espectro antibiótico.
- c) El compuesto no será alergénico, ni inducirá toxicidad aguda o crónica.
- d) Deberá ser activo contra los microorganismos a valores de pH cercanos a la neutralidad.
- e) No deberá ser de naturaleza proteica.
- f) La actividad antibiótica no deberá ser reducida en presencia de pus, suero, grandes cantidades de bacterias u otras condiciones comunes en las enfermedades infecciosas.
- g) Los organismos esencialmente sensibles al antibiótico no deberán desarrollar rápida resistencia a su acción.

Antes de la entrada comercial para su uso medicinal, un antibiótico debe ser sometido a ensayos de potencia, esterilidad, toxicidad, limpidez, ausencia de pirógenos y contenido de humedad.

Ciertos compuestos, como los 5-5' dialquilbarbitúricos, estimulan la producción de estreptomina, hecho referido por Ferguson y colaboradores (120).

Mencionaremos finalmente, que entre los métodos usuales para el dosaje de antibióticos se encuentran los de cilindros en placas de agar y los turbidimétricos, comprendiendo ambas acciones biológicas (121).-

- - - - -

6) CONCLUSIONES EXPERIMENTALES

6-I- Estudio del género Streptomyces.

Se comenzó el estudio del género Streptomyces analizando cinco cepas no clasificadas, proporcionadas por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Bs. Aires), con el objeto de tener una visión general de las características de las mismas.-

Todas ellas se observaron con microscopio óptico y por contraste de fases, en preparados frescos y en tinciones de Gram y azul de metileno. Las propiedades bioquímicas y los requerimientos culturales se estudiaron en los siguientes medios: gelatina; agar nutritivo; agar A; agar almidón A; agar glucosa A; caldo nitrado; papa; medio sintético con lactato y medio basal con agregado de fuentes de carbono (la composición de los medios figura en el apéndice). Fueron ensayados los compuestos siguientes: glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, galactosa, manita, citrato de sodio, arabinosa, levulosa y xilosa, en proporción del 1 % en el medio basal, empleándose el medio sintético mencionado, pero substituyendo el lactato de amonio por cloruro de amonio.

En la expresión de los resultados, usaremos las siguientes abreviaturas: C. = crecimiento; D. = desarrollo; D.a = desarrollo abundante; D.m = desarrollo moderado; D.e. = desarrollo escaso; Col = colonias; Li = licuefacción; Ac. = acidificación; Alc = alcalinización; Pep. = peptonización; - = negativo; + = positivo; † = dudoso; sup. = superficie; pig. = pigmento; pig.sol. = pigmento soluble; MA = micelio aéreo; MS = micelio substratal; bl. = blanco; am. = amarillo; az. = azul; ver. = verde; ro. = rojo; gr. = gris; ne. = negro; ros. = rosado; cel. = celeste; dor. = dorado; vio. = violeta; pur. = púrpura; mar. = marrón.-

Tabla 1 - Cepa I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	2 días	5 días	7 días	14 días
Gelatina	D.m.	D.m.	Li.filiforme y D. en la sup.	Idem 7 días
Agar nutritivo	D.a.; Col. redondas, bl., adheridas al agar	Idem 2 días M.S. am.	Idem 5 días	Idem 7 días
Agar A	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Agar glucosa A	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Agar almidón A	D.a.; Col. aisladas bl. +	MA.bl.am.; MS.am.intenso	Idem 5 días	Idem 7 días
Caldo nitrado	nitrito:-; D. en la sup. y en las paredes.	nitrito:-	Idem	Idem
Leche	-	Ac.	Idem 5 días	Pep.
Medio sintético con lactato	-	-	-	-
Papa	-	Col. aisladas bl.	Col. bl. am.	Col. ver.
Fuentes de C	-	-	-	-

Colonia gigante - Cepa I: (Aumento 10 x). Se observaron hifas tupidas, onduladas.

Micelio aéreo: blanco, poco elevado (medio de cultivo: agar nutritivo)

Micelio substratal: amarillo pálido.

Olor: terroso

Coloración de Gram: En cultivos de 8 días, a 28°C, se observó: Gram +; hifas rectas u onduladas, biverticiladas. Conidios esféricos.-

Tabla 2 - Cepa II (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	2 días	5 días	7 días	14 días
Gelatina	D.a.,bl.	Idem 2 días	Li. filiforme	Idem 7 días
Agar nutritivo	D.m.	D.a.;MA bl., pig.sol.am.	Idem 5 días	Idem 7 días
Agar A	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Agar glucosa A	-	-	Col.aisladas bl.	Col.gr.con re- borde más claro. Abultadas
Agar almidón A	D.a.; bl.	MA: am.gr.; MS: am.	Idem 5 días Pig.exógeno am.	Idem 7 días
Leche	-	Ac.	Idem 5 días	Pep.
Caldo nitra- tado	Col.bl.;ni- trito -	Idem 2 días	Idem 5 días	Idem 7 días
Medio sintéti- co con lactato	-	-	-	-
Papa	-	D.a.; bl.	Idem.Col.en relieve	Col.bl.y ver.
Fuentes de C	-	-	-	-

Colonia gigante - Cepa II (en agar nutritivo). Con aumento 10 x se observó: borde lo-
bulado. Hifas cortas, rectas, levemente onduladas. Conidios pequeños en cadena.

Micelio aéreo: blanco, elevado.

Olor: terroso.

Coloración de Gram: Gram + , hifas rectas, monoverticilados, algunos levemente ondu-
lados.

Tabla 3 - Cepa III (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	2 días	5 días	7 días	14 días
Gelatina	-	Col. bl.	Idem 5 días	Idem 7 días
Agar nutritivo.	D.a.	MA: mar MS: am.pálido	Idem 5 días	Idem 7 días
Agar A	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.Pig.sol.cel.
Agar glucosa A	-	Col.aisladas bl.	Idem 5 días	Col.en racimo mar.Centro rugoso.
Agar almidón A	Col.aisladas	Col.bl.con centro gr.ver.	Col.bl.con borde ro.	Idem 7 días
Leche	-	-	Ac.	Idem 7 días
Caldo nitrato	Col.bl.en la sup y en el fondo. Nitrito:-	Idem Nitrito:-	Idem 5 días	Idem 7 días
Medio sintético con lactato	-	-	-	-
Papa	-	D.a. am. ros., relieve alto	Idem 5 días	Idem 7 días
Fuentes de C	-	-	-	-

Colonia gigante: (En agar nutritivo). Observada con aumento 10 x. Borde levemente ondulado; hifas cortas (4mm), todas aproximadamente del mismo largo.

Micelio aéreo: blanco grisáceo, con discreto relieve. Borde deprimido.

Olor: terroso

Coloración de Gram: Gram + . Trozos de hifas rotas. Conidios esféricos.

Tabla 4. Cepa IV (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	2 días	5 días	7 días	14 días
Gelatina	Col. ro.	Idem 2 días	Idem 5 días	Li.filiforme
Agar nutritivo.	D.a.; Col. aisladas bl.	MA: gr. MS: am.	Col. con borde bl.; incipiente pig. az.	Idem 7 días.
Agar A	-	D.e.	D.a.; ro., az. y bl. Pig. sol. az.	Idem. Acentuado pig. sol. az.
Agar glucosa A	-	MA: bl., borde ros., M.S. ro.	Idem 5 días	Col. bl., borde ro. az.; pig. sol. az. intenso.
Agar almidón A	-	Col. bl.	MA: az. ro., borde bl. MS: az.	MA: virando al bl., borde ro. az. pig. sol. az.
Leche	Ac.	Col. ro. y az.	Pep.	Idem 7 días.
Caldo nitrado.	Nitrito: + Col. bl.	Idem con Col. ro.	Idem 5 días	Idem 7 días.
Medio sintético con lactato	Col. bl.	Col. bl. con centro ro.	Idem 5 días	Idem 7 días.
Papa	Col. bl. ros. y dor. con brillo metálico	Id. más Col. az.	Idem 7 días	Fig. de la papa en ro. ver. y ne.
Fuentes de C	-	-	-	-

Colonia gigante, Cepa IV (en agar nutritivo). Con aumento 10 x se observó: borde lobulado; hifas y esporos rodeando la colonia en halo amarillento de unos 2mm de diámetro. Colonia elevada, blanca-grisácea.

Olor: terroso

Coloración de Gram: Gram dudoso. Hifas largas, rectas, algunas monoverticiladas. Conidios ovales.

Tabla 5. Cepa V (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	2 días	5 días	7 días	14 días
Gelatina	-	Col. aisladas bl.	Idem 5 días	Idem 7 días
Agar nutritivo.	MA: am. MS: am.	MA: gr.	MA: gr. az. MS: gr. az.	Idem 7 días
Agar A	-	D. Bl. gr. Incipiente pig. viol.	MA: bl. ro y az. Pig. sol. az.	MS: cel. y ros.; pig. sol. cel.
Agar glucosa A	Col. bl.	MA: bl. gr.; MS: ro. con halo bl.	Idem 5 días	Col. bl. con centro gr. Col. pequeñas az.
Agar almidón A	D. bl. Incipiente pig. vio.	MA: bl., az. y pur Pig. sol. az.	Idem 5 días	Idem 5 días. No se observa más el color pur.
Leche	Ac.	Col. ro.	Coágulo ácido, blando	Idem más Col. ros y az.
Caldo nitrato	Nitrito: + D. en la sup.	D. en el fondo del tubo	Idem 5 días	Idem 7 días.
Medio sintético con lactato	Col. aisladas en la sup.	Col. bl. con centro ro.	Idem 5 días	Idem 7 días.
Papa	-	Col. bl.; borde ro. gotitas de exudado	Pig. sol. ro.	Gran profusión de colores.
Fuentes de C	-	-	-	-

Colonia gigante, Cepa V (en agar nutritivo). Con aumento 10 x se observó: borde lobulado. Centro gris oscuro, borde rojo rodeado de un halo blanco en el reverso de la colonia.

Olor: terroso

Gram: dudoso. Hifas rectas, sin ramificar. Esporos esféricos, pequeños.

Analizando las tablas observamos que en gelatina hubo desarrollo entre moderado y abundante de Streptomyces, con licuación de la misma en algunos casos.

El agar nutritivo demostró ser un buen substrato para el desarrollo de las cepas, pero no así para el estudio de los colores del micelio aéreo y del micelio substratal, donde fueron muy significativos los medios de agar glucosa A, y sobre todo de agar almidón A. El medio de agar A permitió desarrollo escaso en tres de las cinco cepas estudiadas.

Todos los Streptomyces crecieron en leche, acidificando y en algunos casos peptonizando la misma. Hubo reducción de nitratos a nitritos.

En cuñas de papa se observó una gran cantidad de colores, incluso de pigmentaciones doradas (Cepa IV). Solamente dos cepas desarrollaron en el medio sintético con lactato (Cepas IV y V). Fue negativo en todos los casos el ensayo de utilización de fuentes de carbono. Dado que se usó el mismo medio sintético con lactato, pero substituyendo este último por cloruro de amonio, podría pensarse en una acción tóxica del mismo en las concentraciones usadas (3.34 g por litro).

Todas las cepas mostraron consistencia dura, seca, estando firmemente adheridas al agar.

Efectuando coloraciones de Gram, en días sucesivos, se advirtió que a las 48 horas comienzan a romperse las hifas y que a los ocho días la esporulación es completa. El olor terroso fue característico en las cinco cepas.

6. II. Aislamiento de cepas.

Se hicieron ensayos previos para el aislamiento de cepas de Streptomyces.

Se disgregó 1 g. de tierra de Adrogué (Prov. de Bs.Aires), con 10 ml. de agua destilada. Se filtró por papel y se sembró, por triplicado, en cajas de Petri:

- a) 1 asa de tierra
- b) 1 asa de filtrado.

Después de cuatro días de incubación a 28°C se encontró que no era conveniente trabajar directamente con la tierra por la gran profusión de hongos que cubrían las placas, lográndose aislar, en cambio, tres cepas del filtrado.

A continuación se tomó otra porción de la misma muestra de suelo, disgregando 1 gramo con solución fisiológica, decantando el sobrenadante y centrifugando durante 2 minutos a aproximadamente 1800 r.p.m. Se estriaron placas de agar nutritivo con 1 asa del sobrenadante.

Después de cinco días de incubación a 28°C, se aislaron cuatro colonias del orden Actinomycetales, pero ubicadas luego a priori como pertenecientes al género Nocardia, por la presencia de hifas tabicadas.

También por suspensión de 1 g. de suelo de Sáenz Peña (provincia de Bs.Aires) en solución fisiológica, se aislaron diez cepas, encontrando que una presentaba el micelio fragmentado en elementos bacilares y que el resto mostraban artículos esféricos, de 5 μ de diámetro, no característicos del género Streptomyces.

Prosiguiendo con los ensayos de aislamiento de cepas y con el fin de conocer la influencia de las distintas plantaciones y de la composición de la tierra sobre el crecimiento preferencial de Streptomyces, se tomaron durante el otoño veinticinco muestras de suelo del Jardín Botánico de Bs. Aires, correspondientes a las siguientes plantaciones:

- 1) *Yucca gloriosa*
- 2) *Phyllostachys chrysantha*
- 3) Idem 1)
- 4) *Osmanthus fragrans*
- 5) *Cycas revoluta*
- 6) *Cunninghamia lanceolata*
- 7) *Brodiaea sibirica*
- 8) Idem 7)
- 9) *Xylocarpus molle*
- 10) Idem 9)
- 11) *Ophiopogon japonicus*
- 12) *Berberis vulgaris*
- 13) *Chamaecyparis lausoniana*

- 14) *Sequoia semperviverens*
- 15) *Eugenia jambolana*
- 16) *Cryngium ebracteatum*
- 17) *Punica granatum*
- 18) Rosaceae
- 19) *Gymnoclaus diocca*
- 20) **Acerineae**
- 21) *Acer negundo*
- 22) Idem 5)
- 23) Idem 20)
- 24) *Nephrolepsis cordifolia*
- 25) *Parietaria officinalis*

Las muestras de suelo se suspendieron en proporción de 1/100 en agua destilada estéril, agregando 10.000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina por cada 10 ml de suspensión para inhibir la contaminación bacteriana. Se dejaron en reposo durante 30 minutos y se sembró el sobrenadante en cajas de Petri, por triplicado, en medio de agar nutritivo común.

Luego de 3 días de incubación a 28°C, se encontraron las placas cubiertas por contaminaciones de hongos, debiendo en consecuencia desecharse.

Se volvió a repetir el ensayo de aislamiento suspendiendo como antes la tierra en agua destilada, efectuando las siembras en ambiente esterilizado con luz U.V., sin agregado de antibióticos, y cambiando el substrato por agar Czapek (ver apéndice). Se prepararon dos placas para cada muestra de tierra y se incubaron 3 días a 28°C.

Se encontró una buena proliferación de cepas de Streptomyces, distribuidas por muestra de suelo como sigue:

- 1) 1 colonia de Streptomyces. Abundantes colonias bacterianas.
- 2) 2 colonias de Streptomyces.
- 3) - - -Bacterias y hongos.
- 4) 3 colonias de Streptomyces.

- 5) 6 colonias de Streptomyces. Abundantes hongos.
- 6) 2 colonias de Streptomyces.
- 7) 4 colonias de Streptomyces.
- 8) 4 colonias de Streptomyces.
- 9) 6 colonias de Streptomyces.
- 10) 8 colonias de Streptomyces - Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 11) 6 colonias de Streptomyces.
- 12) Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 13) Hongos
- 14) Hongos
- 15) 3 colonias de Streptomyces. Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 16) 1 colonia de Streptomyces. Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 17) 2 colonias de Streptomyces. Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 18) 10 colonias de Streptomyces. Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 19) 1 colonia de Streptomyces. Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 20) 3 colonias de Streptomyces. Hongos.
- 21) 5 colonias de Streptomyces.
- 22) 1 colonia de Streptomyces. Bacterias (Ps. pyocyanea)
- 23) 4 colonias de Streptomyces. Hongos
- 24) 3 colonias de Streptomyces.
- 25) 6 colonias de Streptomyces.

Fueron aisladas en total 81 cepas de Streptomyces, encontrando la mayor proporción (aproximadamente el 12 %) en tierra cercana a cultivos de la familia Rosaceae.

Las tierras 1 y 3, correspondientes a siembras de Yucca gloriosa, mostraron abundancia de bacterias y de hongos y sólo una cepa de Streptomyces.

Las tierras 9 y 10, cercanas a plantaciones de Xylosma pubescens, reunieron un 17 % del total de cepas de Streptomyces aisladas. Las tierras 5 y 22, correspondientes a plantaciones de Cycas revoluta, se caracterizaron por la abundancia de bacterias (en especial de Ps. pyocyanea) y de hongos.

Se encontraron abundantes colonias de Ps. pyocyanea en las muestras de suelo correspondientes a las plantaciones de Berberis vulgaris, Chringium ebracteatum, Punica granatum, Eugenia jambolana, Rosaceae y Gimnoclaus diosca, mientras que en las de Acerineae hubo abundancia de hongos (muestras 20 y 23)

A continuación (Tabla 6) expondremos los caracteres micromorfológicos de las cepas aisladas, en lo que se refiere a coloración de Gram y estructura de esporóforos, resumiéndolos como sigue: Gram positivo: + , negativo: -; dudoso: -; y en cuanto a los esporóforos: Rectus - flexibilis (RF); Retinaculum-apertum (RA); Spira (S); Monoverticillus (MV); Monoverticillus spira (MV.S); Biverticillus (BIV) y Biverticillus-spira (BIV.S), de acuerdo con el esquema de Pridham (45).

Se ha indicado la muestra de suelo a la que pertenece cada cepa mediante números arábigos (de 1 a 25) y las cepas dentro de cada muestra con Nos. romanos.

Tabla 6 - Coloración de Gram y estructura de esporóforosMedio: agar nutritivo (Incubadas 4 días a 28°C)

Cepas	Colorac. de Gram	Esporóforos	Cepas	Coloración de Gram	Esporóforos	Cepas	Colorac. de Gram	Esporóforos
1-I	±	RF	9-VI	+	RF	18-VII	±	RA
2-I	+	RF	10-I	+	RF	18-VIII	±	RF
2-III	+	MV	10-II	+	MV	18-IX	+	MV
4-I	+	MV	10-III	+	RF	18-X	+	RF
4-II	+	RF	10-IV	+	RF	19-I	+	RF
4-III	+	RF	10-V	+	RF	20-I	+	RF
5-I	+	MV	10-VI	+	RF	20-II	+	RA
5-II	+	RF	10-VII	+	MV	20-III	+	RF
5-III	+	RF	10-VIII	+	MV	21-I	+	RA
5-IV	+	RA	11-I	+	RF	21-II	+	RA
5-V	+	RA	11-II	±	MV	21-III	+	MV
5-VI	+	RA	11-III	+	RA	21-IV	+	RA
6-I	+	RF	11-IV	+	RF	21-V	+	RF
6-II	+	RF	11-V	+	RA	22-I	+	RF
7-I	+	RF	11-VI	+	RF	23-I	+	RF
7-II	+	RF	15-I	+	RF	23-II	+	RF
7-III	+	RA	15-II	+	RF	23-III	+	RA
7-IV	+	RF	15-III	+	RF	23-IV	+	RF
8-I	+	RF	16-I	+	MV	24-I	+	RF
8-II	+	RF	17-I	+	RA	24-II	+	RF
8-III	+	RA	17-II	+	MV	24-III	+	RA
8-IV	+	RA	18-I	+	MV	25-I	±	RA
9-I	+	RF	18-II	±	MV	25-II	+	RA
9-II	+	RA	18-III	+	MV	25-III	+	RF
9-III	+	MV	18-IV	+	RF	25-IV	+	RF
9-IV	+	MV	18-V	+	RF	25-V	+	RF
9-V	+	RA	18-VI	+	RF	25-VI	+	MV

Observando los datos encontramos que la mayor parte de las cepas aisladas (un 54.3 %) corresponde al tipo Rectus - Flexibilis,siguiendo en orden el tipo Retinaculum apertum (24.8 %) y finalmente el tipo Monoverticillus (20.9 %).

Cabe mencionar el aislamiento preferencial de Streptomyces empleando el medio Czapek en relación con el medio de agar nutritivo.

6.III - CONSERVACION DE LAS CEPAS

Se usó el método de desecación mediante vacío, sembrando las cepas en suelo estéril. Este último fue esterilizado durante tres días sucesivos a 120°C durante 30 minutos, incubando a 37°C entre cada esterilización. Se hizo control de esterilidad tomando tubos al azar y sembrando en caldo tioglicolato y en caldo nutritivo. Cultivos esporulados de ocho días de desarrollo fueron sembrados en pequeñas porciones de suelo estéril, introduciendo los tubos en otros de diámetro mayor con una capa de 1 cm de espesor de sílica gel y desecándolos luego cerrándolos al vacío. Más adelante analizaremos la eficacia del método.

6. IV - REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS

Con dos de las cepas aisladas, la 17 - I y la 25 - III, se hicieron estudios de asimilación de aminoácidos y otras fuentes de nitrógeno. Para ello se preparó un medio basal (ver apéndice, medio 19) y se ensayaron las distintas fuentes de nitrógeno en proporción de 1 g. por cada 100 ml. de medio.

Se inocularon los medios con cultivos esporulados incubados durante ocho días. Se hicieron los ensayos por triplicado y se centrifugó el medio para separar el micelio, liofilizando luego para tener peso seco.

Las determinaciones se efectuaron a los 3,5 y 7 días.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 7 - Ensayos de asimilación de fuentes de N

a) Cepa 17 - I

Fuentes de N	Mg. de micelio		
	3 días	5 días	7 días
Cloruro de amonio	0	0	0
Sulfato de amonio	0	0	0
L. asparagina	0	0	0
Acido glutámico	25	33	99
Arginina	0	3.5	5.5
Lisina	2	4	6.6
Histidina	3	4	7.6

b) Cepa 25, III

Fuentes de N	Mg. de micelio		
	3 días	5 días	7 días
Cloruro de amonio	0	0	0
Sulfato de amonio	0	0	0
L. asparagina	0	0	0
Acido glutámico	40	72	138
Arginina	2	4.7	8.0
Lisina	2	4.4	6.0
Histidina	4	4.0	6.1

Observamos que el cloruro de amonio, el sulfato de amonio y la asparagina, no dan desarrollo como única fuente de N y de C y N respectivamente, mientras que el ácido glutámico, la arginina, la lisina y la histidina permiten un desarrollo que sólo podríamos calificar de bueno en el primer caso.

6.V - SUPERVIVENCIA DE LAS CEPAS CONSERVADAS AL VACIO EN SUELO ESTERIL.

Luego de un período de seis meses después de cerradas las cepas al vacío, se ensayó la supervivencia de las mismas sembrándolas en caldo Bennett (apéndice, medio 20). Se incubaron las siembras a 28°C durante 7 días. Solamente en 14 de las 81 cepas aisladas se observó desarrollo en dicho medio.

Todas las siembras se repicaron en medio activante con glicerina (apéndice, medio 21), obteniendo crecimiento solamente en las cepas desarrolladas en caldo Bennett.

En consecuencia sólo hubo una supervivencia del 17.3 % luego de 6 meses de conserva-

ción al vacío. Concluimos que el método resultó sumamente insatisfactorio para la conservación de cepas de Streptomyces.

Luego fue necesario emprender nuevos intentos de aislamiento, dado que sólo se conservaron viables las cepas tabuladas como 1-I; 2-I; 4-I; 5-I; 5-II; 9-I; 9-V; 11-I; 18-IX; 20-I; 17-I; 21-V; 23-I; y 25-VI.

