

CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIDIA Y MODIFICACIONES DE LA REACCIÓN ACTUAL DEL MEDIO DE CULTIVO

por

JOSÉ VIDAL

ISIDORO GARCÍA

A medida que se profundiza en los mecanismos inmunitarios, se ve que no todos los estados de las bacterias tienen la misma aptitud para crear defensas eficaces. Se sabe de una manera cierta que los esporos, mientras no germinan, son incapaces de ejercer su función patógena y, por consiguiente, colaborar a la formación de inmunidad. Este criterio, claramente demostrado en el tétanos, se va perfilando en la infección carbuncosa. Hoy ya nadie pone en duda que es el protoplasma microbiano, en su forma vegetativa, la substancia de que se vale el organismo infectado o inoculado para crear sus defensas. Por este motivo, son ya varios los investigadores que utilizan para fines de profilaxia cultivos de bacteridias en su forma bacilar.

Y para conseguir este momento o esta modalidad del anthracis, es preciso disponer de las formas anesporógenas del mismo, cuidando de mantener su virulencia, porque este estado bacilar pierde con gran rapidez su poder patógeno.

Pero ofrece otro escollo la utilización de las bacterias anesporógenas, que radica en su poca vitalidad en los medios artificiales de cultivo.

Con el propósito de obviar este inconveniente y precisar las condiciones mejores para ser empleada esta forma bacilar, hemos realizado unas experiencias con el fin de obtener una respuesta natural a estas dos cuestiones : ¿Cuál es el pH más conveniente a la anesporógena? ¿Cuál es el tiempo mejor para ser utilizada?

VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN EL CRECIMIENTO Y GRADO DE ALCALINIDAD POR UN CULTIVO DE BACTERIA ANESPORÓGENA DE pH PRIMITIVO 8

Cuadro n.º 1, correspondiente al primer ensayo

FECHA DE OBSERVACIÓN			Tiempo del cultivo Días	Gérmenes por c. c.	pH
Día	Mes	Año			
11	VII	1932	2	792,000	»
13	—	—	4	3.083,000	»
15	—	—	6	6.132,000	»
18	—	—	8	6.196,000	»
21	—	—	12	6.528,000	»
23	—	—	14	18.700,000	»
25	—	—	16	19.540,000	»
27	—	—	18	14.600,000	»
29	—	—	20	17.590,000	»
31	—	—	22	9.360,000	»
4	VIII	—	26	8.620,000	»
6	—	—	28	14.510,000	»
3	IX	—	40	5.270,000	»
10	VIII	—	16	»	8'2—8'4 (Thymolblau)
15	—	—	21	»	8'4 —
20	—	—	26	»	8'4 —
26	—	—	32	»	8'6 —
29	—	—	32	4.500,000	» —
31	—	—	37	»	8'4 —
6	IX	—	42	»	8'2—8'4

Hicimos un primer ensayo sembrando bacterias anesporógenas en dos series de tubos de caldo pepto-

nado, a concentración de pH distinto. Una serie es ajustada a pH 8, y la otra a pH 7'2. Pasadas veinticuatro horas de estufa a 37°, guardamos los tubos a la temperatura del laboratorio para hacer, seriadamente, recuento de los gérmenes vivos que contienen nuestras dos pruebas.

Los cuadros que adjuntamos (números 1 y 2) son bien demostrativos. Los tubos con pH inicial de 8 producen una germinación más abundante, que la observación a simple vista pone de manifiesto y el contaje en placas corrobora.

VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN EL CRECIMIENTO Y GRADO DE ALCALINIDAD POR UN CULTIVO DE BACTERIDIA ANESPORÓGENA DE pH INICIAL 7'2

Cuadro n.º 2, correspondiente al primer ensayo

FECHAS DE OBSERVACIÓN			Tiempo del cultivo Días	Gérmenes por c. c.	pH
Día	Mes	Año			
11	VII	1932	2	159,000	»
13	—	—	4	1.142,000	»
15	—	—	6	4.128,000	»
18	—	—	8	4.368,000	»
21	—	—	12	4.940,000	»
23	—	—	14	10.670,000	»
25	—	—	16	8.230,000	»
27	—	—	18	7.210,000	»
29	—	—	20	8.220,000	»
31	—	—	22	3.360,000	»
4	VIII	—	26	8.110,000	»
6	—	—	28	14.210,000	»
3	IX	—	40	5.250,000	»
10	VIII	—	16	»	8'2—8'4 (Phenolrot)
15	—	—	21	»	8'4—8'6 (Thymolblau)
20	—	—	26	»	8'4 —
26	—	—	32	»	8'2—8'4 —
29	—	—	32	25.800,000	» —
31	—	—	37	»	8'2 —
6	I	—	42	»	8'2 —

A medida que pasa el tiempo, las cifras se igualan para llegar más allá de los veinte días a casi igualarse. La comprobación del pH de las dos series nos demostró que la germinación microbiana lleva la alcalinidad al mismo punto 8'2-8'4.