6. VI - NUEVOS ENSAYOS DE AISLAMIENTO.

Con muestras de tierra correspondientes a los siguientes lugares se ensayó el aislamiento de nuevas cepas de Streptomyces:

A: Barracas (Buenos Aires)

B: Lomas de Zamora (Prov. de Buenos Aires)

C: Pilar (Prov. de Buenos Aires)

D: Mar del Plata (Prov. de Buenos Aires)

E: Miramar (Prov. de Buenos Aires)

F1: Prov. de Chaco.

F2: Prov. de Chaco

F3: Prov. de Chaco

G1: Pampa de Achala (Prov. de Córdoba)

G2: Embalse de Río Tercero (Prov. de Córdoba)

G3: Capilla del Monte (Prov. de Córdoba)

G4: Cozquín (Prov. de Córdoba)

G5: La Serranita (Alta Gracia) (Prov. de Córdoba)

G6: Carlos Paz (Prov. de Córdoba)

G7: Los Gigantes (Prov. de Córdoba)

G8: Cerro Las Rosas (Prov. de Córdoba)

Se suspendió 0.1 g de tierra en 10 ml de solución fisiológica. Se dejó decantar y se estrió en dos placas de Petri con medio activante con glicerina (ver apéndice). Se incubó a 28°C durante 7 días.

Para inhibir el desarrollo de hongos se agregó 100 µg de micostatin/ml de medio.

El antibiótico se disolvió en alcohol etílico al 70 % en volumen, acidificado con ácido clorhídrico, y se agregó al medio ya esterilizado. De esa manera se obtuvieron placas libres de contaminaciones de hongos. Se encontró que era preferible estriar con 1 asa de suspensión de suelo más que con 0.1 ml de la misma, dado que de la última forma las colonias bacterianas cubrían los desarrollos de Streptomyces.

Se aislaron de estas nuevas muestras 30 cepas de Streptomyces, que sumadas a las 14 del aislamiento anterior (44 en total), fueron utilizadas con fines de clasificación y poder antibiótico de las mismas. Se han enumerado como sigue:

A-1; A-2; A-3; C-1; C-2; E-1; F1-1; F1-2; F1-3; F1-4; F1-5; F1-6; F2-1; F2-2; F2-3; F2-4; F2-5; F2-6; F3-1; F3-2; F3-3; F3-4; G1-1; G2-1; G2-2; G2-3; G2-4, G5-1; G8-1 y G8-2.

Del total de los nuevos aislamientos un 53.3 % corresponde a la provincia de Chaco, un 26.6 % a la provincia de Córdoba y un 20 % a la provincia de Bs. Aires.

Ubicándonos geográficamente podemos apreciar el decrecimiento de norte a sur, en la República Argentina, de la población de Streptomyces.

Para conservar las cepas aisladas se usó el método de desecación al vacío de un trozo de colonia de Streptomyces sobre agar nutritivo. El método consiste en introducir un trocito de colonia junto con una pequeña porción de medio en el interior de un tubito estéril (9x40 mm).

Se introduce éste dentro de un tubo de 15 x 100 mm que contiene 2-3 lentejas de hidróxido de potasio y se obtura con un tapón de goma provisto de una varilla (4 x 120 mm) que se conecta a la bomba de vacío. Luego de desecado el agar se cierra la varilla a la llama y se conserva la cepa en heladera.

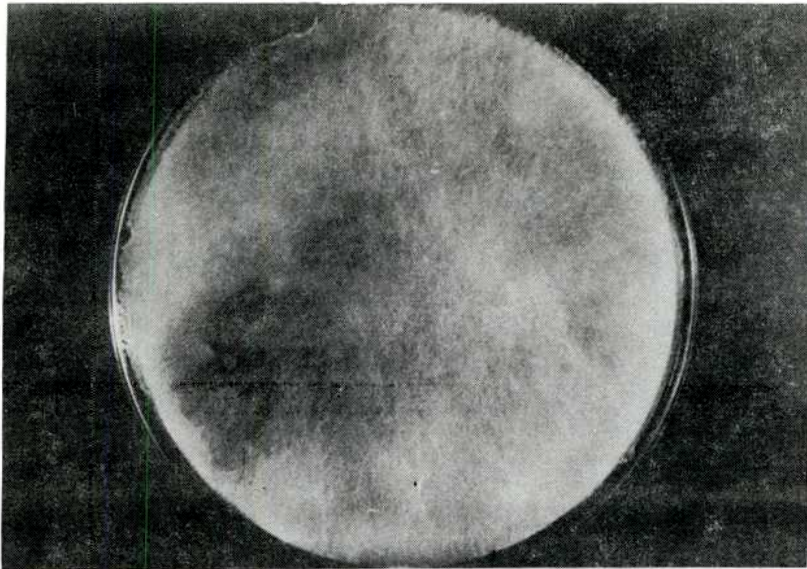


FOTO 1

Placa obtenida sin
agregado de micos-
tatín

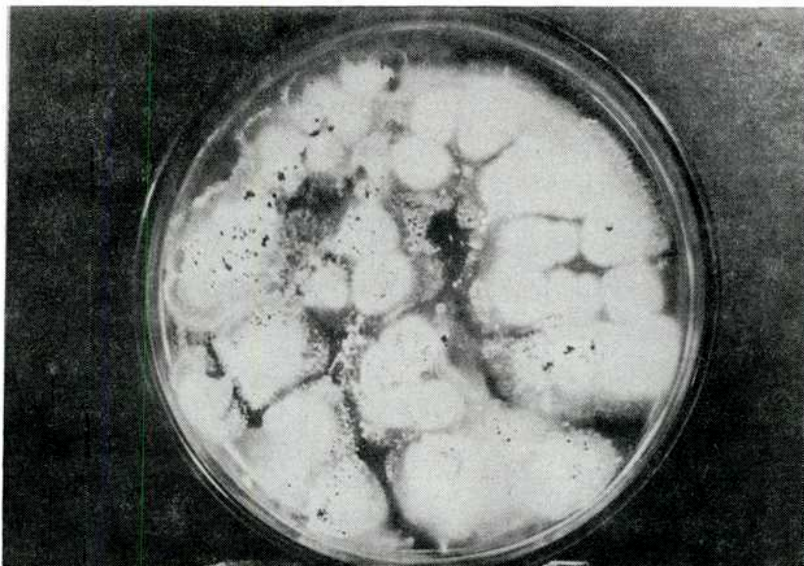


FOTO 2

Placa obtenida sin
agregado de micos-
tatín

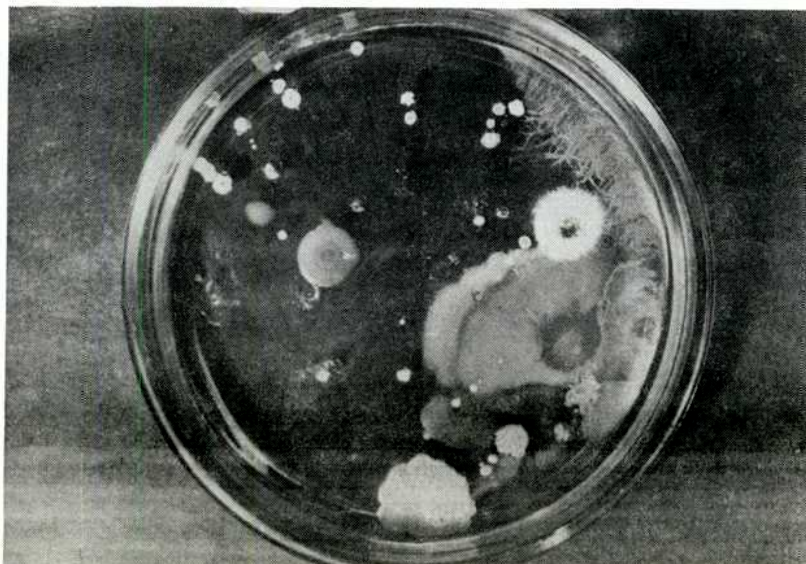


FOTO 3

Placa obtenida con
agregado de micos-
tatín

6. VII - CLASIFICACION DE LAS CEPAS AISLADAS.

Nuestros 44 aislamientos y 11 cepas tipo proporcionadas por el Profesor Dr. Luis Ver_{na}, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Bs. Aires, pertenecientes a colecciones de cultivo oficiales, fueron analizadas desde el punto de vista de sus características micromorfológicas, macromorfológicas y culturales. Las cepas tipo fueron incluidas con el objeto de compararlas con nuestros aislamientos. Este sería siempre un método ideal de identificación para nuevas especies del género Streptomyces, dadas las enormes dificultades en la interpretación de las claves hasta ahora en uso.

Fueron efectuadas coloraciones de Gram; colonias gigantes sobre agar nutritivo; estudio de características micromorfológicas y pigmento del micelio aéreo sobre agar extracto de levadura y agar pasta de tomate avena (apéndice, medios 7 y 8); pigmento melanoideo sobre agar peptona y agar tirosina (apéndice, medios 22 y 23) y las siguientes reacciones bioquímicas: prueba de hidrógeno sulfurado, utilización de rafinosa, xilosa, ramosa, ~~arabinosa~~ y manitol, reducción de nitratos y acción sobre leche (apéndice, medios 24, 25, 14 y 15)

Las observaciones de los colores del micelio aéreo y substratal se hicieron a los 4, 7, 14 y 21 días teniendo como guía el Munsell Book of Color (122).

En dicha tabla los colores han sido definidos mediante tres dimensiones: matiz, valor y croma.

En cuanto al matiz, indica el nombre común de cada color. Es la primer característica del color que detecta el ojo humano. En la tabla se indica por la inicial del color (en inglés). Así R indica Red (rojo), Y - R, Yellow-Red (amarillo-rojo) etc.

Valor: entre el blanco puro y el negro puro pueden distinguirse varios grados de luminosidad, desde el gris más oscuro, justo antes del negro, hasta el gris más claro, inmediatamente después del blanco, pudiendo observarse todos los colores dentro de estos niveles intermedios de intensidad luminosa.

El negro perfecto está indicado en la tabla por el número cero, en la parte inferior de la escala de valores. Le sigue el 1, y así hasta llegar al blanco, numerado como 10. Los grises puros se conocen como neutros y se indican por la inicial N anotando su

luminosidad a continuación del mismo. N0/representa al negro y N 10/ al blanco, siendo los negros y blancos más comunes el N 1/ y el N 9/ respectivamente.-

Comparando cualquier color con los diferentes grises de la escala, es fácil distinguir el valor de ese color que indica simplemente el grado de obscuridad o claridad (luminosidad) del mismo.

Los colores con valores entre 0 y 3 pertenecen a la "zona oscura" de valores; aquellos entre 4 y 6 a la "zona intermedia" y aquellos superiores a 7 a la "zona clara."

Croma: Dos colores pueden tener el mismo matiz (por ejemplo ser rojos) y el mismo valor (esto es ni más luminoso ni más oscuro uno que otro), pero pueden diferir en la fuerza o intensidad del color. Uno puede ser rojo fuerte y el otro rojo débil. Esta diferencia es la dimensión del croma, por la cual se mide y se indica el grado en la intensidad del color.

Entonces diremos que el matiz es el nombre del color, el valor la cantidad de luz en el color y el croma el grado de fuerza del color.

Cada etapa en el croma es la unidad de medición del cambio en un matiz entre el gris neutro y el máximo croma del matiz. Estas etapas van del gris neutro hasta el croma más intenso obtenible en cualquier matiz a un dado nivel del valor. Por ejemplo, un rojo entre el blanco y el negro y con cinco grados en la intensidad del color, debe escribirse R 5/5. Un rojo con seis niveles de valor y tres grados (o etapas) en el croma, será R 6/3.

Los cromas cercanos a los matices neutros se conocen como "débiles"; los de máxima intensidad (más alejados de los matices neutros) como "fuertes" y los intermedios como "moderados".

Diremos para orientar a los lectores que en "The I SCC - NBC Method of Designating Colors" (99) figura un estudio comparativo de diversas tablas de colores, con especial referencia al Munsell Book of Color empleado por nosotros, y donde cada color tiene su equivalente expresado según distintas tablas.

- - - - -

Figuran a continuación las tablas de clasificación de las cepas de Streptomyces, junto

con la denominación dada a cada cepa, de acuerdo con los esquemas taxonómicos en uso. Las fotos de morfología de esporóforos, se han agrupado después de las tablas. Es importante aclarar que dado que el concepto de grupo es mucho más seguro que la definición de especies dentro del género Streptomyces, en algunos casos sólo se podrá asegurar el grupo más que la especie particular.

REFERENCIAS

Iniciales de los colores:

- R: red (rojo)
 - Y: yellow (amarillo)
 - YR: yellow-red (amarillo-rojizo)
 - G: green (verde)
 - GY: green yellow (verde amarillento)
 - B: blue (azul)
 - BG: blue green (azul verdoso)
 - PB: purple-blue (púrpura azulado)
 - P: purple (púrpura)
 - RP: red purple (rojo púrpura)
 - N: neutral (neutro)
- (Para otras abreviaturas ver 6-I)
- PS: pigmento soluble.

Tabla 8 - Cepa 1-I. (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:10YR 7/10 MA:5.5Y 8/8 D.m.	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem
Pasta de tomate -avena	-	-	-	-
Tirosina	-	MS:N 9/0 MA: N 8/0 D.m.	Idem	Idem
Nitrato	Col.bl. +	+	+	+
Agar peptona	MS:5,0Y 8/8 MA:5,0Y 8/8 D.a.	Idem	Idem	Idem
Extracto de leva- dura.	-	MS:5Y 8/8 MA:5Y 8/6 D.a.	Idem	Idem
Leche	-	Leve alcaliniz.	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Ramposa	-	MS:N 9/0 MA:5,0Y 8/8 D.e.	Idem	Idem
Rafinosa	-	MS:N 9/0 MA:5Y 8/6 D.e.	Idem	Idem
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 9 - Cepa 2 I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: -	MS:N 9/0 MA: N 9/0 D.a.Reacción:-	MS:Idem MA:5Y 8/8 Reacción:-	Idem Reacción:-
Pasta de tomate avena	MA:N 9/0 D.m.	Idem	MA:N 8/0	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	MA:N 8/0	Idem
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	-	Leve alcaliniz.	Idem
Extracto de levadura	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	MA:7,5YR 7/2	Idem
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	MS:7,5YR 4/4 MA:7,5Y 8/4 PS:5YR 4/4/	MA:10YR6/4
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	2 colonias MS:N 9/0 MA:N 7/0	Idem
Ramnosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem
Rafinosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	MS y MA:idem PS:7,5Y 8/6	Idem

Tabla 10 - Cepa 4 III - (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	-	D.m. MS:N 9/0 MA:N 9/0	MS:10,OYR 7/8 MA:N 8/0 PS:10,OYR 8/6	
Nitrato	Reacción:-	Col.N 9/0 Reacción:- PS:10YR 5/8	Reacción:- Idem	Idem
Leche	-	Alc.	Idem	Idem
Extracto de levadura	-	D.a. MS:N 7/0 MA:N 9/0 PS:incipiente	MS:N 7/0 MA:N 6/0 PS:7,5YR 4/4	Idem
Peptona	-	MS:N 9/0 MA:N 6/0 PS:7,5YR 4/4	MS:N 9/0 MA:N 6/0 PS:7,5YR 4/4	Idem
Manita	-	-	1 col. MS:N 9/0 MA:N 7/0	Idem
Arabinosa	-	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem

Tabla 11 - Cepa 5-I (Temperatura de incubación 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ :- MS:2,5Y 8/8 MA:2,5Y 8/8 D.a.	Idem	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	D.e. MA:10YR 8/6	Idem	Idem	Idem
Tirosina	2 Col. MS:7,5YR 8/6 MA:N 9/0	Idem PS:7,5YR 8/4	Idem	Idem
Nitrato	Col.bl. +	+	+	+
Leche	-	-	-	-
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	MS:N 9/0 MA:7,5YR 8/4	Idem	MA:2,5YR 8/4 Idem MS
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Rammosa	1 Col. MS:N 9/0 MA:N 9/0	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	2 Col. MS:7,5YR 8/6 MA:N 9/0	Idem	Idem	Idem
Xilosa	1 colonia MS:7,5YR 8/6	MA:7,5YR 8/6	Idem	Idem

Tabla 12 - Cepa 5 II (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	MS:7,5YR 7/8 MA:N 8/0 PS:7,5YR 8/4	Idem
Nitrato	Reacción: + Col.bl. PS:7,5YR 3/2	+	+	+
Leche	-	-	Alc.	Alc.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.a.	Idem	MS:10,0 YR 5/8 MA:10,0 YR 8/4 PS:5 YR 3/4	Idem
Extracto de levadura	MA:7,5YR 5/4 D.m.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem D.e.	Idem
Ramnosa	-	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	D.a.	Idem

Tabla 13 - Cepa 9 I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	MS:10 YR 7/8 MA:10 YR 8/6	Idem Reacción: -	Idem Reacción: -	Idem
Pasta de tomate avena	MA:en partes N 9/0 y en par tes N 7/0	Idem D.m.	MA:N 7/0	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	+	+	+	+
Leche	Incipiente Ac.	Idem	Ac.y coagulac.	Idem
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	MS:10 YR 8/6 MA:10 YR 8/2	Idem
Extracto de levadura	-	MA:10 YR 7/8 MS:7,5 YR 8/2 D.a.	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Rammosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	MS:10 YR 8/2 MA:10 YR 8/2	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	MS:N 9/0 MA:10 YR 8/2	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	MS:10 YR 8/2 MA:10 YR 8/2	Idem

Tabla 14 - Cepa 9 V (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	MS:N 9/0 MA:N 9/0 Reacción: -	Idem	MS:N 9/0 MA:10 YR 7/8	Idem Reacción: -
Pasta de tomate avena	-	MS:N 9/0 D.m.	MA:N 5/0	Idem
Tirosina	-	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.e.	Idem	Idem
Nitrato	Col.bl. +	+	+	+
Leche	-	Alc.	Alc.	Alc.
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.m.	Idem	MS:N 9/0 MA:N 4/0	Idem
Peptona	D.m. MS:N 8/0	Idem	Idem	Idem Fig.sol:2,5 Y 8/8
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	MS:N 8/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 15 - Cepa 11 I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: -	Reacción: - MS:N 9/0 MA:N 8/0	- MS:N 9/0 MA:5,0PB 2/2	Idem Reacción: -
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	-	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.a.	MS:5,0R 2/2 MA:N 5/0 PS:10,0R 3/6	Idem
Nitrato	-	+	+	+
Leche	-	Ac.D.a.de Col. con pig.7,5R 3/10	Idem	Idem
Extracto de levadura	-	MS:7,5R 2/2 MA:7,5PB 7/6 D.a.	MS:7,5PB 2/2 MA:mezcla de 7,5PB 7/6 y 2,5 R 7/4 PS:7,5 Y 4/4	MS:Idem MA:2,5R 7/4 PS:Idem
Peptona	D.a. MS:■ 9/0 MA:N 9/0	MS:10,0YR 8/2 MA:2,5PB 7/6 y N 9/0	MS:Idem MA:2,5PB 7/6	Idem PS:2,5B 4/2
Manita	-	D.e. MS:N 9/0 MA:N 7/0	Idem	MS:N 9/0 MA:N 5/0
Arabinosa	-	D.m. MS:N 9/0 con centro 1/0 MA:■ 7/0	Idem	MS:7,5R 2/4 MA:7,5R 5/0
Ramnosa	-	D.m. MS:N 9/0 MA:N 7/0	MS:2,5R4/10 MA:N 5/0	Idem
Rafinosa	-	D.m. MS:N 6/0 MA:N 5/0	Idem	Idem
Xilosa	-	D.e. MS:2,5R 2/2 MA:N 6/0	MS:2,5R 4/10 MA:N 5/0	Idem

Tabla 16 - Cepa 17 I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	MS:N 9/0 MA:N 9/0 Reacción: -	Idem Reacción: -	MS:10,OYR 8/6 MA:10,OYR 6/6	Idem Reacción:-
Pasta de tomate avena	MA:N 7/0 D.e.	Idem	MA:N 6/0	Idem
Tirosina	Des.incipiente	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.e.	Idem	Idem
Nitrato	Col.bl. +	+	+	Idem
Leche	-	Alc.	Alc.	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.a.	MS:Idem MA:Idem PS:10,OYR 5/8	Idem	Idem
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 8/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramposa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 D.m.	MS:N 9/0 MA:N 9/0	Idem	Idem

Tabla 17 - Cepa 18 IX (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:N 9/0 MA:N 9/0	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem
Pasta de tomate avena	-	MA:N 6/0 D.m.	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 5/0 PS:2,5 YR 8/4	Idem PS:10,0 R 5/4 D.m.	Idem	Idem PS:10,0 R 4/4
Nitrato	Col.bl. +	+	+	+
Leche	-	Ac.	Ac.	Ac. Anillo ver.y bl.
Peptona	MS:2,5 Y 6/8 No se observa MA D.a.	Idem	MA:N 7/0	MA:10,0 Y 7/2 PS:2,5 Y 7/6
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 5/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:No se ob- serva.	MA:N 6/0 D.a.	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0	MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem

Tabla 18 - Cepa 20 I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:7,5 YR 8/4 MA:7,5 YR 8/2 D.m.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	Reacción: - Des. en capa bl. PS:7,5 YR 6/6	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Leche	Incipiente alc.	Alc.	Alc.	Alc. Color del me- dio:ro-viol.
Peptona	MS:N 9/0 MA:2,5 Y 8/4 D.a.	Idem	Idem	Idem PS:2,5 Y 6/4
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:2,5 R 7/4 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	-	1 Col. MA:2,5 YR 8/2	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	1 Col. MS:N 9/0 MA:2,5 YR 8/2	Idem	Idem
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 19- Cepa 21 V (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	MS:N 9/0 MA:N 9/0	Idem Reacción: -	Idem Reacción: -	Idem Reacción: -
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:10,0 R 8/4 MA:10,0 R 8/4	Idem	Idem	Idem
Nitrato	-	-	-	-
Leche	-	-	Leve Alc.	Idem
Extracto de levadura	-	MS:10,0 YR 6/6 MA:10,0 YR 7/6 D.a.	Idem	Idem
Peptona	MS:7,5 Y 8/2 MA:N 9/0 D.a.	MS:7,5 Y 8/2 MA:7,5 Y 8/4	Idem	Idem
Manita	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Rammosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 20 - Cepa 23 I (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	-	MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem
Tirosina	MS:7,5 YR 8/4 MA:N 7/0 PS:10,0 YR 7/4 D.a.	PS:10,0 R 6/4	Idem	PS:10,0 R 4/4
Nitrato	+ Numerosas Col. bl	+	+	+
Leche	Incipiente ac.	Ac.	Idem	Pep.Anillo ver. am.
Peptona	MS:N 9/0 D.a.	MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramposa	MS:N 9/0 D.m.	MA:N 8/0	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem

Tabla 21 - Cepa 25 VI (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	MA:incipiente formación Reacción: -	MA:N 9/0 D.a. Reacción: -	Idem Reacción: -	Idem Reacción: -
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	1 Col. MS:N 9/0 MA:N 7/0	Idem	MS:7,5 R 3/6 MA:N 4/0 PS:7,5 R 3/8	Idem
Nitrato	Col.bl. +	+	+	Idem
Peptona	MS:2,5 Y 8/8 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MS:2,5 Y 8/8 MA:5,0 Y 8/6	Idem
Extracto de levadura	-	MS:N 9/0 MA:N 5/0 D.m.	Idem	Idem
Leche	-	-	Ac.	Idem
Ramnosa	MS:N 10 D.e.	MA:N 5/0 D.a.	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 D.e.	MA:N 7/0	MS:N 8/0 MA:N 5/0 D.m.	Idem
Rafinosa	-	-	1 Col. MS:N 9/0 MA:N 6/0	Idem
Xilosa	-	-	1 Col. MS:N 9/0 MA:N 9/0	Idem