Este primer ensayo, que le llamaremos de tanteo, nos indica dos cosas : 1.^a Que la reproducción de la anesporógena se hace más fácilmente en medios alcalinos. 2.^a Que la anesporógena, por su metabolismo, rectifica el pH del medio hasta adaptarlo a sus necesidades óptimas, que en este caso puede decirse fisiológicas.

Con estas respuestas a las preguntas que nos formulamos al empezar nuestra experimentación, realizamos un segundo ensayo, siguiendo de una manera más constante las modificaciones de nuestros medios de cultivo y proliferación microbiana.

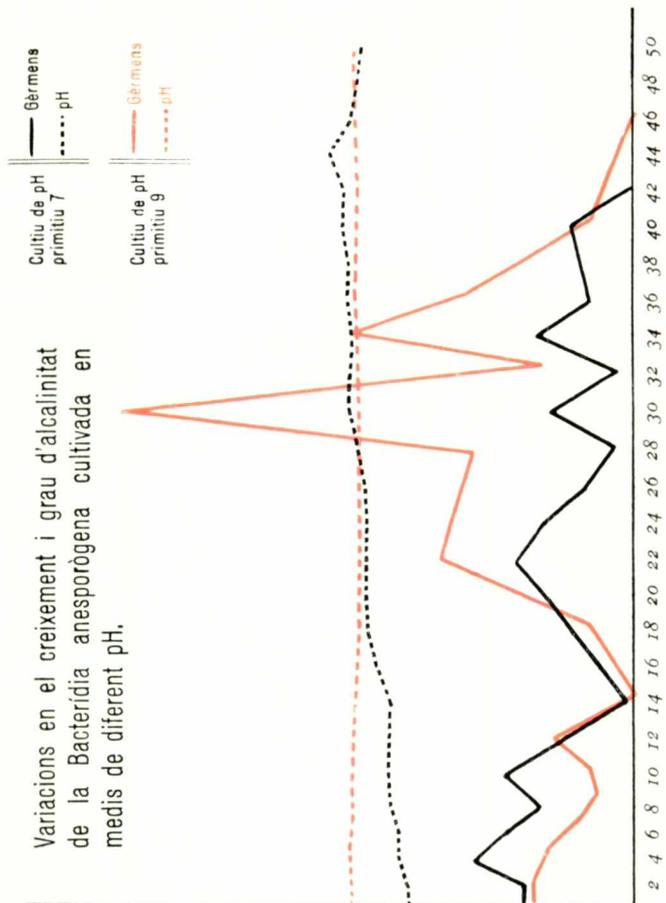
En vista de que en nuestro ensayo primero las dos series estaban al final a un pH sensiblemente idéntico, partimos para la segunda prueba, de dos concentraciones alejadas de la cifra que considerábamos óptima, o sea 8'2.

La gráfica que acompaña, junto con los cuadros 3 y 4, dan con todo detalle el camino seguido por los cultivos a concentraciones opuestas.

En esta segunda observación, aparte de comprobar los resultados de la primera, registramos un hecho que interesa destacar. Es la acidificación rápida y clara que sufren los cultivos, sea cual fuese su pH inicial. Así, de 9 pasa a 8, y de 7 pasa a 6'4. Luego se sitúa en su concentración normal. Los tubos primitivamente alcalinos dan una uniformidad superior a los ácidos, pero llega un momento en que coinciden exactamente.

Variacions en el creixement i grau d'alcalinitat de la Bacterídia anesporògena cultivada en medis de diferent pH.

Escales de pH.	Gèrmens vius per cc.
15	15.000.000
14	14.000.000
13	13.000.000
12	12.000.000
11	11.000.000
10	10.000.000
9	9.000.000
8	8.000.000
7	7.000.000
6	6.000.000
5	5.000.000
4	4.000.000
3	3.000.000
2	2.000.000
1	1.000.000
0	0



Edat del cultiu expressada en dies.

VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN EL CRECIMIENTO Y GRADO DE ALCALINIDAD POR UN CULTIVO DE BACTERIDIA ANESPORÓGENA DE pH PRIMITIVO 7