Tabla 22 - Cepa A-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+ D.a.	+	+	+
Pasta de tomate avena	MA:N 9/0 D.m.	MA:2,5 PB 8/4	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 7/0 MA:2,5 PB 7/2 D.m.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	Reacción: - Col.bl.az PS:10,0 YR 5/8	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Leche	-	Ac.	Idem	Pep.Anillo mar.-ver.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	PS:10,0 YR 4/4	Cráter en el centro de las col.
Extracto de levadura	MS:2,5 Y 6/2 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MA:2,5 B 8/2	Idem Gotitas de exudado color ámbar
Manita	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 7/2 D.m.	Idem	Idem	Idem
Ramposa	MS:N 9/0 D.a.	MA:2,5 B 7/2	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 7/4 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 23 - Cepa A-2 (Temperatura de incubación:28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:7,5 Y 8/4 D.m.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	-	-	-	-
Leche	-	Ac. y coag.	Pep.	Idem
Extracto de levadura	MS:2,5 Y 8/12 MA:2,5 Y 8/6 D.m.	Idem D.a.	Idem	Idem
Peptona	MS:2,5 Y 8/10 MA:7,5 Y 7/2 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita-	-	-	-	-
Arabinosa	-	MS:7,5 Y 7/4 MA:N 7/0 D.e.	Idem D.e.	Idem D.e.
Ramnosa	MS:7,5 Y 8/8 MA:N 5/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:7,5 Y 8/2 MA:N 8/0 D.e.	Idem	Idem	Idem

Tabla 24 - Cepa A-3 (temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	-	MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 7/4 D.a.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	Reacción: - Col. bl. PS:10 YR 5/8	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Leche	-	Ac.	Ac.	Pep. Anillo mar.-am.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.a.	Idem	PS:10,0 YR 4/4	Crater en el centro de las col.
Extracto de levadura	MS:10 YR 6/4 MA:N 8/0 D.a.	Idem	MA:2,5 PB 7/4	Idem
Manita	MS:N 9/0 D.m.	MA:2,5 PB 7/4	Idem	Idem
Ramnosa	-	MS:10,0 YR 5/6 MA:2,5 PB 7/4 D.a.	Idem	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 8/4 D.a.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:10,0 YR 5/6 D.a.	MA:2,5 PB 7/4	Idem	Idem
Xilosa	MS:10,0 YR 5/6 MA:2,5 PB 8/2	Idem	MA:2,5 PB 6/2	Idem

Tabla 25 - Cepa C-1 (temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: + D.a.	Reacción: + Idem	Reacción: + Idem	Reacción: + Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	PS:2,5 Y 8/8
Nitrato	NO ₂ : + PS:10,0 YR 6/6	NO ₂ : +	NO ₂ : +	NO ₂ : +
Leche	Alc.	Idem	Idem	Idem. Anillo bl. y otro mar-viol
Peptona	MS:N 9/0 MA:2,5 Y 8/4 D.a.	Idem	Idem	MA:N 10-exhuda do color ambar PS:10,0YR 5/8
Extracto de levadura	MS:7,5 YR 5/6 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	MA:N 7/0
Manita	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 26 - Cepa C-2 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:5 Y 8/8 MA:2,5 Y 8/6	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	MA:2,5 Y 8/2 D.m.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:10 YR 5/4 MA:N 10 D.e.	MS:10 YR 5/4 MA:N 8/0 D.m.	Idem	Idem
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	Alc.	Alc.y coag.	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.a.	MS:10 YR 7/6 MA:7,5 YR 7/2	Idem	Idem
Peptona	MS:10 YR 7/10 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MS:2,5 YR 8/2 MA:5 Y 7/8	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	MS:N 6/0 MA:N 6/0 D.e.	MS:10 YR 8/2 MA:10 YR 8/2 D.e.	Idem
Ramnosa	MS:10 YR 7/4 MA:10 YR 7/4 D.e.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	D.e.	D.e.	MS:10 YR 8/4 MA:10 YR 8/4	MS:10 YR 8/4 MA:10 YR 8/2
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.e.	Idem	MS:N 8/0 MA:10 YR 7/4

Tabla 27 - Cepa E-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:2,5 Y 8/8 MA::N 9/0	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	PS:2,5 Y 8/6	Idem
Nitrato	Col.bl. NO ₂ : -	NO ₂ : -	NO ₂ : +	NO ₂ : +
Leche	-	-	Alc.	Anillo rojo- viol.
Peptona	MS:N 9/0 MA:2,5 Y 7/2 D.a.	PS:10,0 YR 5/6	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:7,5 Y 8/2 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	Idem

Tabla 28 - Cepa Fl-1 (temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:N 9/0 MA:2,5 Y 8/6	SH ₂ : - Idem D.a.	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 7/0 PS:10,0 R 7/6	PS:10,0 R 5/6 D.a.	Idem	PS:10,0 R 3/4
Nitrato	+ Col. bl.	+	+	+
Leche	Coag. y ac.	Idem	Idem	Pep. anillo ver. am.
Feptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	MA:N 10 PS:2,5 Y 8/6
Extracto de levadura	MS:10 YR 6/4 MA: 9/10 D.a.	Idem	MA: 5/0	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	MS:10,0 YR 6/4 MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Rafinosa	MS:N 10 D.e. (±)	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS: 9/0 MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MA:N 7/0	Idem

Tabla 29 - Cepa F 1-2 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	MA:N 7/0 D.a.	MA:2,5 PB 7/2	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 8/2 PS:2,5 YR 7/4 D.a.	Idem	PS:2,5 YR 6/4	Idem
Nitrato	Reacción: + PS:7,5 YR 5/6	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +
Leche	Leve ac.	Idem	Anillo mar.- ver.	Idem
Peptona	MS:2,5 Y 7/4 MA:2,5 Y 7/2 D.a.	PS:10,0 YR 5/6	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 7/2 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	MS:N 9/0 D.m.	MA:2,5 PB 8/2	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:2,5 B 7/2 D.a.	Idem	MA:N 6/0	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:2,5 PB 7/2 Col.aisladas	Idem	Idem	MA:N 6/0
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:2,5 B 7/4 D.a.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Xilosa	MS:N 9/0 MA:2,5 B 7/2 D.a.	Idem	Idem	MA:N 6/0

Tabla 30 - Cepa F 1-3 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 9/0 MA:N 10	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 8/0 PS:10,0 R 7/4	Idem D.m.	PS:7,5 R 4/4	PS:7,5 R 3/4
Nitrato	Reacción: + Numerosas col. bl.	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +
Leche	Ac. y coag.	Idem	Idem	Pep. Anillo ver. y am. concéntri- cos.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MA:7,5 Y 8/4 Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:N 7/0 D.a.	Idem	MA:N 5/0	Idem
Manita	MS:N 10 D.e. (±)	Idem	MA:N 6/0	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MA:N 6/0	Idem

Tabla 31 - Cepa F 1-4 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	MA:7,5 B 7/2 D.a.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:7,5 PB 7/2 PS:10,0 R 8/2 D.a.	MA:2,5 PB 7/2 PS:10,0 R 6/4	Idem	MA:N 6/0 PS:7,5 R 3/6
Nitrato	Nitrito: + PS:10,0 YR 5/6	Nitrito: +	Nitrito: +	Nitrito: +
Leche	-	Leve ac.	Ac.	Anillo mar.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	PS:10,0 YR 5/4	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 D.a.	MA:2,5 PB 8/4	Idem	Idem
Manita	MS:N 10 MA:7,5 PB 7/2 D.m.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Ramnosa	MS:2,5 PB 7/4 MA:7,5 PB 7/2 D.a.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Rafinosa	MS:2,5 PB 7/4 MA:7,5 PB 7/2 D.a.	Idem	Idem	MA:N 7/0
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:7,5 PB 7/2 D.a.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Xilosa	MS:N 9/0 MA:7,5 PB 7/2 D.a.	Idem	Idem	Idem

Tabla 32 - Cepa F 1-5 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 9/0 MA:2,5 Y 8/4 D.a.	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:7,5 YR 8/6 MA:N 8/0 PS:2,5 YR 8/4 D.m.	PS:7,5 R 4/4	Idem	MA:N 6/0 PS:7,5 R 2/4
Nitrato	+	+	+	+
Leche	Leve ac.	Ac.	Idem	Pep.Anillo ver. mar.
Peptona	MS:2,5 Y 8/4 MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MA:N 7/0	MA:N 5/0
Manita	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:10,0 YR 6/4 MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem	Idem

Tabla 33 - Cepa F 1-6 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	MA:2,5 YR 8/4 D.a.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:7,5 YR 8/4 MA:2,5 YR 8/4 D.m.	PS:2,5 YR 8/2	Idem	Idem
Nitrato	Reacción: - PS:10,0 YR 5/6	Reacción: -	Reacción: -	Reacción: -
Leche	-	Ac.	Idem	Idem Anillo mar.ver.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	PS:10,0 YR 3/2	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:2,5 YR 8/4 D.a.	Idem	MA:10,0 R 8/4	Idem
Manita	MS:7,5 YR 8/6 MA:7,5 YR 8/4 D.m.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:7,5 YR 8/6 MA:10,0 YR 8/4 D.m.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	MS:7,5 YR 8/6 MA:7,5 YR 8/4 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:7,5 YR 8/6 MA:7,5 YR 8/4 D.a.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:7,5 YR 8/6 MA:10,0 YR 8/4 D.a.	Idem	Idem	Idem

Tabla 34 - Cepa F 2-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 7/0	PS:2,5 YR 8/4 D.m.	Idem	PS:2,5 YR 6/4
Nitrato	-	-	+	+
Leche	Ac.	Idem	Idem	Anillo verdoso
Peptona	MS:N 9/0 D.m.	MA:N 9/0	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 6/0 Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.m.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	MA:N 7/0	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	MA:N 7/0	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.a.	Idem	Idem	Idem

Tabla 35 - F 2-2 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 9/0 MA:N 10	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 7/0 PS:2,5 YR 8/2 D.m.	Idem	PS:7,5 R 5/6	PS:7,5 R 3/4
Nitrato	-	-	-	-
Leche	Coag.	Idem	Alc.	Alc. Anillo az. vio.-ver.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	MA:N 5/0	Idem
Manita	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	MA:N 7/0	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	MA:N 6/0
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 36 - Cepa F 2-3 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	MA:N 9/0 D.m.	Idem	MA:N 6/0	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 10 PS:10,0 R 8/4 D.m.	PS:7,5 R 4/4	Idem	PS:7,5 R 2/4
Nitrato	+	+	+	+
Leche	Leve ac. y coag.	Ac.	Ac.	Anillo ver-am.
Peptona	MS:2,5 Y 8/4 D.a.	MA:N 10	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 6/0 D.a.	Idem	Idem	MA:N 5/0
Manita	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.e. (±)	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.m.	Idem	MA:N 7/0	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 37 - Cepa F 2-4 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	-
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 10 PS:2,5 YR 8/4 D.a.	Idem	PS:10,0 R 5/4	PS:10,0 R 4/4
Nitrato	Reacción : + PS:10,0 YR 5/8	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +
Leche	Coag.y ac.	Idem	Idem	Pep.Anillo ver.-am.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	PS:7,5 YR 4/4	Idem
Extracto de levadura	MS:10,0 YR 6/6 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	MA:N 8/0
Manita	MS:N 10 MA:N 10 D.e. (±)	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 8/0	Idem	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0	MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 D.e. (±)	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 38 - Cepa F 2-5 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 9/0 MA:N 8/0 D.a.	Reacción: - MA:2,5 Y 8/4	Reacción: - MA:2,5 Y 8/6	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10 D.m.	MS:N 10 MA:N 8/0 PS:7,5 YR 8/2	PS:2,5 YR 7/6	Idem
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	Alc.	Coag.	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	MS:7,5 YR 4/4	Idem
Peptona	MS:7,5 YR 4/6 MA:N 8/0 D.a.	PS:7,5 R 3/10	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 10 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	MA con centro ne.
Ramnosa	-	MS:10 R 8/4 MA:10 YR 5/6 D.e.	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 39 - Cepa F2-6 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	D.e.	D.e. MA:2,5 Y 8/6	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 8/0 MA:7,5 Y 8/2 D.e.	MA:7,5 Y 8/4 MS:N 9/0	Idem	Idem
Nitrato	±	-	-	-
Leche	Ac.	Ac.	Coag.	Pep.
Extracto de levadura	MS:2,5 Y 8/10 MA:2,5 Y 8/6	Idem D.a.	Idem	Idem
Peptona	MS:2,5 Y 8/12 MA:2,5 Y 8/6	Idem D.a.	PS:2,5 Y 7/4	Idem
Manita	D.e. (±)	D.e. (±)	D.e. (±)	D.e. (±)
Arabinosa	D.e. (±)	D.e. (±)	D.e. (±)	D.e. (±)
Ramposa	MS:7,5 Y 8/8 MA:N 7/0 D.m.	MA:N 5/0	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:2,5 Y 8/10 MA:M 7/0 D.e.	Idem	Idem	Idem

Tabla 40 - Cepa F 3-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 10 PS:2,5 YR 8/4	Idem	PS:2,5 YR 6/4	PS:10,0 R 5/6
Nitrato	+	+	+	+
Leche	Alc.	Alc.	Alc.	Alc. Anillo ver.-viol.
Peptona	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 10	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:2,5 Y 8/4 D.a.	Idem	MA:N 8/0	Idem
Manita	MS:N 9/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:10 YR 8/2 D.m.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem

Tabla 41 - Cepa F 3-2 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	PS:2,5 YR 8/2	Idem	MA:N 7/0 PS:2,5 YR 5/4
Nitrato	+	+	+	+
	PS:10,0 YR 5/6			
Leche	-	-	-	Anillo am-ver.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	PS:7,5 YR 4/4	Idem
Extracto de levadura	-	-	MS:N: 9/0 MA:N 7/0 D.m.	Idem
Manita	-	-	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.e.	Idem
Ramnosa	-	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	MA:N 8/0 D.a.	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	MS:N 10 MA:N 7/0 D.e.	Idem
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	MA:N 7/0	Idem

Tabla 42 - Cepa F 3-3 (Temperatura de incubación:28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	MA:N 8/0 SH ₂ : +	SH ₂ : +	MA:N 5/0 SH ₂ : +	SH ₂ : +
Pasta de tomate avena	-	MA:N 10 D.a.	Idem	MA:centro N 7/0 y borde N 10. Exhudado color ambar
Tirosina	MS:7,5 YR 8/4 MA:N 9/0 D.m.	PS:2,5 YR 7/4	Idem	PS:2,5 YR 4/4
Nitrato	Reacción: + Col.bl. PS:7,5 YR 5/6	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: + PS:7,5 YR 4/4
Leche	Leve ac.	Idem	Neta ac.	Anillo ver-am.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem PS:7,5 YR 4/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	MS:7,5 YR 4/4	Idem
Manita	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	MA:N 8/0	Idem
Ramosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	MA:N 8/0 D.a.	Idem
Rafinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	Idem

Tabla 43 - Cepa F 3-4 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 10	PS:2,5 YR 5/6	MS:2,5 YR 4/4 MA:2,5 YR 8/4	Idem
Nitrato	-	-	-	-
Leche	-	-	Leve alc.	Alc.neta
Peptona	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	PS:7,5 YR 5/4	MA:2,5 Y 6/4 Idem	PS:10,0 YR 6/4
Extracto de levadura	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:N 9/0	Idem	Idem
Manita	MS:N 9/0 MA:N 9/0	D.e.	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Ramnosa	MS:N 10 MA:N 8/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 44 - Cepa G 1-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	±	±	±	±
Pasta de tomate avena	MA:N 10 D.m.	MA:2,5 R 8/2	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	PS:10,0 YR 6/6 Reaccion: -	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +
Leche	Alc.	Alc.	Pep.y alc.	Anillo az-viol.
Peptona	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 9/0 PS:7,5 YR 4/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	-	-	-	-
Manita	MS:10,0 YR 8/6 MA:10,0 YR 8/2 D.e.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 45 - Cepa G 2-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 10 D.m.	PS:2,5 YR 7/4	Idem	PS:2,5 YR 4/4
Nitrato	Col.bl. Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +
Leche	Leve alc.	Idem	Idem	Alc. y coag.
Peptona	MS:2,5 Y 8/6 D.a.	MA:10,0 YR 8/4 Idem	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:7,5 Y 8/2 D.a.	MA:7,5 Y 8/4	Idem	MA:7,5 Y 7/4
Manita	-	-	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	Idem
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 D.m.	MA:N 9/0	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 9/0	Idem	Idem

Tabla 46 - Cepa G 2-2 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 8/0 PS:2,5 YR 7/4	Idem	Idem
Nitrato	Reacción: + Col. bl.	Reacción: + Col.bl.	Reacción: + Col.bl.	Reacción: + Col.bl.
Leche	-	-	Alc. y leve coag.	Idem
Peptona	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 9/0	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:7,5 YR 7/2 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	MS:N 10 D.e.	MA:N 10 D.e.	Idem	Idem
Ramnosa	MS:N 10 D.e.	Idem	MA:7,5 YR 7/2	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 10 D.m.	Idem	MA:N 8/0	Idem

Tabla 47 - Cepa G 2-3 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 9/0 MA:N 9/0	Reacción: - MA:2,5 Y 8/2 D.a.	Reacción: - Idem	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Tirosina	MS:N 8/0 MA:N 8/0	Idem	MS:10,0 R 3/4 MA:N 6/0	PS:10,0 R 3/4
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	Leve alc.	Alc.	Alc.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10	MS:N 6/0 D.a.	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 10	MS:N 6/0 D.a.	Idem	Idem
Manita	D.e.	D.e.	D.e.	D.e.
Arabinosa	MS:N 7/0 MA:N 7/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa -	-	MS:N 0 - MA:N 7/0 D.e.	MA:N 6/0 con centro N 0	Idem -
Rafinosa	±	±	±	±
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 48 - Cepa G2-4 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 9/0 MA:N 10	Reacción: - Idem D.a.	Reacción: - MA:2,5 Y 8/6	Reacción: - Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	PS:2,5 YR 8/4	MS:2,5 YR 5/6 MA:2,5 YR 8/4	Idem
Nitrato	±	+	+	+
Leche	-	Leve alc.	Coag.	Anillo color crema. Pep.
Peptona	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	MS:N 10 MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Manita	MS:N 10 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Ramnosa	MS:N 5/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 10 MA:N 8/0 D.e.	Idem	Idem	Idem

Tabla 49 - Cepa G 5-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	-	-	MA:N 6/0 D.m.	Idem
Mirosina	MS:N 10 D.m.	Idem	PS:10,0 R 4/6	Idem
Nitrato	Reacción: + PS:10,0 YR 5/8	Reacción: +	Reacción: +	Reacción: +
Leche	-	-	-	Coag.
Peptona	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 9/0 PS:10,0 YR 6/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA: N 10 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Milosa	-	-	-	-

Tabla 50 - Cepa G 8-1 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 D.m.	MA:N 10	Idem	Idem
Nitrato	PS:10 YR 6/6 Reacción: -	Reacción: -	Reacción: ±	Reacción: ±
Leche	Leve alc.	Idem	Idem	Idem Anillo ro-viol.
Peptona	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 9/0 PS:7,5 YR 4/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:N 9/0 D.a.	MA:N 8/0	MA:N 7/0	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 D.a.	MA:N 9/0	Idem	Idem

Tabla 51 - Cepa G 8-2 (Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 10 D.m.	PS:2,5 YR 8/4 MA:N 9/0	Idem	Idem PS:2,5 YR 6/4
Nitrato	Reacción: - PS:7,5 YR 5/8	Reacción: - Col.bl.	Reacción: -	Reacción: -
Leche	Ac. y coag.	Idem	Idem	Pep. Anillo ro-mar.
Feptona	MS:N 10 D.a.	MA:N 9/0 PS:7,5 YR 3/2	Idem	Idem
Extracto de levadura	MA:N 8/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	Idem
Ramnosa	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	Idem	MA:N 8/0	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 10 D.e.	MA:N 10 Idem	Idem	Idem
Xilosa	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	Idem	MA:N 8/0	Idem

Tabla 52 - (Cepa tipo) *Streptomyces olivaceus* NRRL-B1125

(Temperatura de incubación: 23°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	-	-	-	-
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 9/0 MA:7,5 Y 8/4 D.e.	Idem	Idem	Idem
Nitrato	-	-	-	-
Leche	-	Ac.y coagul.	Pep	Idem
Extracto de levadura	MS:2,5 Y 8/12 MA:2,5 Y 8/6 D.a.	Idem	Idem	Idem
Peptona	MS:2,5 Y 8/10 MA:7,5 Y 8/6 D.a.	Idem	PS:2,5 Y 7/8	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Ramnosa	MS:7,5 Y 8/8 MA:N 5/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:7,5 Y 8/2 MA:N 8/0 D.e.	Idem	Idem	Idem

Tabla 53 (Cepa tipo) *Streptomyces diastaticus* NRRL-1241

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:2,5 Y 8/8 MA:2,5 Y 8/4 D.a.	Idem	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	PS:7,5 YR 8/4	Idem	Idem
Nitrato	-	-	-	-
Leche	-	-	-	-
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	MA:N 10 MS:N 10 D.m.	Idem	Idem

Tabla 54 (Cepa tipo) *Streptomyces albus* NCTC-1569

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 10 MA:N 7/0	MS:10,0 R 3/6 MA:N 5/0 PS:10,0 R 6/4	Idem	PS:10,0 R 3/4
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	-	Leve alc.	Alc.
Peptona	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:N 5/0 MA:N 10	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 6/0 D.a.	MS:N 5/0 MA:N 6/0	Idem	MA:N 5/0
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	MS:N 4/0 MA:N 5/0 D.e.	Idem	Idem
Ramnosa	-	MS:N 0 MA:N 7/0, con centro N 0	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 55 (Cepa tipo) *Streptomyces coelicolor*. NCTC-2300

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:N 10 MA:2,5 Y 3/6	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 10 MA:N 8/0 D.m.	MS:N 10 MA:N 8/0 PS:2,5 YR 7/6	Idem	Idem
Nitrato	+	+	+	+
Leche	Leve alc.	Alc. y coag.	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:7,5 YR 4/4 MA:N 10	Idem	Idem
Paptona	MS:7,5 YR 5/8 MA:N 10 PS:7,5 R 3/10	Idem	Idem	PS:2,5 YR 3/6
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	MS:N 10 MA:N 8/0 D.a.	Idem	MA:center N O
Ramnosa	-	MS:10 R 8/4 MA:10 YR 5/6 D.e.	Idem	Idem
Rafinosa	-	MS:10 R 8/4 MA:10 YR 5/6 D.e.	Idem	Idem
Xilosa	-	MS:N 10 MA:N 8/0 D.m.	Idem	Idem

Tabla 56 (Cepa tipo) *Streptomyces olivaceus*. CBS 94

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:N 10 MA:N 9/0	SH ₂ : - MS:N 10 MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	MA:N 10 D.m.	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10	Idem	PS:7,5 YR 8/4	PS:5,0 YR 7/4
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	-	Alc. y leve coagulación	Idem
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	Idem	Idem	MA:2,5 Y 8/4
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 10 D.a.	MA:N 10	MA:10,0 YR 8/4	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	MS:N 9/0 MA:7,5 YR 8/2 D.e.	Idem	Idem
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 57 (Cepa tipo) *Streptomyces lavendulae* NCIB 9000

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	+	+	+	+
Pasta de tomate avena	-	MA:N 10	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10	MS:2,5 YR 4/6 MA:2,5 YR 8/2 PS:2,5 YR 5/6	Idem	PS:2,5 YR 4/4
Nitrato	-	Reacción: ±	Idem	Idem
Leche	-	-	Alc.	Alc.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 PS:7,5 YR 5/6 D.a.	Idem	MA:2,5 Y 6/2 PS:10,0 YR 6/2	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 9/0	Idem	Idem	Idem
Manita	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	Idem	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 58 (Cepa tipo) *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:2,5 Y 8/8 MA:N 9/0 D.a.	SH ₂ : - MA:2,5 Y 8/4	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem
Pasta de tomate avena	MA:N 10 D.m.	MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Tirosina	-	-	-	-
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	Leve alc.	Alc.	Alc.
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 10 D.m.	Idem	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:2,5 Y 8/6 MA:2,5 Y 8/4 D.m.	Idem	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Arabinosa	MS:N 9/0 MA:N 10 D.e.	Idem	Idem	Idem
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:2,5 Y 8/4 D.e.	Idem	Idem

Tabla 59 (Cepa tipo) *Streptomyces griseus*. NCTC 6961

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	Reacción: - MS:N 10 MA:N 10 D.a.	Reacción: - MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	-	-	-
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10 D.m.	MS:N 10 MA:2,5 YR 8/2 PS:2,5 YR 8/4	Idem	MS:2,5 YR 5/6 MA:2,5 YR 6/4 PS:2,5 YR 5/4
Nitrato	+	+	+	+
Leche	-	-	-	-
Peptona	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:N 10 MA:5 Y 8/4	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:N 10 MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Manita	-	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	Idem	Idem
Arabinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	MS:N 0 MA:N 9/0	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Tabla 60 (Cepa tipo) *Streptomyces rimosus* CB S 95.

(Tiempo de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:N 10 MA:N 10 D.a.	SH ₂ : - MA:2,5 Y 8/6 D.a.	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	-	-	MA:N 9/0	Idem
Tirosina	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	MS:2,5 Y 8/6 MA:2,5 Y 7/6	Idem	PS:7,5 YR 7/6
Nitrato	+	+	+	+
Láche	Alc.	Alc. y coag.	Idem	Pep.
Peptona	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:2,5 Y 7/6 MA:2,5 Y 8/6	Idem	MA:10 YR 6/4
Extracto de levadura	MS:N 10 MA:N 10 D.a.	MS:N 10 MA:2,5 Y 8/4	Idem	Idem
Manita	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Xilosa	-	MS:N 10 MA:N 10 D.e.	Idem	Idem

Tabla 61 (Cepa tipo) Streptomyces albosporeus. ATCC 3003

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:2,5 YR 8/6 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	Idem
Pasta de tomate avena	MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	Idem
Tirosina	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	PS:7,5 YR 8/6	Idem
Nitrato	-	-	+	+
Leche	-	-	Alc. y coag.	Idem
Extracto de levadura	MS:7,5 YR 5/8 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem	MA:10,0 YR 8/2
Peptona	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.a.	Idem	Idem	MA:10 YR 8/2
Manita	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	Idem
Arabinosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem
Ramnosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Xilosa	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.m.	Idem	Idem	MA:10 YR 8/2

Tabla 62 (Cepa tipo) *Streptomyces rimosus*. NCIB 8229

(Temperatura de incubación: 28°C)

Medios	4 días	7 días	14 días	21 días
Sulfhídrico	SH ₂ : - MS:2,5 Y 8/8 MA:2,5 Y 8/6	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem	SH ₂ : - Idem
Pasta de tomate avena	-	MA:2,5 Y 8/2	Idem	Idem
Tirosina	-	MS:10 YR 5/4 MA:N 8/0 D.m.	Idem	Idem
Nitrato	+	+	+	+
Leche	Leve alc.y coagulación	Alc. y coag.	Idem	Idem
Extracto de levadura	MS:N 9/0 MA:N 7/0 D.a.	MS:10 YR 7/6 MA:10 YR 7/2	MA:7,5 YR 7/2	Idem
Peptona	MS:10 YR 7/10 MA:N 9/0 D.a.	MS:10 YR 7/10 MA:N 9/0	Idem	MS:2,5 YR 8/2 MA:2,5 Y 8/8
Manita	-	-	MS:10 YR 8/2 MA:10 YR 8/4 D.e.	Idem
Arabinosa	MS:N 7/0 MA:N 7/0	MS:10 YR 8/2 MA: 10 YR 8/2 D.e.	Idem	Idem
Ramnosa	-	1 Col. MS: 10 YR 8/4 MA:10 YR 8/2	Idem	Idem
Rafinosa	-	-	1 Col. MS:10 YR 8/4 MA:10 YR 8/2	Idem
Xilosa	-	MS:N 9/0 MA:N 9/0 D.e.	Idem	MA:10 YR 8/2