Cuadro n.º 3, correspondiente al segundo ensayo

FECHA DE OBSERVACIÓN			Tiempo del cultivo Días	Gérmenes por c. c.	pH
Día	Mes	Año			
10	XI	1932	2	»	6'4 (Bromothymolblau)
12	—	—	2	2.960,000	»
12	—	—	4	»	6'6—6'8 —
14	—	—	4	4.770,000	»
14	—	—	6	»	6'6—6'8 —
16	—	—	6	3.440,000	»
16	—	—	8	»	6'8—7 —
18	—	—	8	2.780,000	»
18	—	—	10	»	7 —
22	—	—	10	3.670,000	»
22	—	—	13	»	7 —
23	—	—	13	1.970,000	»
23	—	—	15	»	7'4—7'6 —
25	—	—	15	50,000	»
25	—	—	17	»	7'6—7'8 (Phenolrot)
28	—	—	18	1.500,000	»
28	—	—	20	»	7'6—7'8 —
30	—	—	20	2.440,000	»
30	—	—	22	»	7'6—7'8 —
2	XII	—	22	3.410,000	»
5	—	—	27	»	7'8—8 —
7	—	—	27	310,000	»
7	—	—	29	»	8—8'2 —
9	—	—	29	2.170,000	»
9	—	—	31	»	8—8'2 —
11	—	—	31	370,000	»
14	—	—	34	2.580,000	»
14	—	—	36	»	8'2—8'4 (Kresolrot)
16	—	—	36	1.040,000	»
16	—	—	38	»	8'2—8'4 —
19	—	—	41	»	8'4 —
21	—	—	41	1.540,000	»
21	—	—	43	»	8'4—8'6 —
23	—	—	43	90,000	»
23	—	—	45	»	7'8—8 (Phenolrot)
26	—	—	46	30,000	»
26	—	—	48	»	7'6—7'8 (Kresolrot)
28	—	—	48	10,000	»
28	—	—	50	»	7'6 —
30	—	—	50	0	»

VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN EL CRECIMIENTO Y GRADO DE ALCALINIDAD POR UN CULTIVO DE BACTERIDIA ANESPORÓGENA DE pH PRIMITIVO 9

Cuadro n.º 4, correspondiente al segundo ensayo

FECHA DE OBSERVACIÓN			Tiempo del cultivo Días	Gérmenes por c. c.	pH
Día	Mes	Año			
10	XI	1932	2	»	8 (Thymolblau)
12	—	—	2	2.590,000	»
12	—	—	4	»	8—8'2 —
14	—	—	4	2.120,000	»
14	—	—	6	»	8—8'2 —
16	—	—	6	1.140,000	»
16	—	—	8	»	8—8'2 —
18	—	—	8	810,000	»
18	—	—	10	»	8—8'2 —
21	—	—	10	1.050,000	»
21	—	—	13	»	8—8'2 —
23	—	—	13	2.090,000	»
23	—	—	15	»	8—8'2 —
25	—	—	15	50,000	»
25	—	—	17	»	8—8'2 —
28	—	—	18	1.140,000	»
28	—	—	20	»	8—8'2 —
30	—	—	20	3.050,000	»
30	—	—	22	»	8—8'2 —
2	XII	—	22	5.430,000	»
5	—	—	27	»	8—8'2 (Kresolrot)
7	—	—	27	4.120,000	»
7	—	—	29	»	8—8'2 —
9	—	—	29	14.460,000	»
9	—	—	31	»	8—8'2 —
11	—	—	31	2.120,000	»
14	—	—	34	8.250,000	»
14	—	—	36	»	8—8'2 (Thymolblau)
16	—	—	36	4.520,000	»
16	—	—	38	»	8 —
19	—	—	41	»	8 —
21	—	—	41	1.040,000	»
21	—	—	43	»	8 —
23	—	—	43	560,000	»
23	—	—	45	»	8 —
26	—	—	46	90,000	»
26	—	—	48	»	8 —
28	—	—	48	50,000	»
28	—	—	50	»	8 —
30	—	—	50	0	»

Esto induce a pensar en la conveniencia para obtener buenos cultivos, de partir de caldos discretamente alcalinos, pues en éstos, con mayor facilidad, las bacterias obtendrán su pH óptimo.

Las cifras de gérmenes vivos no son lo claras que hubiéramos deseado. Acaso dificultades de técnica o pequeños detalles de ejecución, como sería por ejemplo una agitación imperfecta de esos cultivos para obtener la disgregación de los acúmulos microbianos, explicarían la poca uniformidad de las cifras recogidas.

No obstante estas reservas, se desprende claramente de los dos ensayos que, pasados cuarenta días, los cultivos dejan rápidamente de germinar, hasta dar siembras negativas a los cincuenta días. Desde luego que estas cifras no pueden tener un valor absoluto, pero podrían servir de base para fijar un tiempo prudencial en la utilización de cultivos de bacteridia anesporógena para fines de profilaxia.

Es muy posible que los fracasos observados en la vacunación con estos gérmenes sean debidos a la excesiva atenuación de los mismos, o bien a utilizar cultivos demasiado viejos que apenas contienen formas vivas o no contienen ninguna.

Nuestras investigaciones podrían ser la base para que los interesados en su preparación y los técnicos encargados del control de los productos vacunantes afinaran y completaran nuestras experimentaciones para determinar la vida máxima que pueda darse a los cultivos de bacteridias anesporógenas en su uso industrial. Con ello se evitarían fracasos, con el descrédito y las pérdidas que siempre les acompañan.

CONCLUSIONES

Sin querer dar a nuestras investigaciones la consistencia de hechos clásicos o repetidamente probados, podemos hacer estas afirmaciones:

1.^a El pH que mejor conviene al cultivo de la bacteria anesporógena está comprendido entre 8 y 8'6.

2.^a Los cultivos de estos gérmenes se pueden considerar de utilidad dudosa más allá de los treinta días de su siembra, pensando, naturalmente, en su empleo como producto inmunizante.

*Instituto de Biología Animal.
Madrid.*