COLORACIONES DE GRAM DE LAS CEPAS AISLADAS

Aumento 1000 x

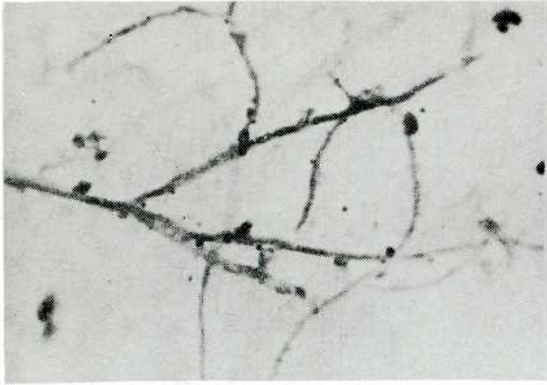


FOTO 4 - CEPA 1 - I

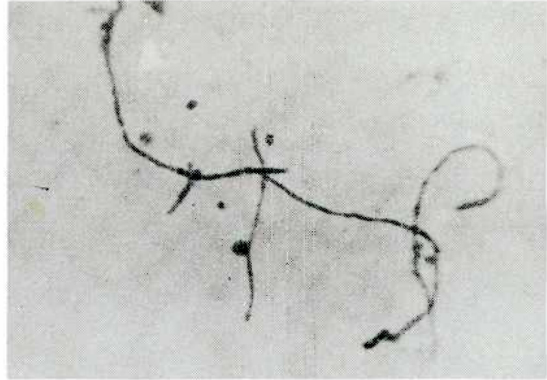


FOTO 5 - CEPA 2 - I

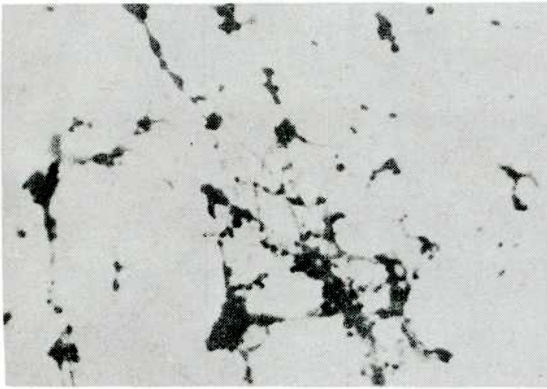


FOTO 6 - CEPA 4-III

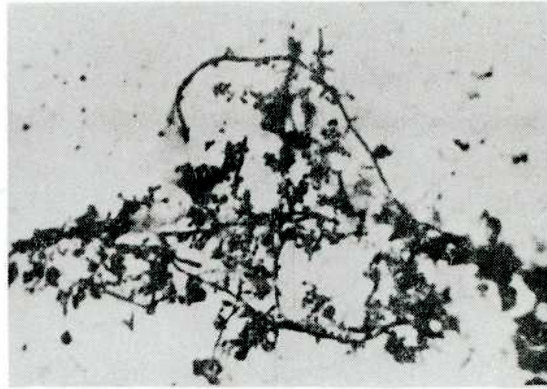


FOTO 7 - CEPA 5 - I

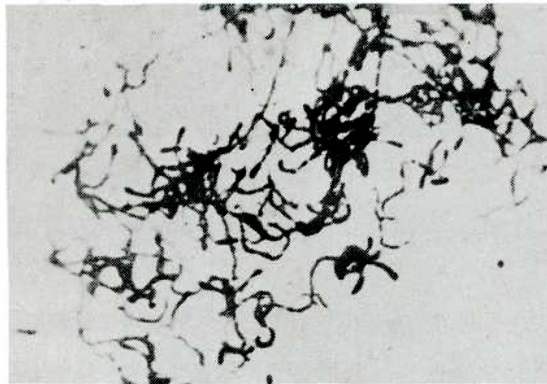


FOTO 8 - CEPA 5-II



FOTO 9 - CEPA 9 - I



FOTO 10 - CEPA 9-V

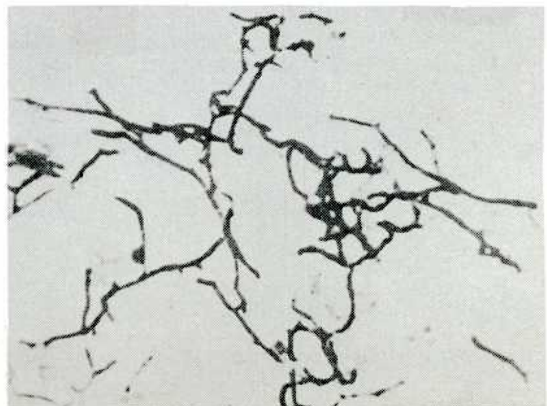


FOTO 11 - CEPA 11-I

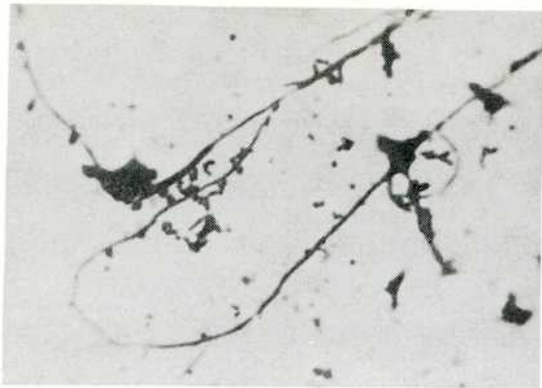


FOTO 12 - CEPA 17-I

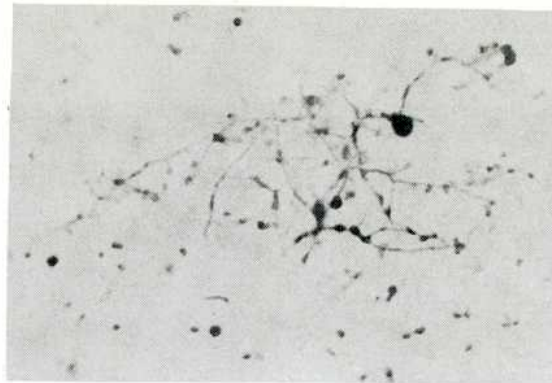


FOTO 13 - CEPA 18-IX

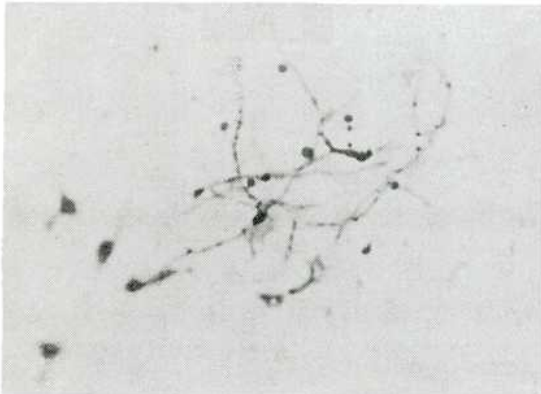


FOTO 14 - CEPA 20-I

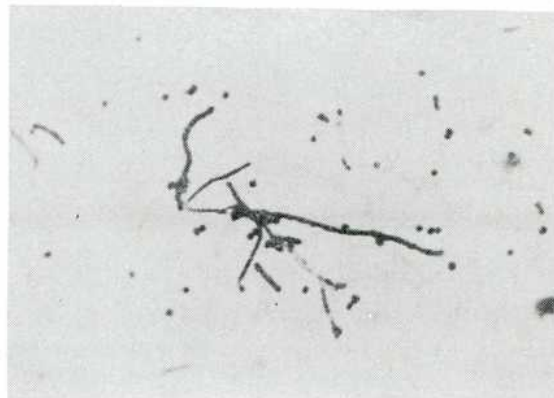


FOTO 15 - CEPA 21-V

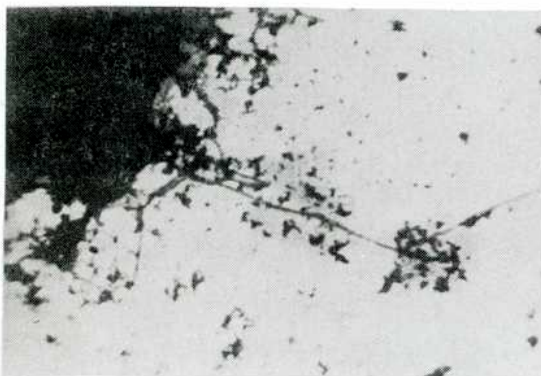


FOTO 16 - CEPA 23-I

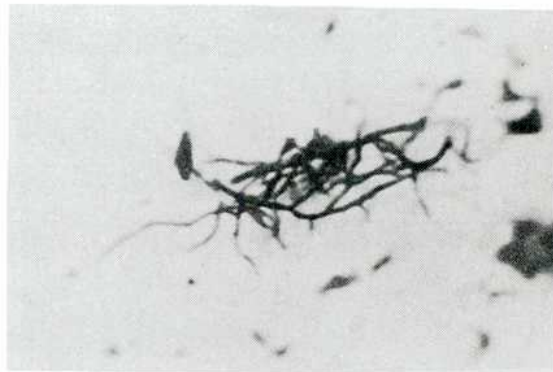


FOTO 17 - CEPA 25-VI

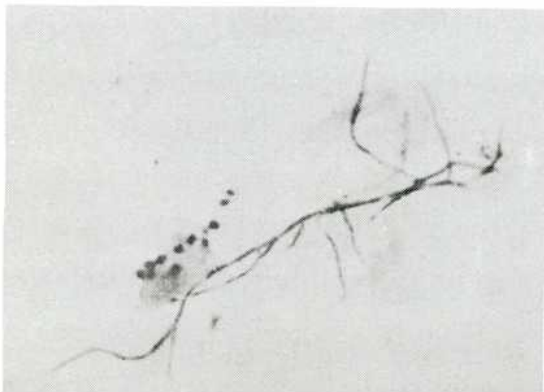


FOTO 18 - CEPA A-1



FOTO 19 - CEPA A-2



FOTO 20 - CEPA A-3

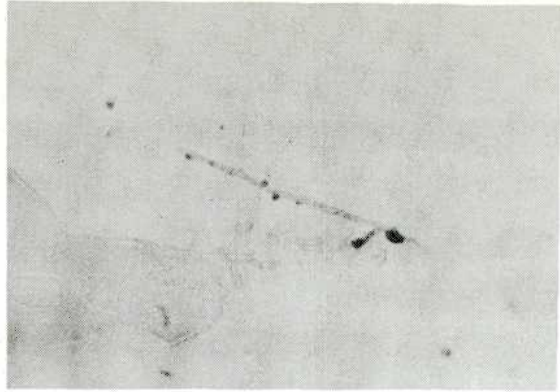


FOTO 21 - CEPA C-1

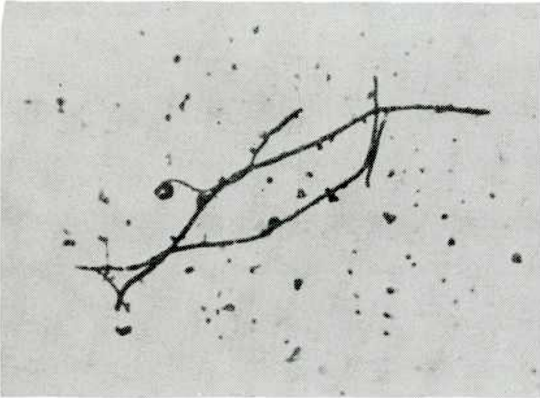


FOTO 22 - CEPA C-2

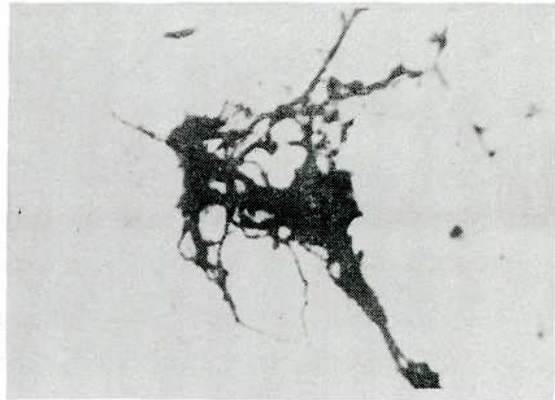


FOTO 23 - CEPA E-1

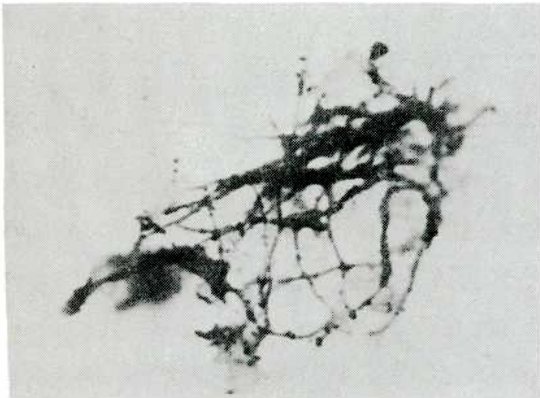


FOTO 24 - CEPA F 1-1

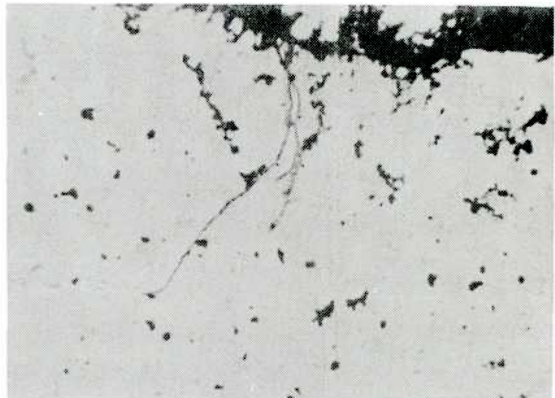


FOTO 25 - CEPA F 1-2

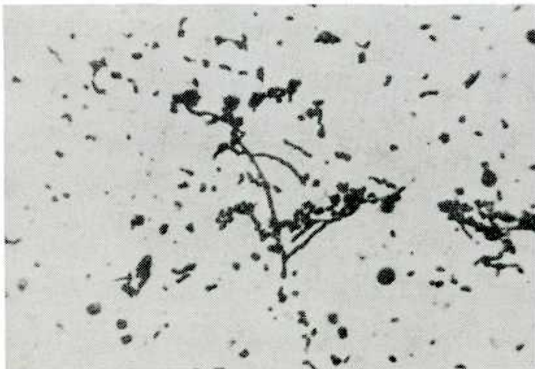


FOTO 26 - CEPA F 1-3



FOTO 27 - CEPA F 1-4



FOTO 28 - CEPA F 1-5

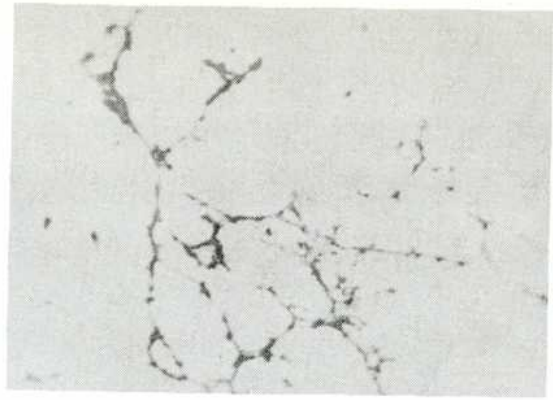


FOTO 29 - CEPA F 1-6

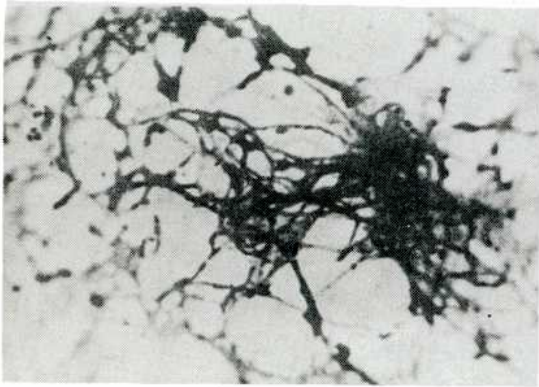


FOTO 30 - CEPA F 2-1

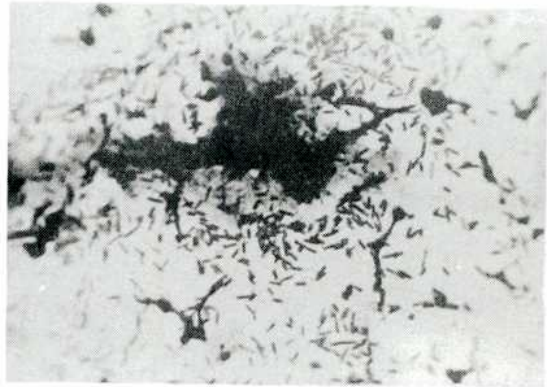


FOTO 31 - CEPA F 2-2

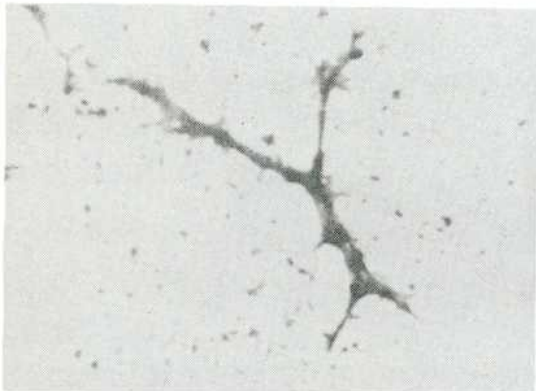


FOTO 32 - CEPA F 2-3

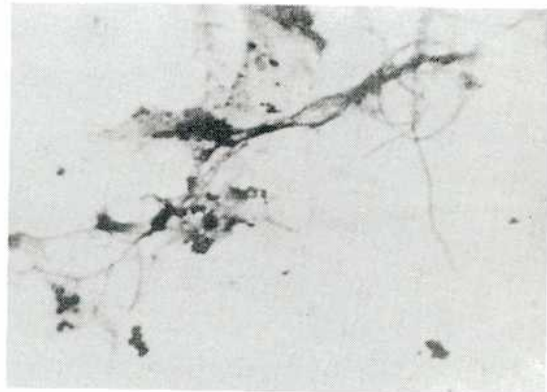


FOTO 33 - CEPA F 2-4



FOTO 34 - CEPA F 2-5

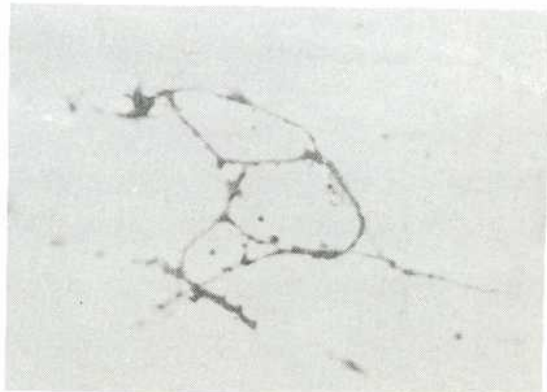


FOTO 35 - CEPA F 2-6



FOTO 36 - CEPA F 3-1

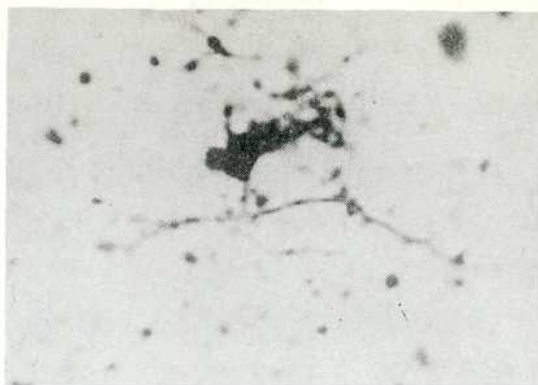


FOTO 37 - CEPA F 3-2

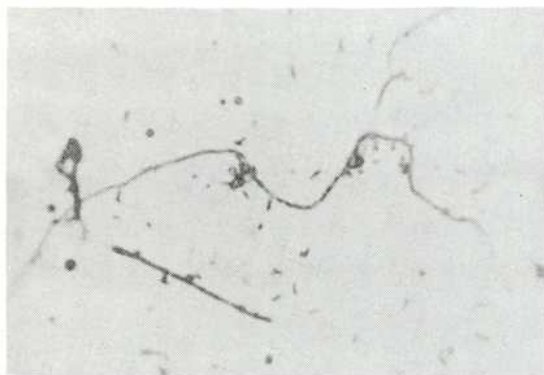


FOTO 38 - CEPA F 3-3

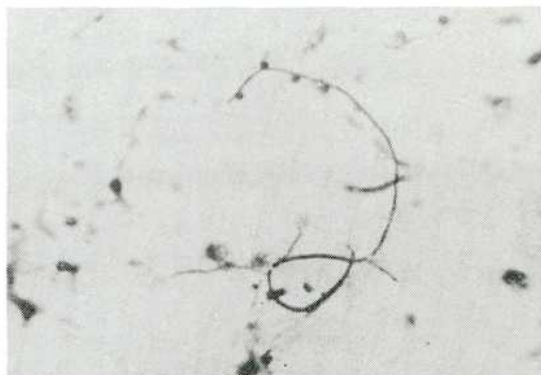


FOTO 39 - CEPA F 3-4

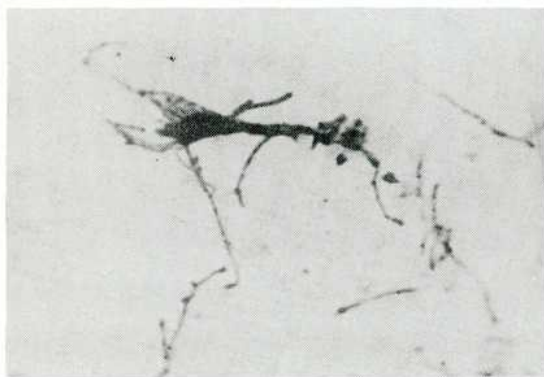


FOTO 40 - CEPA G 1-1



FOTO 41 - CEPA G 2-1

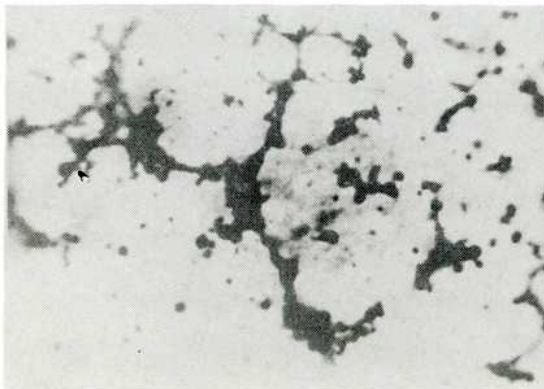


FOTO 42 - CEPA G 2-2



FOTO 43 - CEPA G 2-3

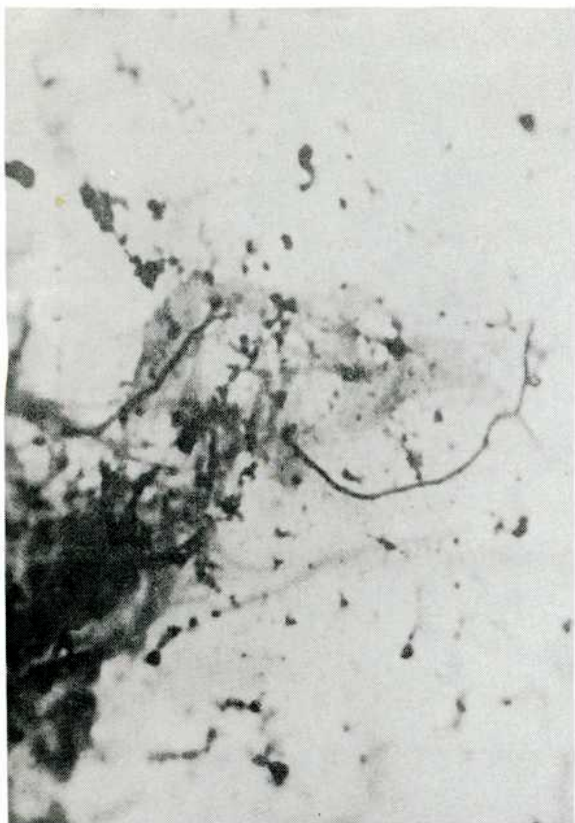


FOTO 45 - CEPA G 5-1

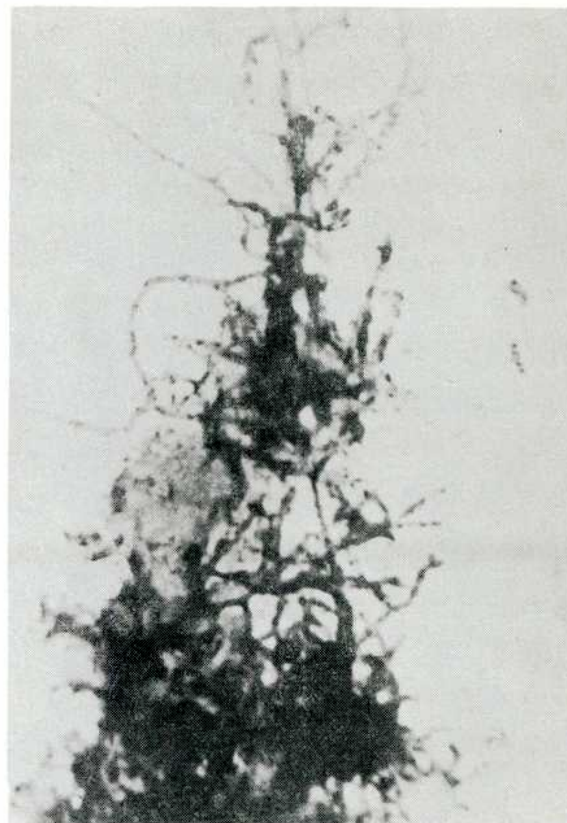


FOTO 47 - CEPA G 8-2

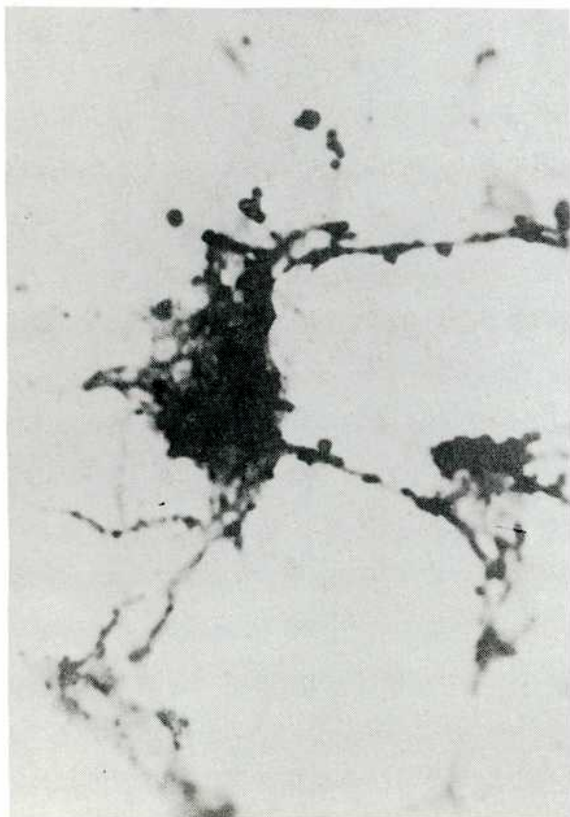


FOTO 44 - CEPA G 2-4

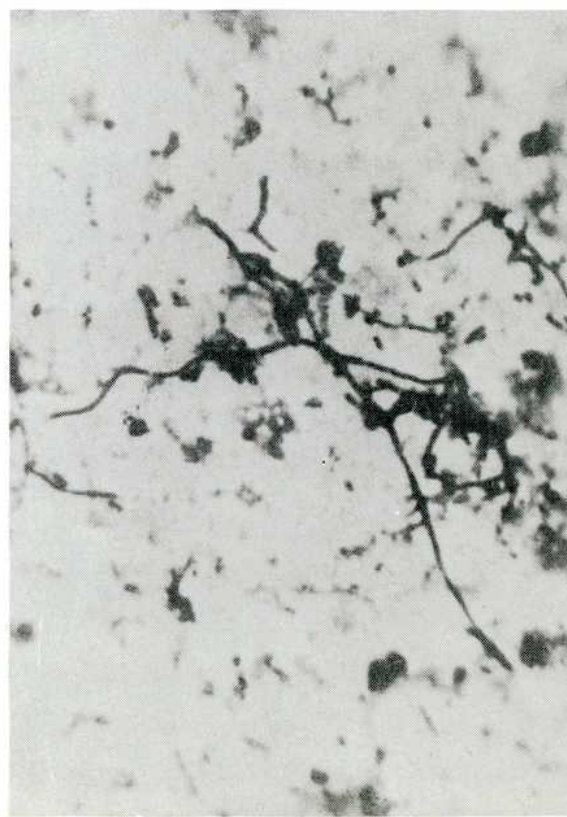


FOTO 46 - CEPA G 8-1

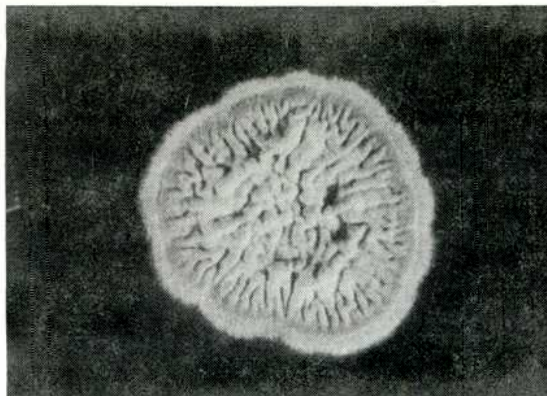


FOTO 48 - CEPA 2-I

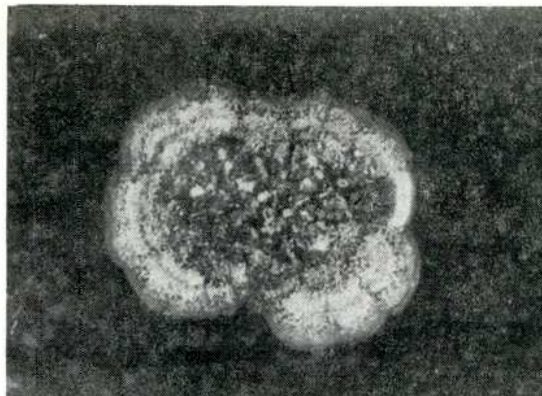


FOTO 49 - CEPA 4-III

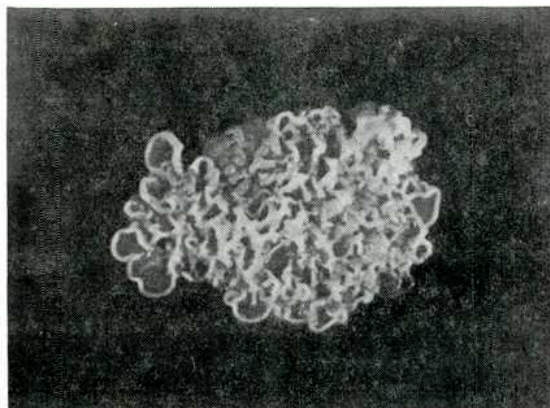


FOTO 50 - CEPA 9-V

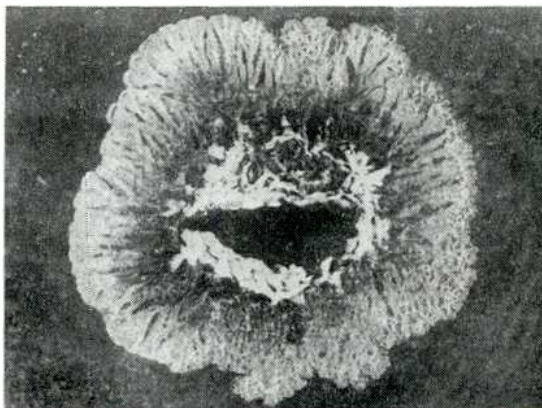


FOTO 51 - CEPA 11-I

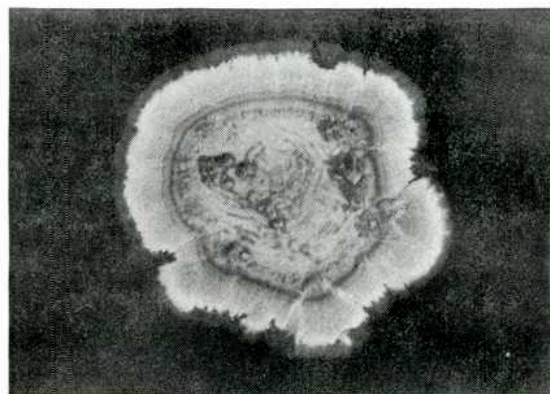


FOTO 52 - CEPA 18-IX

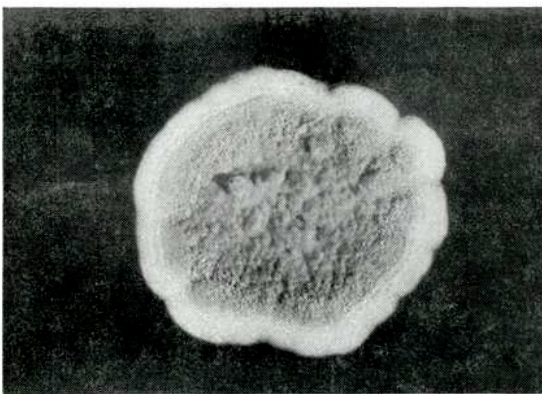


FOTO 53 - CEPA 20-I

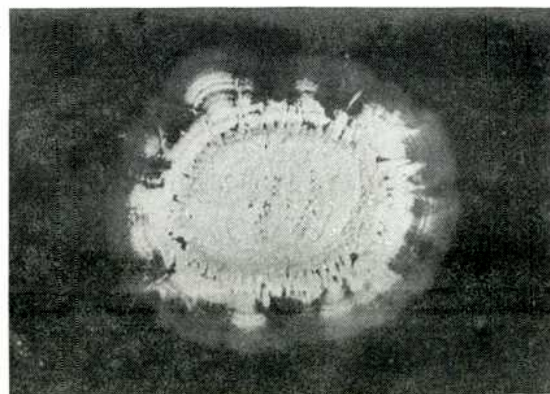


FOTO 54 - CEPA 23-I

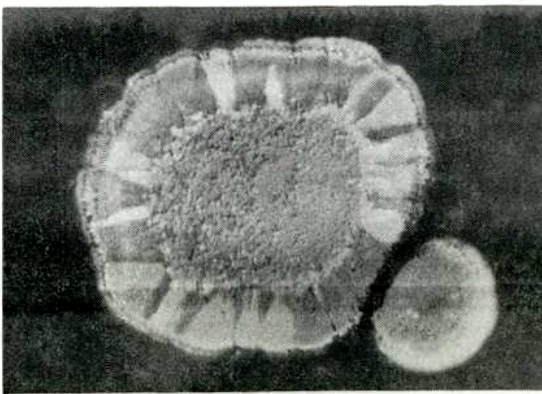


FOTO 55 - CEPA 25-VI

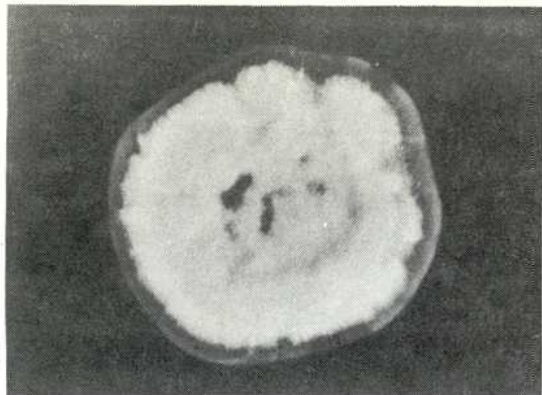


FOTO 56 - GEPA A-1

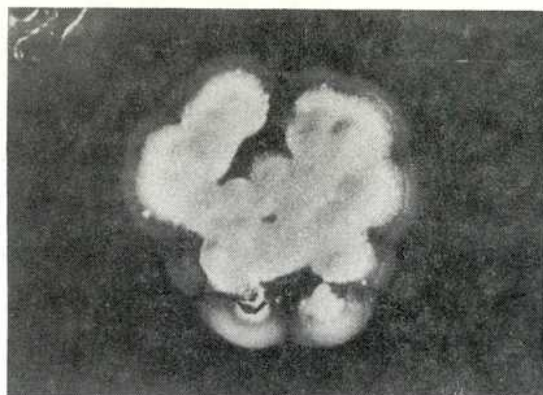


FOTO 57 - GEPA A-3

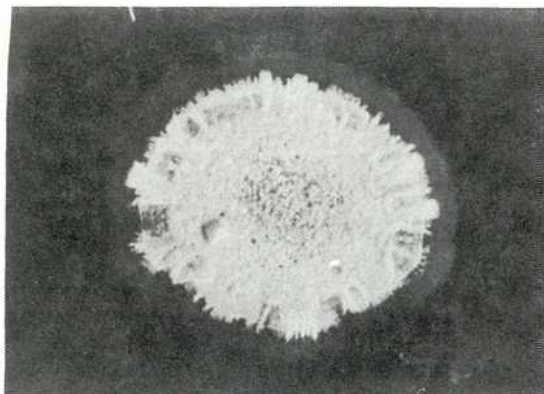


FOTO 58 - GEPA C-1

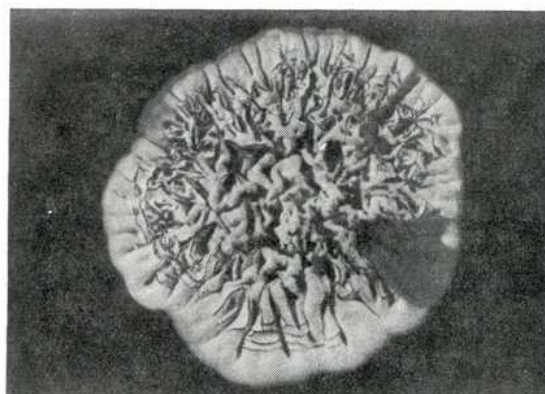


FOTO 59 - GEPA C-2

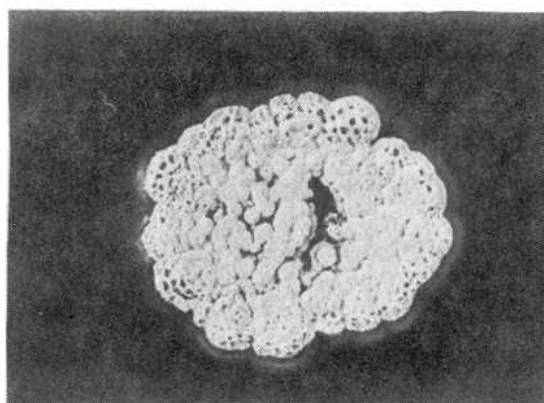


FOTO 60 - GEPA E-1

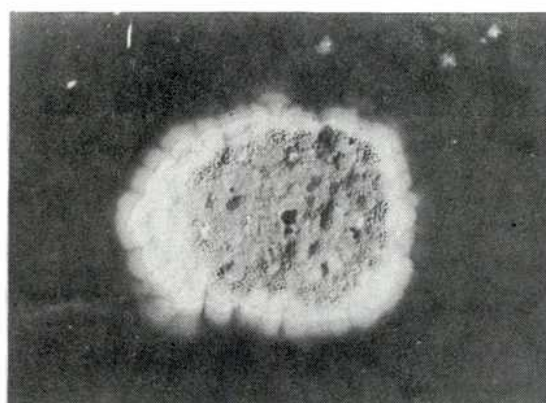


FOTO 61 - GEPA F 1-1

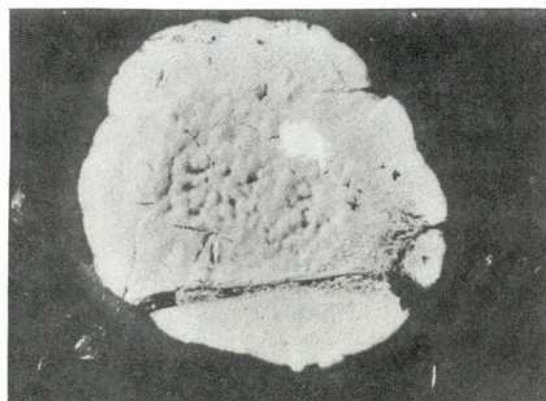


FOTO 62 - GEPA F 1-2

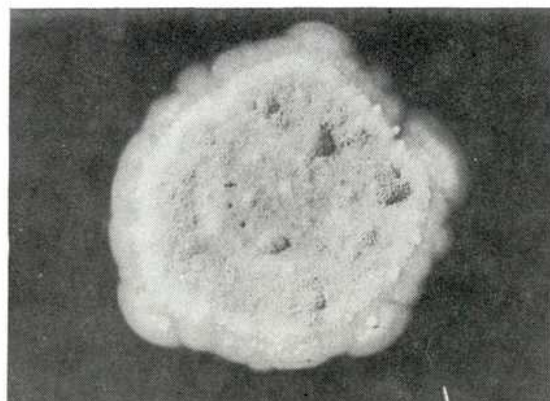


FOTO 63 - GEPA F 1-3

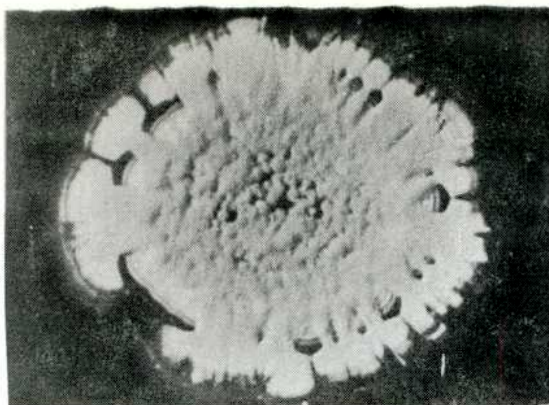


FOTO 64 - CEPA F 1-4

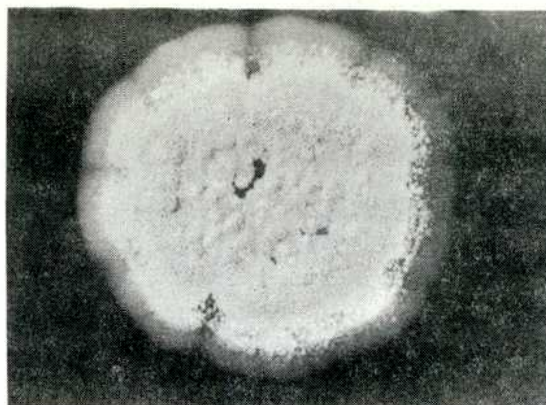


FOTO 65 - CEPA F 1-5

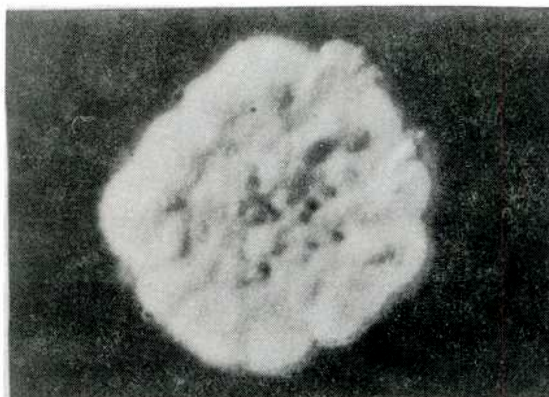


FOTO 66 - CEPA F 1-6

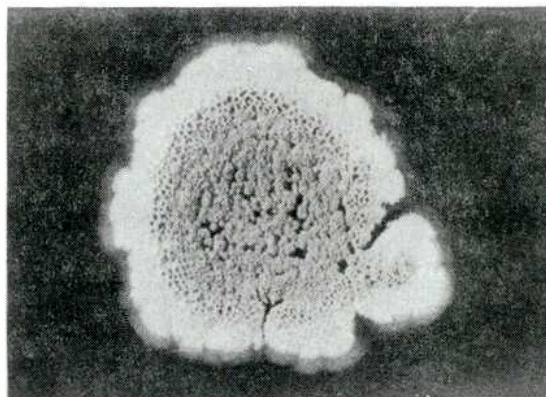


FOTO 67 - CEPA F 2-1

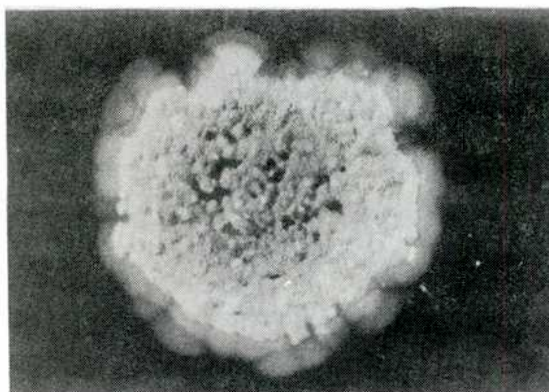


FOTO 68 - CEPA F 2-2

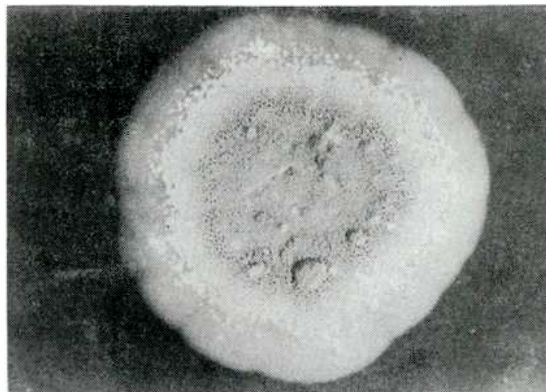


FOTO 69 - CEPA F 2-3

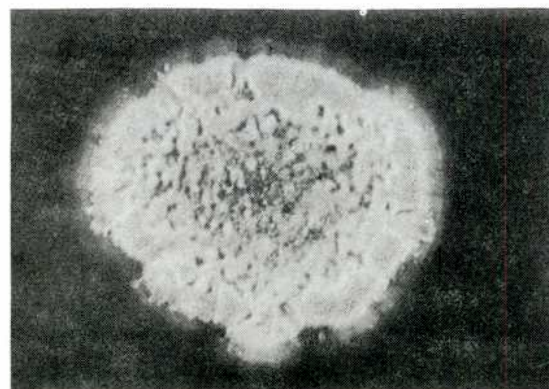


FOTO 70 - CEPA F 2-4

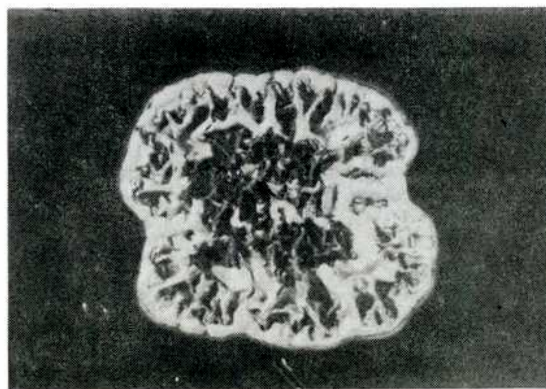


FOTO 71 - CEPA F 2-5

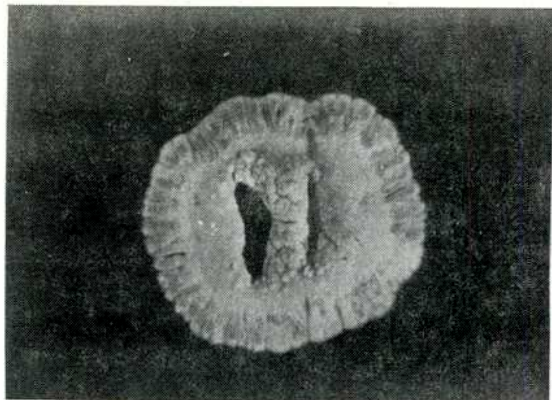


FOTO 72 - CEPA F 2-6

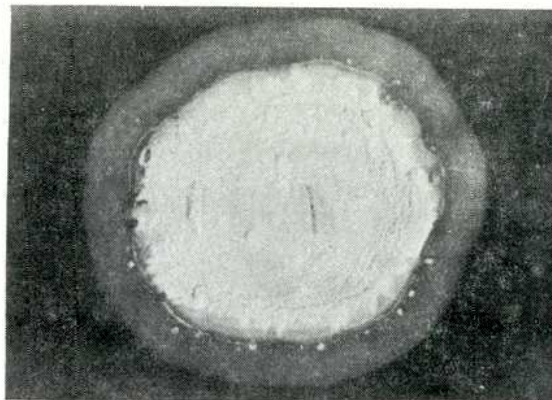


FOTO 73 - CEPA F 3-1

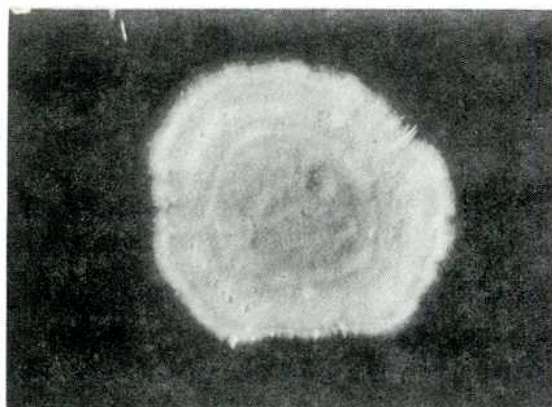


FOTO 74 - CEPA F 3-2

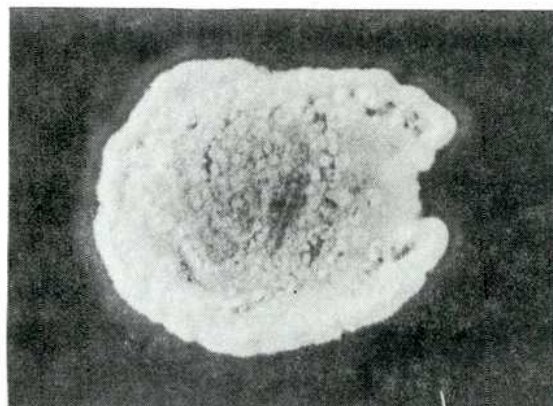


FOTO 75 - CEPA F 3-3

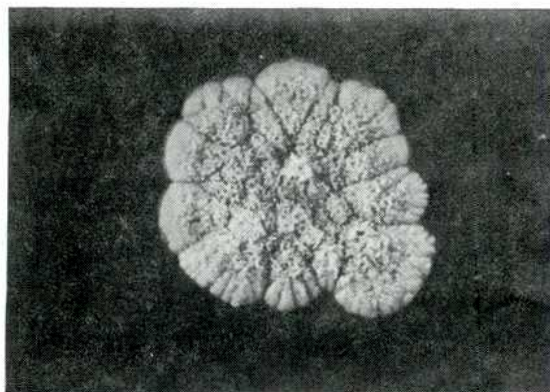


FOTO 76 - CEPA F 3-4

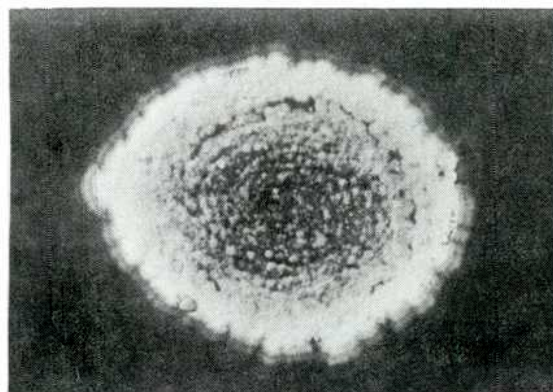


FOTO 77 - CEPA G 1-1

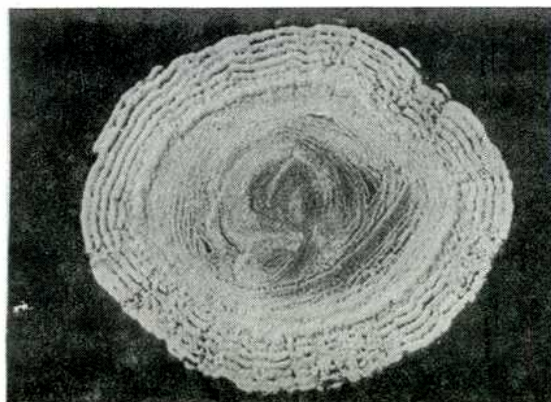


FOTO 78 - CEPA G 2-1

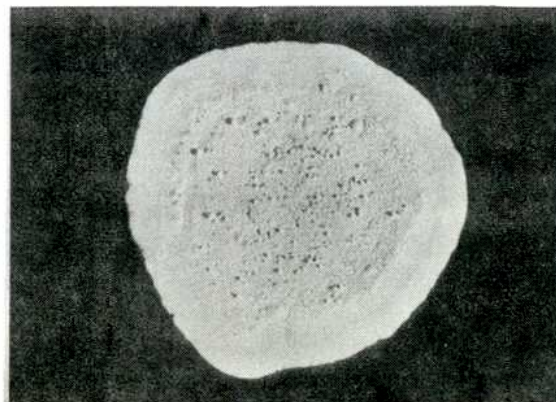


FOTO 79 - CEPA G 2-2

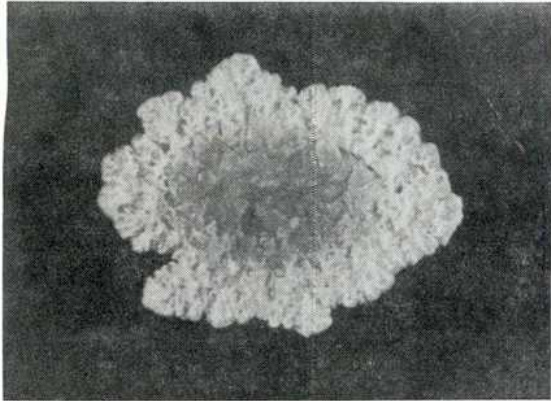


FOTO 80 - CEPA G 2-3

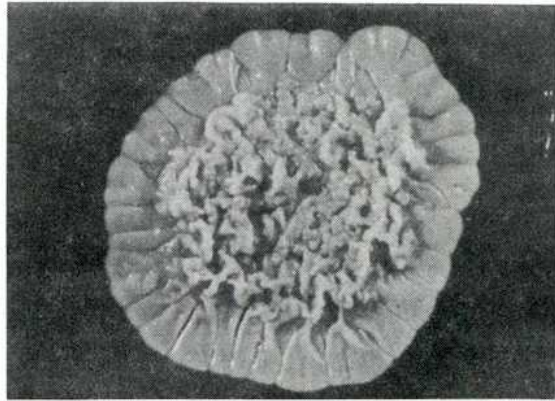


FOTO 81 - CEPA G 2-4

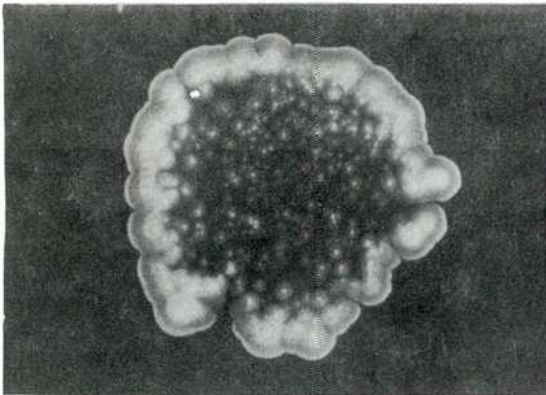


FOTO 82 - CEPA G 5-1

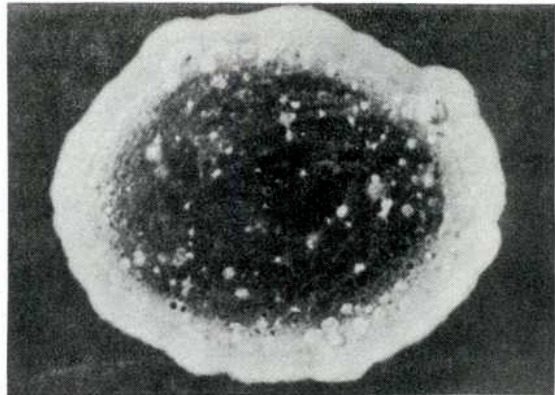


FOTO 83 - CEPA G 8-1

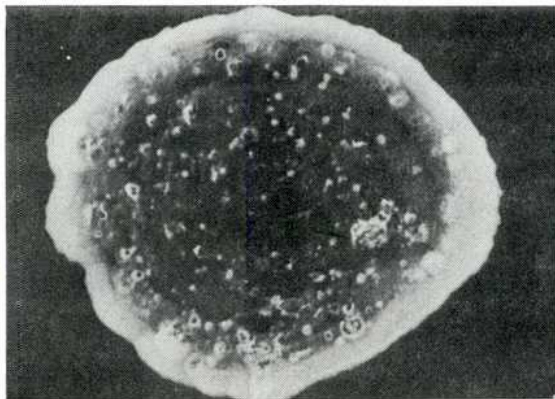


FOTO 84 - CEPA G 8-2

Tabla 63 - Compendio de las características biológicas y morfológicas de las cepas aisladas

Cepa	Color	Esporóf	SH ₂	P.t.a.	Tiros.	Nitrat.	Leche	E.de l.	Pept.	Manita	Arab.	Ramno.	Raf.	Xilosa
1.I	Am.	RF	-	-	-	+	a	+++	+++	-	-	+	+	-
2.I	Am.	RF	-	++	-	+	a	+++	+++	-	+	+	+	+
4.III	Gr.	RF	+	-	+	-	a	+++	+++	+	+++	+	-	+++
5.I	Ro [*]	MV	-	+	+	+	-	+++	+++	-	-	+	+	+
5.II	Ro	RF	+	-	+	+	⊕	+++	+++	-	+	+	-	+++
9.I	Ro	RF	-	++	-	+	AC	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
9.V	Gr.	RF	-	++	-	+	a	+++	+++	-	-	-	+++	-
11.I	Az.	RF	-	-	+++	+	A	+++	+++	+	+++	+++	+++	+
17.I	Gr.	RA	-	+	-	+	a	+++	+++	-	+++	-	-	+++
18.IX	Gva.	RF	-	++	+++	+	A	+++	+++	-	+	+++	-	+++
20.I	Gva.	RF	+	-	-	-	a	+++	+++	-	+	+	-	-
21.V	Am.	RF	-	-	-	-	a	+++	+++	+++	-	-	-	-
23.I	Gva.	RF	+	++	+++	+	AP	+++	+++	-	-	+++	-	+++
25.VI	Gr.	MV	-	-	+++	+	A	+++	+++	-	+++	+++	+	+
A.I	Az. [*]	RA	+	++	-	-	AP	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
A.2	Gr. [*]	RF	-	-	-	-	ACP	++	+++	-	+	+++	-	+
A.3	Az. [*]	RA	+	++	-	-	AP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C.1	Bl.	RF	+	-	+	+	a	+++	+++	+++	+++	+	-	+++
C.2	Gva.	RF	-	++	-	+	aC	+++	+++	-	+	+	+	+

Tabla 63 - (Continuación)

G2-4	Gva.	RF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
G5-1	Bl.	RF	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
G8-1	Bl	RF	+	++	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
G8-2	Bl	RF	+	++	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(Ver referencias en la página siguiente)

Referencias (Tabla 63)

Esporóf: esporóforos

SH₂: sulfhídrico

P.t.a.: pasta de tomate-avena

Tiros.:tirosina

E.de l: extracto de levadura

Arab.: arabinosa

Raf: Rafinosa

Xil: xilosa

1) Color: Color del micelio aéreo esporulante maduro, en medio de agar peptona, agrupado en series básicas de acuerdo con el esquema de Pridham y colaboradores (cita 45) a saber:

Am: serie amarilla

Bl: serie blanca

Gva: Serie gris verdosa-amarillenta

Az:serie azul (del azul, al azul verdoso, al verde)

Ro:serie roja (rosa, rojo, lavanda, gris lavanda)

Gr: serie gris (gris claro, gris ratón, marrón grisáceo)

* :Color en algún medio específico, distinto de peptona.

2) Esporóforos: de acuerdo con el esquema de Pridham y colaboradores (45)

3) Sulfhídrico y nitrato:

+ : positivo; - : negativo; ± dudoso

4) Pasta de tomate avena, extracto de levadura, peptona, manita, arabinosa, ramnosa, rafinosa y xilosa:

- : negativo; + : desarrollo escaso; + + : desarrollo moderado; + + + desarrollo abundante.

5) Tirosina: Pigmento melanoideo producido por acción de la tirosinasa.

- : negativo; + : escaso; + + : moderado; + + + : abundante.

6) Leche

- : negativo; a: alcalinización; A: acidificación; C: coagulación; P: peptonización.

- - - - -

Analizando la tabla 63 encontramos que de las 44 cepas aisladas, 27 (el 61.4 %) no producían sulfuro de hidrógeno, 16 (el 36.4 %) daban reacción positiva y una sola (2.2 %) daba reacción dudosa.

En pasta de tomate avena hubo desarrollo negativo en 19 casos (43.1 %), escaso en 6 cepas (13.6 %), moderado en 14 (31.9 %) y abundante en 5 (11.4 %).

En cuanto a producción de pigmento melanoideo en medio de tirosina por acción de la tirosinasa, la reacción fue negativa en el 31.9 % de las cepas aisladas, escasa en 9 cepas (20.3 %), moderada en 7 (15.9 %) y abundante en 14 (31.9 %).

Se observó reducción de nitratos a nitritos en el 72.7 % de las cepas estudiadas.

En leche, un 4.5 % de las cepas dió reacción negativa, un 31.9 % alcalinizó el medio, un 11.4% dió alcalinización y coagulación, un 2.3 % alcalinizó la leche con coagulación y peptonización, un 2.3 % mostró alcalinización y peptonización sin previa coagulación, un 18.2 % acidificó el medio, un 4.5 % mostró acidificación y coagulación, un 13.6 % dió acidificación, coagulación y peptonización, un 9.0 acidificó y peptonizó el substrato y un 2.3 % dió coagulación sin modificar el pH.

En extracto de levadura y en peptona hubo crecimiento abundante en el 86.3 % y el 90.9 % respectivamente de los casos, demostrando ser los mejores substratos para el desarrollo de los Streptomyces.

En cuanto a los carbohidratos, el 41 % de las cepas no utilizaron manita, y el resto lo hicieron con desarrollos entre escaso y moderado.

El desarrollo en arabinosa fue negativo en el 31.9 % de las cepas, escaso en el 25.0 % moderado en el 29.5 % y abundante en el 13.6 % restante.

En ramnosa hubo desarrollo negativo en un 20.3 %, escaso en un 22.8 %, moderado en un 25.0 % y abundante en un 31.9 %.

En rafinosa no se observó desarrollo en 22 de las cepas estudiadas (50 %), siendo escaso en 9 cepas (20.3 %) moderado en 8 (18.2 %) y abundante en las 5 restantes (11.4%).

En xilosa hubo desarrollo negativo en el 18.2 % de las observaciones, escaso también en el 18.2 % y el resto se repartió entre moderado y abundante (31.8 % en cada caso). En cuanto al color, predominaron las series blanca y gris, cada una con un 27.2 % del total de las cepas, siguiendo en orden la gris-verdosa-amarillenta (15.9 %), la roja y la azul (cada una con un 11.4 %) y finalmente la amarilla con un 6.9 %.

Con respecto a los esporóforos fue característica la serie RF en el 72,8% de los aislamientos, dividiéndose el resto entre MV y RA.

Hemos considerado de interés incluir las fotografías de las coloraciones de Gram y de las colonias gigantes, como una guía adicional para la evaluación de las cepas.

- - - - -

Efectuando un cuidadoso estudio comparativo con las once cepas de colecciones de cultivo oficiales y con los esquemas del Manual Bergey (3), de Pridham, Hesselstine y Benedict (45), de Gottlieb (100), de Benedict, Pridham, Lindenfelser, Hall y Jackson (39), de Pridham y Gottlieb (38) y de Kurosawa, Kuroya e Ishida (125), se han clasificado las cuarenta y cuatro cepas aisladas como sigue:

- 1) Cepa 1 I: Streptomyces alboflavus - Según: (45) y (3)
- 2) Cepa 2 I: Streptomyces alboflavus - Según: (45) y (3)
- 3) Cepa 4 III: Streptomyces bikiniensis. Según: (45) y (3).
- 4) Cepa 5 I: Streptomyces venezuelae. Según: (45) y (3)
- 5) Cepa 5 II: Streptomyces lavendulae. Según: (45) y (3), (38) y (125).
- 6) Cepa 9 I: Streptomyces oidiosporus. Según: (45) y (3).
- 7) Cepa 9 V: Streptomyces griseolus. Según: (3) y (45)
- 8) Cepa 11-I: Streptomyces coelicolor. Según: (3), (45) y (39)
- 9) Cepa 17-I: Streptomyces aureofaciens. Según: (3), (39) y (45).
- 10) Cepa 18-IX: Streptomyces viridocromogenes. Según: (3) y (45)
- 11) Cepa 20-I: No se logró clasificar. Según (45) pertenece a la Sección RF, Serie Gva.
- 12) Cepa 21-V: Streptomyces viridoflavus. Según: (3) y (45).
- 13) Cepa 23-I: No se logró clasificar. Según (45) se ubica en la Sección RF, Serie Gva.
- 14) Cepa 25-VI: Streptomyces griseoflavus. Según: (3) y (45).

- 15) Cepa A-1: Streptomyces chartreusis. Según: (45) y (100).
- 16) Cepa A-2: Streptomyces olivaceus. Según: (45) y (3) y comparación con cepa tipo NRRL B-1125.
- 17) Cepa A-3: Streptomyces chartreusis. Según: (45) y (100).
- 18) Cepa C-1: No se logró clasificar. Según (45) pertenece a la Sección Rf, serie bl.
- 19) Cepa C-2: Streptomyces rimosus. Según: cepa tipo NCIB 8229.
- 20) Cepa E-1: Streptomyces viridocromógenes. Según: (3) y (45).
- 21) Cepa F1-1: Streptomyces chrysomallus. Según: (3) y (45).
- 22) Cepa F1-2: No se logró clasificar. Según (45): Sección: MV; Serie Az.
- 23) Cepa F1-3: Streptomyces griseoflavus. Según: (3) y (45).
- 24) Cepa F1-4: No se logró clasificar. Según (45) corresponde a la Sección: MV, Serie Az
- 25) Cepa F1-5: Streptomyces griseoflavus. Según: (3) y (45).
- 26) Cepa F1-6: Streptomyces fradiae. Según: (3), (45) y (38).
- 27) Cepa F2-1: No se logró clasificar. Según (45) corresponde a la Sección:RF, Serie B1
- 28) Cepa F2-2: Streptomyces albus. Según (3), (45) y (38).
- 29) Cepa F2-3: Streptomyces griseoflavus. Según: (3) y (45).
- 30) Cepa F2-4: Streptomyces globisporus. Según: (3) y (45).
- 31) Cepa F2-5: Streptomyces coelicolor. Según cepa tipo NCTC 2300.
- 32) Cepa F2-6: Streptomyces olivaceus. Según: (45), (3) y cepa tipo NRRL B-1125.
- 33) Cepa F3-1: Streptomyces alboniger. Según: (3) y (45).
- 34) Cepa F3-2: Streptomyces bikiniensis. Según: (3) y (45).
- 35) Cepa F3-3: Streptomyces globisporus. Según: (3) y (45).
- 36) Cepa F3-4. Streptomyces lavendulae. Según: (45), (3) y cepa tipo NCIB 9000.
- 37) Cepa G1-1: Streptomyces abikoensis. Según: (3) y (45).
- 38) Cepa G2-1: Streptomyces californicus. Según: (3) y (45).
- 39) Cepa G2-2: Streptomyces alboniger. Según: (3) y (45).
- 40) Cepa G2-3: Streptomyces albus. Según (3), (38) y cepa tipo NCTC 1569.
- 41) Cepa G2-4: Streptomyces griseus. Según (3), (45), (38) y cepa tipo NCTC 6961.

- 42) Cepa G5-1: Streptomyces abikoensis. Según: (3) y (45).
- 43) Cepa G8-1: Streptomyces bikiniensis. Según: (3) y (45).
- 44) Cepa G8-2: Streptomyces globisporus. Según: (3) y (45).

- - - - -

Sobre 44 aislamientos se encontraron 10 cepas únicas, 8 duplicadas, 2 triplicadas y 1 cuadruplicada, correspondiendo en total a 22 especies distintas. No se logró determinar la especie en 6 de las cepas aisladas, ubicándolas solamente en Secciones y Series, de acuerdo con el esquema de Pridham (45).

- - - - -

La ardua tarea de clasificar especies dentro del género Streptomyces con la ayuda de las claves hasta el momento en uso, se ve dificultada por las variaciones en las características morfológicas que sufren estos organismos por sucesivos pasajes en el laboratorio.

Un ejemplo de ello, ilustrado en la Foto 85, es la cepa 11-I, clasificada como Streptomyces coelicolor. En la ilustración, B) indica el desarrollo obtenido por siembra en agar nutritivo (ver apéndice) de la cepa conservada en suelo estéril durante 18 meses. Las colonias presentaron micelio aéreo azul, micelio substratal rojo y pigmento soluble azul intenso.

C) muestra un repique en el mismo agar nutritivo, ahora con micelio substratal blanco, sin micelio aéreo y sin pigmento soluble.

A) muestra otro repique, en el medio usado anteriormente, a partir del original B), con micelio aéreo y substratal celeste y pigmento soluble azul verdoso.

La Foto 86 ilustra las reacciones bioquímicas utilizadas para la clasificación de las cepas.

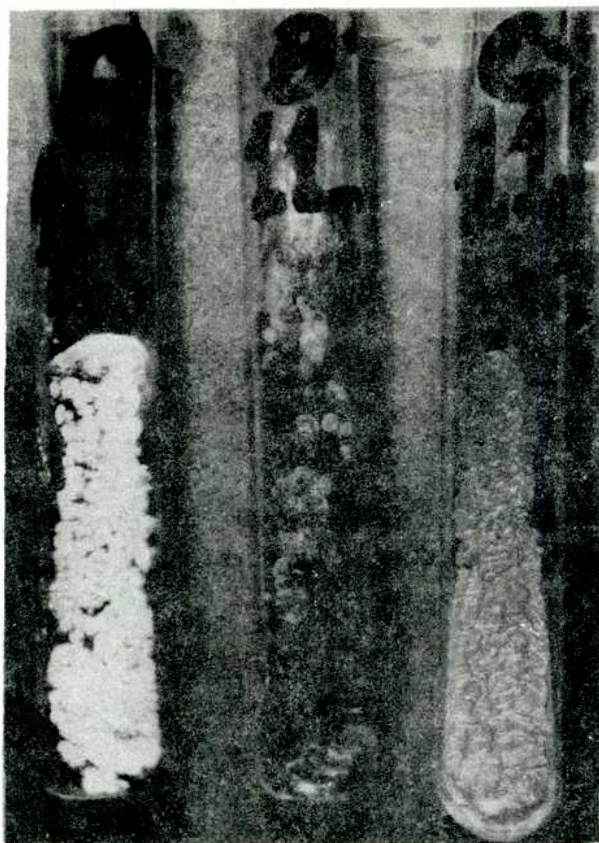


FOTO 85

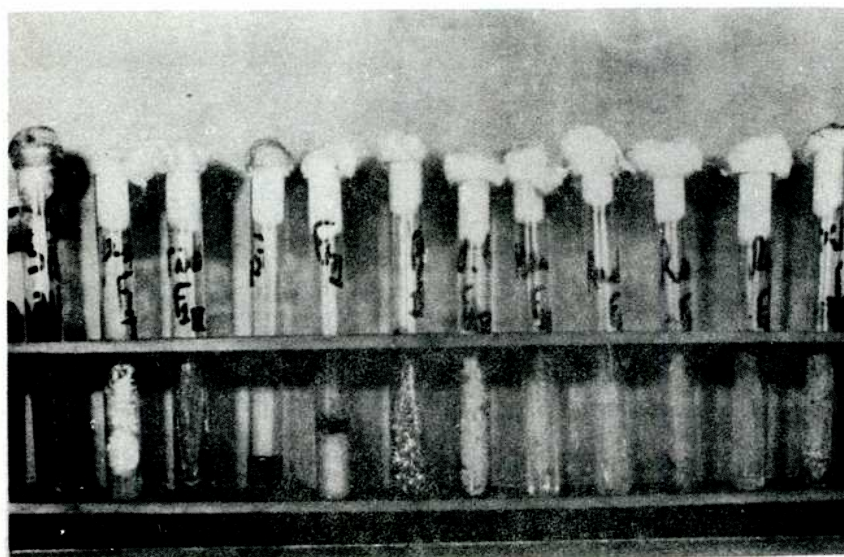


FOTO 86

6.VIII- Somero estudio al microscopio electrónico.

Con tres de las cepas aisladas, la F2-4, la F1-6 y la 23-I se efectuó un breve estudio al microscopio electrónico, con el fin de conocer la estructura de los esporos en lo que atañe a la presencia de apéndices característicos en su superficie (123). Para la ejecución de los preparados se tomaron cultivos bien esporulados en medio de agar extracto de levadura, suspendiendo un trozo de colonia en :a) agua destilada estéril y b) tween-80 al 1% en agua destilada estéril. Las grillas recubiertas con una membrana de colodion fueron cubiertas con las suspensiones en los medios citados y luego desecadas durante 24 horas a 37°C fueron observadas al microscopio electrónico. No se encontraron esporos en las suspensiones en tween 80, mientras que con las primeras se obtuvieron resultados satisfactorios.

Las fotos 87, 88, 89 y 90 corresponden a la cepa F2-4 (Aumento 4x). La foto 91 muestra los esporos de la cepa F1-6. Las fotos 92, 93, 94 y 95 corresponden a la cepa 23 I, teniendo respectivamente los aumentos de 4x, 5x, 4x y 4x.

Agradecemos la colaboración de los Dres. Oscar Vilar y Alberto Solari, de la Cátedra de Histología de la Facultad de Medicina, quienes efectuaron las observaciones al microscopio electrónico.

- - - - -

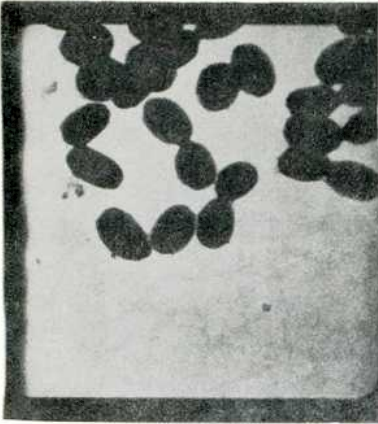


FOTO 87



FOTO 88



FOTO 89



FOTO 90

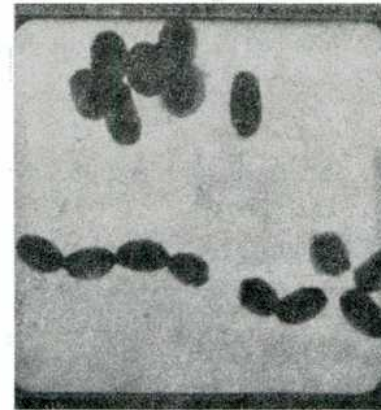


FOTO 91

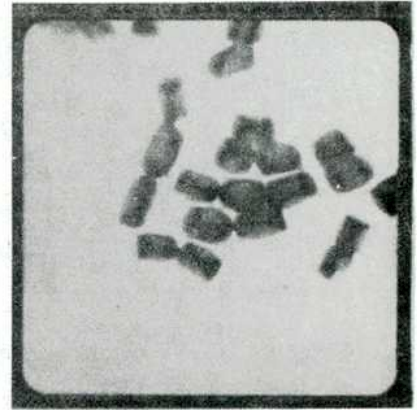


FOTO 92

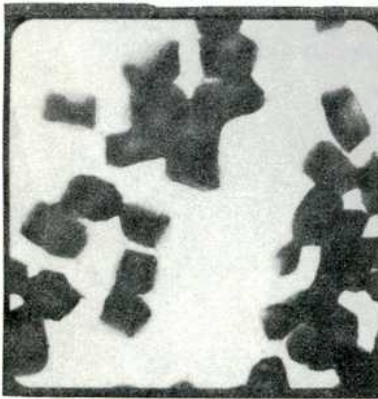


FOTO 93

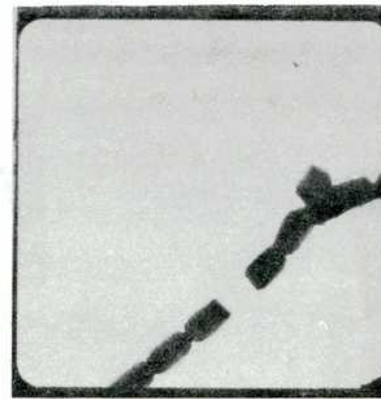


FOTO 94

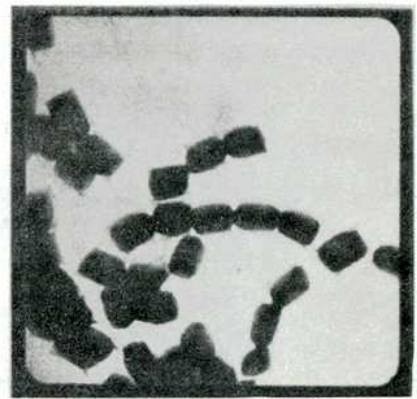


FOTO 95

6. IX Investigación del poder antibiótico de las cepas aisladas.

Para los ensayos del poder antibiótico de nuestros aislamientos se empleó el método de screening por estría múltiple, ensayando cada organismo potencialmente antagónico contra microorganismos Gram negativos, Gram positivos, ácido resistentes, esporulados, levaduras y hongos. Dichos organismos de prueba fueron los siguientes:

- 1) Escherichia coli. ATCC 10536
- 2) Staphylococcus aureus. ATCC 6538
- 3) Mycobacterium phlei. (Colección Cátedra de Microbiología - Facultad de Medicina - Buenos Aires)
- 4) Bacillus subtilis. ATCC 6633.
- 5) Sacharomyces cerevisiae (Colección Cátedra de Microbiología - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires)
- 6) Trychophyton mentagrophytes (Colección Cátedra de Microbiología - Facultad de Medicina - Buenos Aires).

Se prepararon cajas de Petri con 20 ml de agar nutritivo común (ver apéndice) adicionado con 5% de glicerina para permitir el crecimiento del *M. phlei*. En la parte media de la capa de agar se efectuó un corte en forma de canaleta, de 5 mm de ancho y se rellenó con una suspensión de esporos de la cepa particular en estudio en el mismo medio basal. Luego de cuatro días de incubación a 28°C las placas fueron sembradas con los distintos organismos de prueba e incubadas durante 4 días más a 37°C. Se tabuló en milímetros la zona de inhibición de cada microorganismo de prueba.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 64

Cepas de Streptomyces	Zonas de inhibición en milímetros					
	E. coli	S.aureus	B.subtilis	M.phlei	S.cerevi- ciae	Trych. mentagr.
1-I	-	-	-	10	-	-
2-I	-	-	-	-	-	-
4-III	-	10	20	10	-	-
5-I	-	-	-	-	-	-
5-II	-	-	-	-	-	-
9-I	-	-	-	-	-	-
9-V	-	-	-	-	-	-
11-I	-	-	-	4	-	-
17-I	-	-	-	-	-	-
18-IX	-	-	-	-	-	-
20-I	-	-	-	-	-	-
21-V	-	-	-	-	-	-
23-I	-	-	2	-	-	-
25-VI	-	2	2	-	-	-
A-1	-	-	-	-	-	-
A-2	-	-	-	12	-	5
A-3	-	-	-	7	-	6
C-1	-	15	-	-	-	-
C-2	18	-	20	15	-	30
E-1	-	-	-	-	-	-
F1-1	-	-	-	18	-	-
F1-2	4	10	2	-	-	-
F1-3	-	20	-	-	-	-
F1-4	-	-	-	-	-	4
F1-5	-	-	-	20	-	-
F1-6	-	-	-	-	-	4
F2-1	-	-	-	20	-	-
F2-2	-	-	-	-	-	-
F2-3	-	20	-	-	-	-
F2-4	-	-	-	-	-	26
F2-5	-	-	1	15	-	-
F2-6	-	-	-	12	-	5
F3-1	-	-	-	4	-	2
F3-2	-	20	-	-	-	-
F3-3	-	-	-	10	-	-
F3-4	-	18	18	20	6	10
G1-1	-	18	-	13	-	2
G2-1	-	3	4	-	2	-
G2-2	-	-	11	-	-	9
G2-3	-	-	-	-	-	-
G2-4	-	-	-	-	-	-
G5-1	12	15	17	-	-	18
G8-1	-	15	-	-	-	-
G8-2	-	20	-	3	-	-

Observando la tabla se ve que 15 cepas no presentan poder antibiótico (9 de las cuales corresponden al primer aislamiento y han sido conservadas alrededor de 18 meses en el laboratorio, 14 actúan sólo contra un microorganismo, 8 contra dos, 4 contra tres, 1 contra cuatro y una sola también contra cinco de los seis microorganismos de prueba.

Solamente dos cepas de Streptomyces inhibieron el desarrollo de S.cereviciae, tres inhibieron al E.coli, 10 al B.subtilis, 12 al Trychophyton mentagrophytes y 15 al M.phlei.

La Foto 96 ilustra un ejemplo de Streptomyces sin poder inhibitorio sobre ninguno de los seis microorganismos de prueba. Las Fotos 97 y 98 muestran inhibición sobre el Trychophyton mentagrophytes y el M.phlei respectivamente.

En la Foto 99 se aprecia inhibición sobre el B.subtilis, el S.aureus y leve inhibición sobre el S.cereviciae. La Foto 100 ilustra la inhibición sobre E.coli, S.aureus, B.subtilis y Trychophyton mentagrophytes y en la Foto 101 podemos apreciar una inhibición casi total de los organismos de prueba.

El número 1 señala a E.coli, siguiendo en orden el S.aureus, B.subtilis, M.phlei y S.cereviciae. El Trychophyton mentagrophytes se sembró en el lado opuesto.

Comparando los espectros antibióticos obtenidos en cepas clasificadas como especies iguales, puede inferirse la inutilidad del mismo como criterio auxiliar en la clasificación de Streptomyces. Así, por ejemplo, las tres cepas clasificadas como S.bikiniensis inhiben al S.aureus, pero una de ellas también inhibe al B.subtilis y al M.phlei.

De las dos cepas clasificadas como es el S.lavendulae, una de ellas tiene un amplio espectro antibiótico mientras que la otra no manifiesta capacidad antagónica.

Discrepancias análogas se observan en el S.griseoflavus, S.abikoensis, S.alboniger y S.chartreusis.

Para finalizar digamos que el cepario se encuentra a disposición de los interesados.

- - - - -

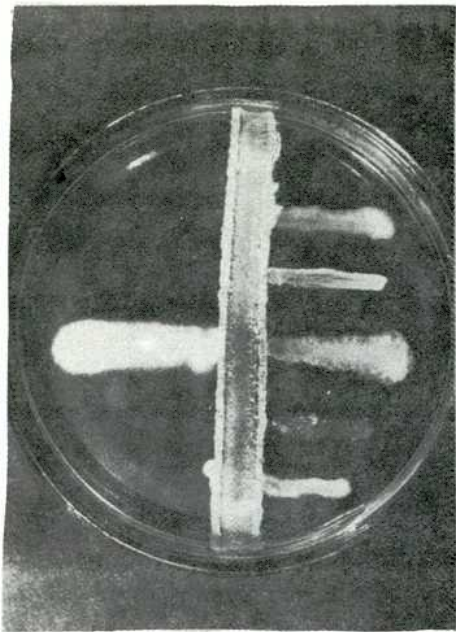


FOTO 96
CEPA G 2-IV

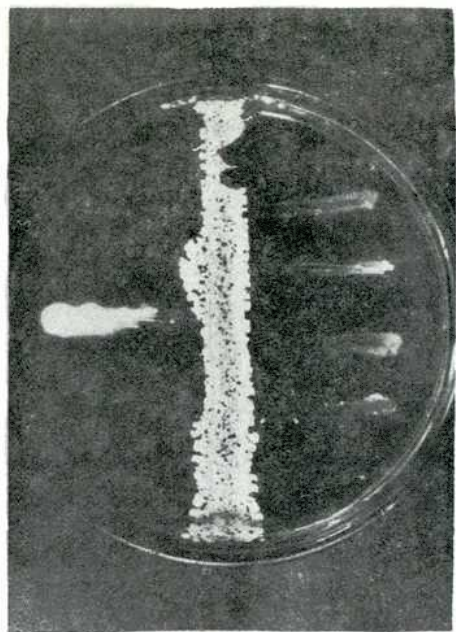


FOTO 97
CEPA F 1-4

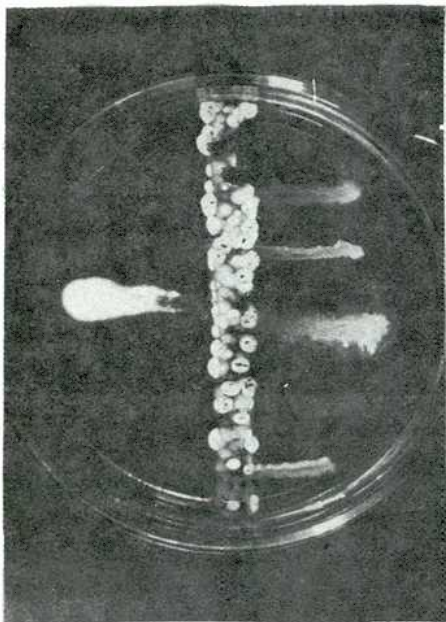


FOTO 98
CEPA F 3-1

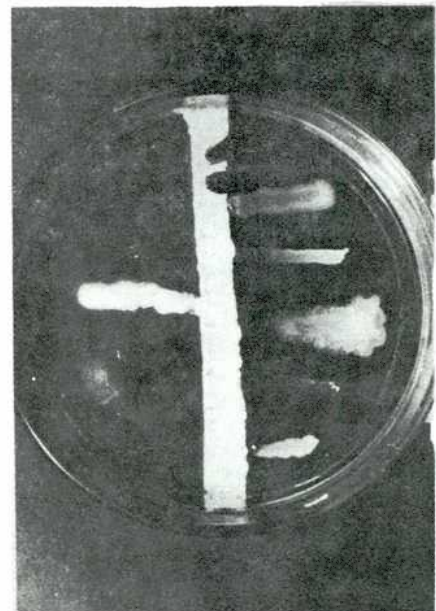


FOTO 99
CEPA G 2-I

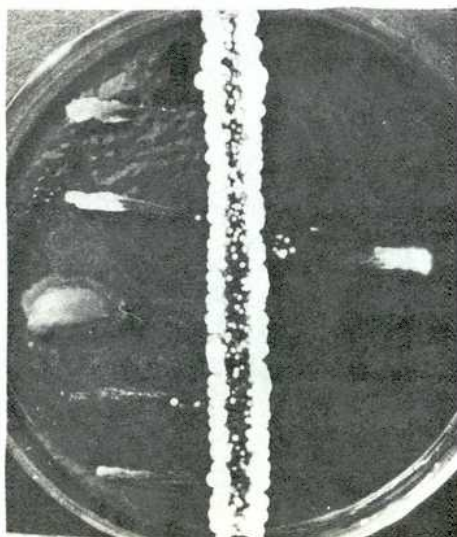


FOTO 100
CEPA G 5-2

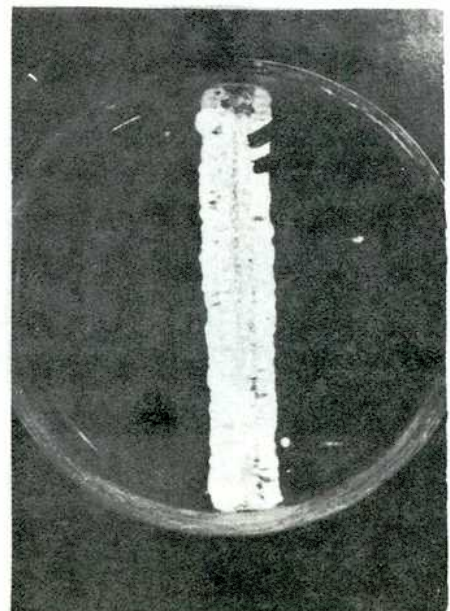


FOTO 101
CEPA C 2

6-X Apéndice - Medios de cultivo (124)

1) Agar Hickey-Tresner

Extracto de levadura..... 1 g.
Extracto de carne..... 1 g.
Sheffield Farms N: Z Amine A..... 2 g.
Cloruro cobaltoso. 7 H₂O..... 20 g.
Dextrina..... 10 g.
Agua destilada.....1000 ml.
Agar..... 20 g.
pH: 7.3

2) Medio de Carvajal con avena

Avena..... 65 g.
Agua destilada.....1000 ml.
Agar..... 20 g.
Filtrar por lienzo antes de agregar el agua. El pH final después de la esterilización es 6.6.

3) Agar asparagina-glucosa.

Asparagina..... 0.5 g.
Extracto de carne..... 2 g
Fosfato dibásico de potasio (anhidro)..... 0.5 g
D-glucosa..... 10 g
Agua corriente.....1000 ml.
Agar..... 17 g.
pH: 6.8

4) Agar almidón con sales inorgánicas

Solución I

Almidón soluble..... 10 g.
agua corriente.....500 ml.

Solución II

Fosfato dibásico de potasio anhidro..... 1 g.
Sulfato de magnesio. 7 H₂O.....1 g.
Cloruro de sodio.....1.g.
Sulfato de amonio.....2 g.
Carbonato de calcio.....2 g.
Agua corriente.....500 ml.
Agar.....20 g.

Mezclar soluciones I y II. No ajustar pH.

5) Agar Czapek

Nitrato de sodio..... 3 g.
Fosfato dibásico de potasio anhidro..... 1 g.
Sulfato de magnesio. 7 H₂O..... 0.5 g.
Cloruro de potasio..... 0.5 g.
Sulfato ferroso. 7 H₂O..... 0.01 g.
Sacarosa..... 30 g.
Agua destilada.....1000 ml.
Agar..... 20 g.

No ajustar pH.

6) Medio de Pridham - Gottlieb (38)

Sulfato de amonio..... 2,64 g.
Fosfato monobásico de potasio..... 2,38 g.
Fosfato dibásico de potasio..... 5,65 g.
Sulfato de magnesio. 7 H₂O..... 1 g.
Sulfato de cobre. 5 H₂O..... 0.0064 g.
Sulfato ferroso. 7 H₂O..... 0.0011 g.
Cloruro de manganeso. 7 H₂O..... 0.0079 g.
Sulfato de cinc. 7 H₂O..... 0.0015 g.
Agar Difco..... 15 g.

Agua destilada..... 1000 ml.

pH: 6.8-7.0

7) Agar pasta de tomate-avena.

Solución I

Alimento infantil de avena..... 20 g.

Pasta de tomate.....20 g.

Agua corriente.....500 ml.

Solución II

Agar..... 15 g.

Agua corriente.....500 ml.

pH: 6.8-7.0

8) Agar extracto de levadura.

Extracto de levadura..... 4 g.

Extracto de malta.....10 g.

D-glucosa..... 4 g.

Agua destilada.....1000 ml.

Agar..... 17 g.

pH: 7.3

9) Gelatina

Peptona..... 5 g.

Glucosa.....20 g.

Gelatina.....100/200 g.

Agua corriente.....1000 ml.

pH: 7.2

10) Agar nutritivo

Peptona..... 5 g.

Extracto de carne..... 5 g.

Cloruro de sodio..... 5 g.

Agar..... 15/20 g.
Agua común.....1000 ml.
pH: 7.2-7.4

11) Agar A

Fosfato dibásico de potasio..... 0.3 g.
Carbonato de magnesio..... 1 g.
Cloruro de sodio..... 0.5 g.
Nitrate de sodio..... 1 g.
Agar..... 15 g.
Agua destilada.....1000 ml.
pH: 7.0

12) Agar almidón A

Agar A + 1% de almidón soluble

13) Agar glucosa A

Agar A + 1% de glucosa.

14) Caldo nitrado.

Peptona..... 5 g.
Extracto de carne..... 3 g.
Nitrate de potasio..... 1 g.
Agua destilada.....1000 ml.
pH: 7.0-7.2

La aparición de color rojo por reacción con ácido sulfanílico y alfa-naftilamina, indica la reducción del nitrate a nitrito. Si no se forma color rojo se añade una punta de espátula de cinc. Si está presente aún el nitrate se reduce a nitrito y aparece el color rojo. Si no aparece después del agregado de cinc ello indica que el nitrate ha sido completamente reducido a productos por debajo del nitrito.

Reactivos

A: ácido sulfanílico: 8 g. de ácido sulfanílico en un litro de ácido acético 5 N.

B) Alfa-naftilamina: 6 gr. de dimetil-alfa-naftilamina en un litro de ácido acético 5 N.

Para efectuar el ensayo mezclar un mililitro de A y un ml de B y agregarlo a un ml. de cultivo.

15) Leche

Púrpura de bromo cresol..... 15 ml.
leche.....1000 ml.

Esterilizar por vapor fluente durante tres días sucesivos. Entre las esterilizaciones el medio se refrigera durante 3 horas y luego se incuba a 28°C.

16) Medio sintético con lactato.

Glucosa..... 7.40 g.
Fosfato monobásico de potasio..... 2.38 g.
Fosfato dibásico de potasio. 3 H₂O..... 5.65 g.
Lactato de amonio..... 5.40 g.
Sulfato de magnesio. 7 H₂O..... 0.98 g.
Sulfato de cinc. 7 H₂O.....11.5 mg.
Sulfato ferroso. 7 H₂O.....11.1 mg.
Sulfato de cobre. 5 H₂O..... 6.4 mg
Cloruro de manganeso. 4 H₂O..... 7.9 mg.
Agua destilada.....1000 ml.

pH: 6.9-7.0

17) Papa

Cuñas de papa en solución fisiológica (8.5 g. de cloruro de sodio por litro)

18) Modificación de Benedict del medio de Lindenbein

Glicerol..... 20 g.
L-arginina..... 2.5 g.
Cloruro de sodio..... 1 g.
Carbonato de calcio..... 0.1 g.

Sulfato ferroso. 7 H₂O..... 0.1 g.
Sulfato de magnesio. 7 H₂O..... 0.1 g.
Agar..... 20 g.
Agua destilada.....1000 ml.

pH: 7.0-7.2

19) Medio basal para utilización de aminoácidos.

Fosfato monobásico de potasio..... 2.38 g.
Fosfato dibásico de potasio. 3 H₂O..... 5.65 g.
Sulfato de magnesio. 7 H₂O..... 1.00 g.
Solución salina..... 6.25 ml.
Agua destilada.....1000 ml.

La solución salina contiene:

Sulfato de cobre. 3 H₂O..... 102 mg.
Sulfato ferroso. 7 H₂O..... 176 mg.
Cloruro de manganeso. 7 H₂O..... 126 mg.
Sulfato de cinc. 7 H₂O..... 24 mg.
Agua destilada..... 100 ml.

pH: 6.8-7.0

20) Medio de Bennett

Harina de soya.....10 g.
glucosa.....10 g.
Cloruro de sodio..... 5 g.
Agua.....970 ml.

pH: 6.8-7.0

21) Medio activante con glicerina

Glicerol..... 20 g.
Asparagina..... 2.5 g.
Cloruro de sodio.....2 g.

Fosfato dibásico de potasio.....1 g.
Sulfato de magnesio 7 H₂O.....0.5 g.
Sulfato ferroso.....0.1 g.
Carbonato de cadmio.....0.2 g.
Agar.....20 g.
Agua destilada.....1000 ml.

pH: 7.2

22) Agar peptona

Peptona 5 g.
Extracto de carne..... 3 g.
Agar..... 20 g.
Agua corriente.....1000 ml.

pH: 7.0-7.2

23) Agar Tirosina

L (-) tirosina.....1 g.
Agar Difco.....15 g.
Agua destilada1000 ml.

pH: 7.0-7.2

24) Agar hierro Difco más 0.1% extracto de levadura

(Producción de hidrógeno sulfurado)

Triptona..... 20 g.
Citrato amónico férrico..... 0.5 g.
Fosfato dibásico de potasio..... 1 g.
Extracto de levadura..... 1 g.
Agar.....15 g.
Agua destilada.....1000 ml.

pH: 6.7

Observar a las 6 y 18 horas. La producción de hidrógeno sulfurado se evidencia por

la presencia de una pronunciada coloración azul-negra en el medio de cultivo.

25) Medio basal para la utilización de carbohidratos.

Idem medio 19, más el agregado de 2.38 gr./1000 de sulfato de amonio. Los carbohidratos se esterilizan por separado y se añaden luego al medio en proporción del 1%.

NOTA: Todos los medios mencionados excepto el de leche, se esterilizan a una atmósfera de presión durante 20 minutos.



Edda Adly

7) BIBLIOGRAFIA

- 1) Waksman S.A.- The actinomycetes: their nature, occurrence, activities and importance. (Annales cryptogamici et phytopathologici) Vol. 9 (1950) (pp.1-230).
- 2) Waksman S.A., and Henrici A.T. J.Bacteriol. 46, 337-341, (1943)
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology - 6th. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore (1948). 7th. Ed. (1958)
- 4) Tsiklinsky P. Ann. Inst. Pasteur, 13, 500-505 (1899)
- 5) Krassilnikov, N.A. Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten - Traducido al inglés por el Dr. Routienne (1959). Gentileza de los Laboratorios Pfizer.
- 6) Gilbert, A. Hyg. 47, 383-406 (1904)
- 7) Klienenberger - Nobel, E. J. Gen. Microbiol, 1, 22-32 (1947)
- 8) Henrici, AT. Bact. Rev., 5, 97-179 (1941)
- 9) Lindergren, C.C. and Lindergren G. Botan. Gaz. 105, Nº 3, 304-316 (1944)
- 10) Waksman S.A. Soil Sci. 8, 71-215 (1919)
- 11) Lieske, R. Morphologie und Biologie der Strahlenpilza - G. Borntraeger-Leipzig(1921)
- 12) Benedict, R.G. and Lindenfelser L.A. Antibiotics and Chemotherapy, 1, 512-517(1951)
- 13) Heim, A.H. and Mencher, J.R. J. Gen Microbiol. 28, Nº 4, 665-670 (1962)
- 14) Waksman S.A. and Lechevalier H.A. Actinomycetes and their antibiotics - Williams and Wilkins Co. Baltimore (1953)
- 15) Bradley S.G. Appl. Microbiol. 7, Nº2, 89 (1959)
- 16) Kelner, A. J.Bacteriol., 57, 73.92 (1949)
- 17) International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy. 10, (Suplement Nº2 (1960)
- 18) Cummins, C.S. and Harris, H. J.Gen. Microbiol, 18, 173.189 (1958)
- 19) Pridham, T.G. Inter. Bull. Bacteriol.Nomen. and Taxon. 12, Nº 3, 123.126 (1962)
- 20) Nishimura, H., Mayama M. and Tawara K. J.Antibiotics, Ser.A, 10, Nº4, 228 (1960) (Japan).
- 22) Gauze, G.F. The search for new antibiotics - New Haven. Yale University Press (1960)

- 23) Gauze G.F. Science, 127, 506 (1958)
- 24) Bresèle J. Ann. N.Y. Acad.Sci. 58, Art.7,1-129 (1954)
- 25) Bresèle J. Mitotic poisson and the cancer problem. Amsterdam - Elsevier (1958)
- 26) Anti-tumour substancies of actinomycetes (a review) Giornal.Microbiol.2,160 (1956).
- 27) Negróni P. Morfología microscópica y sistemática de los Actinomycetes - VI Congreso Internazionale di Microbiología. Actinomycetales. Suppl. Rend.Ist. Sup.di Sanita-Roma (1953).
- 28) Porter, J.N., Wilhem J.J. and Tresner, H.D.- Appl.Microbiol.,8,Nº3, 174 (1960)
- 29) Crook, P., Carpenter C.C. and Klens, P.F. Science, 112, 656 (1950)
- 30) Corke, C.T. and Chase F.E. Can.J. Microbiol., 1, 12-16, (1956)
- 31) Dulaney, E.L., Larsen, A.H. and Stapley E.O. Mycologia, 47,420-422 (1955)
- 32) Benedict, R.G., Pridham, T.G., Lindenfelser, L.A., Hall, H.H. and Jackson R.W. Appl. Microbiol., 3, 1-6 (1955)
- 33) Lindenbein, W. Arch.Microbiol., 17, 361-383 (1952)
- 34) Kelner, A.J. Bacteriol., 56, 157-162 (1948)
- 35) Niño, F.L. Secciones de Micología Médica. Ed.Cajica (1960)
- 36) Pridham, T.G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L.A., Hesseltine C.W. and Benedict, R.G. Antibiotics Annual, pag.947-953 (1957).
- 37) Tresner, H.D., Danga F. and Porter, J.N. Appl. Microbiol. 8, Nº 6, 339 (1960)
- 38) Pridham, T.G. and Gottlieb, D.J. of Bacteriol., 56, Nº1, 107.114 (1948)
- 39) Benedict, R.G., Pridham, T.G., Lindenfelser, L.A., Hall H.H. and Jackson, R.W. Appl. Microbiol. 3, Nº1, 1-6 (1955)
- 40) Waksman, S.A. J. Bacteriol. 4, 307.330 (1919)
- 41) Pridham, T.G., Hall H.H. and Shekleton, M.C. Bact. Proc. pág. 27-28 (1951)
- 42) Kurosawa H. J.Antibiotics (Japan) 4, 183-193 (1951)
- 43) Okami, Y. J. Antibiotics (Japan) 5, 477-480 (1952)
- 44) Dulaney, E.L. Mycologia 41, 1-10 (1949)
- 45) Pridham T.G., Hesseltine C.W. and Benedict, R.G. Appl. Microbiol. 6, 52.79 (1958)

- 46) Krainsky, A. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. II Abt., 41, 649-688 (1914)
- 47) Waksman, S.A. and Curtis, R.E. Soil Sci. 8, 71-215 (1916)
- 48) Dreschsler, C. Botan. Gaz. 67, 65-83; 147-169 (1919)
- 49) Waksman, S.A. Soil Sci., 8, 71-215 (1919)
- 50) Millard, W.A. and Burr, S. Ann. Appl. Biol. 13, 580-644 (1926)
- 51) Jensen, H.L. Soil Sci., 30, 59-77 (1930)
- 52) Duché, G. Les actinomyces du groupe albus. Encyclopédie Micologique - Vol.6 - Lechevalier et Fils. Paris - France (1934).
- 53) Waksman, S.A. and Henrici, A.T. Familia III, Streptomycetaceae. pp.929-980. En (3) (1948)
- 54) Krassilnikov, N.A. Determination of bacteria and Actinomyces - Acad. Sci. Inst. Microbiol. Moscow-Leningrad. U.R.S.S. (1949)
- 55) Baldacci, E., Comaschi, G.F., Scotti, T and Spalla, C. Rend. Ist. Super. Sanità (Roma), pp.20-29 (1953).
- 56) Baldacci, E., Spalla, C., and Grein, A. Arch. Mikrobiol, 20, 347-357 (1954)
- 57) Hesseltine, C.W., Benedict, R.G. and Pridham, T.G. Ann. N.Y. Acad. Sci., 60, 136-151 (1954)
- 58) Yamaguchi T. and Saburi Y. J. Gen. Appl. Microbiol. (Japan) 1, 201-235 (1955)
- 59) Gauze, G.K., Preobrazhenckaya, T.P., Kudrina, E.S., Blinov, N.O., Ryabova, I. David Sveshnikowa, M.A. Problems on classification of actinomycete - antagonists. Inst. for Research of New Antibiotics, Acad. Med. Sci.; National Press of Medical Literature, Medzig, Moscow, U.R.S.S. (1957).
- 60) Krassilnikov, N.A. J. Antibiotics, Ser. A, XIII-4, 217, (1960).
- 61) Gottlieb, D. Int. Bull. of Bacteriol. Nomenclature, 9, N°1, 13 (1959).
- 62) Küster, E. Int. Bull. of Bacteriol. Nomenclature, 9, N° 1, 15 (1958)
- 63) Welsch, M. Int. Bull. of Bacteriol. Nomenclature and Taxonomy. 9, N°1, 27-29 (1959)
- 64) Bradley, S.G. and Anderson, D.L. Science, 128, 413 (1958)
- 65) Welsch, M., Corbaz, R. and Ettienger, L. - Schewiz. Z. Path. Bacteriol. 20, 454-458 (1957)

- 66) Welsch, M. and Pinkaers. C.R. Soc. Biol. 151, 1283 (1957)
- 67) Ettlienger and cols. Giorn. Microbiol., 2, 91 (1956)
- 68) Welsch, M. Giorn. Microbiol., 1, 339 (1956)
- 69) Welsch, M. Virology, 2, 703 (1956)
- 70) Bull. Res. Council. Israel, 7 E, 141 (1958)
- 71) Welsch, Minon and Schönfeld. Experientia, 11, 24, (1955)
- 72) Hütter, P. Intern. Bull. of Bacteriol. Nomenclature and Taxonomy 9, N°1, 31-34 (1959)
- 73) Küster, E. Intern. Bull. Bacteriol. Nomenclature and Taxonomy 9, N°2 (1959)
- 74) Krassilnikov, N.A., Intern. Bull. Bacteriol. Nomenclature Taxon. 9, N°2, 63-64 (1959)
- 75) Wallhäusser, K.H. Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon. 9, N°2, 65-71 (1959)
- 76) Kutzner, H.J. Intern Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon. 9, N°2, 79-80 (1959)
- 77) Waksman, S.A. Intern Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon. 9, N°2, 73-78 (1959).
- 78) Baldacci, E. Inter. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon. 9, N°2, 81-87 (1959)
- 79) Burkholder, P.R., Sun, S.H., Ehrlich, J. and Anderson J.L. Ann. N.Y. Acad. Sci. 60, 102 (1954).
- 80) Kriss, A.E. (Acad. Sci. Inst. Microbiol. Moscow. Leningrad. (1945)
- 81) Flaig, W., Küster, E. and Bentelspacher, H. Zbl. Bakt. II, 108, 376 (1955)
- 82) Küster, E. Atti VI Congr. Int. Microbiol., Roma 1, 114 (1953)
- 83) Küster, E. Zbl. Bakt. II, 108, 376 (1955)
- 84) Baldacci, E. and Grein, A. Giorn. Microbiol. 1, 28, (1955).
- 85) Baldacci, E., Gilardi, E. and Amici, A.M., Giorn. Microbiol, 1, 512 (1956)
- 86) Baldacci, E., Balduzzi P. and Amici, A.M. Bull. Res. Council Israel. Sect. D, 5, 263 (1957)
- 87) Flaig, W. and Kutzner, H.J. Naturwiss, 41, 267, (1954)
- 88) Kutzner, H.J. Beitrag zur Systematik und Ökologie der Gattung Streptomyces Waksman et Henrici-Diss. Landw. Hochschule, Hohenheim (1956).
- 89) Waksman, S.A. Bacteriol. Rev. 21, 1-28 (1957)
- 90) Nonomura, H. and Ohara Y. J. Ferment. Technol (Japan). 35, 307 (1957)

- 91) Couch, J.N. J.Elisha Mitchell Sci.Soc. 71, 148 (1955)
- 92) Henssen, A. Arch. Microbiol. 26, 373 (1957)
- 93) Baldacci, E. Giorn. Microbiol. 2, 50 (1956).
- 94) Ciferri, R. Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon. 9, N°2, 89-91 (1959)
- 95) Okami, Y., Hashimoto, T. and Suzuki, M. J. Antibiotics, XIII, N°4, 223 (1960) (Japan)
- 96) Nomi, Ryosaku. J. Antibiotics, Ser. A., XIII, N° 4, 236-247, (1960) (Japan)
- 97) Sánchez Marroquin, A. "Importancia Industrial del Género Streptomyces"- Conferencia pronunciada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Buenos Aires - 24/5/1961.
- 98) Sánchez Marroquin, A. Comunicación personal.
- 99) The ISCC-NBS Method of Designating Colors National Bureau of St. Circular 553. United States Dep. of Commerce. Washington, D.C.
- 100) Gottlieb, D. Appl. Microbiol., 9, N° 1, 55-65 (1961)
- 101) Cummins, C.S., Ann. Inst. Pasteur, 103, N° 3 (1962).
- 102) Romano, A.H. and Sohler, A. J. Bacteriol., 72, 865-868 (1956)
- 103) Cummins, C.S. and Harris, H. J. Gen Microbiol., 15, 9-10 (1956)
- 104) Warnir, A.R. La era de los antibióticos - Ed. Antonio Zamora - Buenos Aires (1960).
- 105) Tyndall, G. Trans. Roy. Soc. (London) 166, 27-74, (1876)
- 106) Papacostas, G. et Gaté G. Les associations microbiennes, leurs applications thérapeutiques. O. Doin - Paris (1928)
- 107) Waksman, S.A. Antib. and Chems. 6, 90 (1956)
- 108) Waksman, S.A., Bugie, E. and Reilly, H.C. Proc. Staff Meetings Mays. Clinic., 19, 537-548 (1944).
- 109) Gasperini, G. Ann. Microgr. 2, 449-474 (1890)
- 110) Greig-Smith, R. Proc. Linn. Soc. N.S. Wales, 42, 162-166 (1917)
- 111) Lieske, R. Kolle and Wasserman's Handbook der pathogenen Mikroorganismen - 3a. ed. (1928)
- 112) Gratia, A. and Dath, S. (1923-1926) C.R. Soc. Biol. 91, 1442-1943; 92, 461; 1125-1126, 93, 451; 94, 1267.

- 113) Waksman, S.A. and Woodruff, H.P. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 45, 609-614 (1940)
- 114) Gardner, A.D. and Chain, E. Brit. J. Exptl. Pathol. 23, 123-127 (1942)
- 115) Johnstone, D.B. and Waksman, S.A. J. Bacteriol, 55, Nº 3 (1948)
- 116) Vuillemin, P., Lechevalier, H. and Waksman, S.A. Suppl. Rend. Ist. Sup. Sanità (Roma) pp.147-173 (1953)
- 117) Thornton, H.G. and Skiner, F.A. Suppl. Rend. Ist. Sup. Sanità (Roma) pp.174-190 (1953).
- 118) Reilly, H.C., Schatz, A. and Waksman, S.A. J. Bacteriol., 49, 585-594 (1945)
- 119) Pratt, R. and Dufrenoy, J. Antibiotics - Lippincott Company (1953)
- 120) Ferguson, J.H., Huang, H.T. and Davisson, J.W. Appl. Microbiol., 5, Nº 5, 339 (1957)
- 121) U.S. Pharmacopeia - Tomo XVI (1960)
- 122) Munsell Book of Color. Standard Edition. Munsell Color Company, Inc. Baltimore, Maryland (1929) (Gentileza de Alba S.A., Buenos Aires)
- 123) Flaig, W.F., Küster, E. and Bentelspacher, H. Zentral. Bakt. (Jena) 108, 376-382 (1955)
- 124) Hickey, R. J. and Tresner, H.D. J. Bacteriol. 64, 891-892 (1952)
- 125) Kurosawa H., Kuroya M. and Ishida N. J. Antibiotics (Japan) 3, 879-880 (1950).
