

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

TOMO I Núm. 6

Noviembre-Diciembre, 1960

Redacción y Administración: PROF. J. CABO TORRES
PROF. J. M. SUÑÉ, DR. J. THOMAS, SR. DEL REAL.
FACULTAD DE FARMACIA.—GRANADA (ESPAÑA)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD
PROF. DR. EMILIO MUÑOZ FERNANDEZ

VICE-RECTOR
PROF. DR. J. M.^a CLAVERA ARMENTEROS

FACULTAD DE FARMACIA

TITULARES

- PROF. DR. A. HOYOS DE CASTRO. *Decano*. Mineralogía y Geología.
- » » J. DORRONSORO VELILLA. *Vicedecano*. Química inorgánica, analítica y aplicada.
 - » » J. CABO TORRES. Farmacognosia I y II.
 - » » V. CALLAO FARREGAT. Microbiología I y II.
 - » » J. M.^a CLAVERA ARMENTEROS. Técnica Física y Fisicoquímica (Encargado de Bromatología e Historia).
 - » » D. GUEVARA POZO. Parasitología.
 - » » J. M. MUÑOZ MEDINA. Botánica I y II.
 - » » L. RECALDE MARTINEZ. Fisiología Vegetal.
 - » » J. SAENZ DE BURUACA Y SANCHEZ. Química orgánica I y II.
 - » » J. M. SUÑÉ ARBUSSÁ. Farmacia Galénica y Técnica Profesional y Legislación.
 - » » G. VARELA MOSQUERA. Fisiología Animal.

ENCARGADOS

- DR. M. MO TEOLIVA HERNANDEZ. Bioquímica I y II.
» R. GARCIA VILLANOVA. Análisis Químico.

PROFESORES ADJUTOS

- DR. M. AHUMADA, DR. L. J. ALIAS, DR. E. ESTEBAN, DR. R. GARCIA VILLANOVA
DR. J. L. GUARDIOLA, DR. F. MASGAHÓ, DR. M. MONTEOLIVA, DR. F. PERÁN
DR. A. SERRANO, DR. J. THOMAS, DR. J. VICARAY.

ARTES GRAFICAS RAFRA

*La responsabilidad de los conceptos
expuestos en los trabajos no incumbe a
la Redacción de la Revista sino a sus
respectivos Autores.*

Depósito legal Gr. 17-1960

ARTES GRAFICAS RAFRA - P. de Tejeiro, 1 - Teléf. 23947 - Granada

Trabajos originales de la Facultad

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Prof. Dr. V. CALLAO

Ars. Pharm., 1, (n.º 6), 1960

Estudio de la diferenciación antigénica del género

AZOTOBACTER

por

MANUEL ORTIZ OLIVER

De entre los diferentes tipos de microorganismos, fijadores de N atmosférico, las especies del género *Azotobacter* son los más activos, no tanto por su capacidad fijadora, sino por su presencia constante en todos los suelos, aguas y su amplia distribución.

El conocimiento que se tiene de los caracteres bioquímicos y bacteriológicos de este germen es imperfecto y confuso, razón por la que no se ha podido lograr hasta el momento una clasificación universalmente aceptable, ya que aquellos caracteres son tan semejantes para todos los *Azotobacter* conocidos, que no permiten establecer una clasificación en especies satisfactorias.

El presente trabajo se orienta precisamente a tratar de descifrar la constitución antigénica de este género, a base de demostrar:

La existencia constante en las especies de *Azotobacter* de una o varias fracciones antigénicas bien definidas.

Relación existente entre las especies comunmente descritas y admitidas en lo referente a dicha constitución.

Por último, y si los datos encontrados lo permiten, llegar a la creación de Grupos Serológicos de *Azotobacter*, a partir de los cuales esbozar una clasificación antigénica de este género, del mismo modo que en el caso de los *Salmonellas*, *Neumococos*, etc., la clasificación antigénica vino a resolver el estado de confusión existente.

La clasificación de Bergey solamente señala un género y tres especies cada una de las cuales con categoría de género:

Az. Chroococcum en el que incluye a los fijadores aerobios de N, no simbióticos y formadores de pigmento pardo a negro, insoluble en agua y en los disolventes de las grasas.

Hay razones para suponer que esta especie es una tribu o siquiera una especie colectiva.

Az. Agile, distinto del anterior por su pigmento verde fluorescente, su intensa movilidad, su aspecto monadiforme, y no presentar ciclo evolutivo, ni formación de quistes.

WINOGRASKI en 1936 y recientemente JENSEN V. proponen formar con éste y los Az. Vinelandii, Macrocytogenes e Lusigne de otras clasificaciones, un nuevo género, el AZOMONAS.

Az. Indicum en el que incluye a los restantes, no formadores de ninguna clase de pigmento visible, bacilares y tolerantes para la acidez, con glóbulos de grasa en sus células.

POCHON y BARJAC en su clasificación forman con éste y el Az. Beijerinckia de LIPMAN un nuevo género, BEIJERINKIA.

II. Material y Métodos

A) Aislamiento

Se ha considerado fundamental disponer de una colección de Azotobacter de diversos orígenes, y para ello hemos comenzado por aislar hasta 237 cepas de los mismos, a partir de suelos y aguas de la Vega y Sierra granadinas.

Para los aislamientos a partir de tierras se ha adoptado el de crecimiento espontáneo sobre placas de tierra, según el modo de WINOGRADSKI.

Para los aislamientos a partir de aguas utilizamos la siguiente solución nutritiva del mismo autor :

<i>Fosfato monopotásico</i>	PO ₄ H ₂ K	1 g.
<i>Fosfato dipotásico</i>	PO ₄ HK ₂	0,2 g.
Sol. de Molibdato sódico 1 %	MoO ₄ Na ₂	2 "
<i>Cloruro sódico</i>	ClNa	0,4 g.
<i>Sulfato magnésico</i>	SO ₄ Mg	0,6 g.
Sol. de Cloruro férrico 1 %	Cl ₃ Fe	3 gotas
Sol. de Sulfato de Manganeso 1 %	SO ₄ Mn	2 "
Solución Humica		2 "
Agua de la fuente	c. s.	1.000 c.c.

El presente medio lo utilizamos en matraces con 30 c.c. del mismo, añadidos de 0,1 g. de carbonato cálcico y como fuente carbonada, 0,1 c.c. de etanol o butanol, o bien 100 mgs. de butirato cálcico, acetato cálcico, manita o glucosa.

El agua, objeto del aislamiento, se siembra en éste de forma que quede diluido cinco veces.

En ambos tipos de aislamientos (tierras y aguas) después de incubación a 28° no se consigue un crecimiento exclusivo de Azotobacter, y para llegar a un total aislamiento es necesario resembrar en una placa de tierra

estéril, en cuya superficie se trazan varias rayas con el hilo recto de platino, humedecido en una suspensión en solución salina del barniz microbiano obtenido en el primer caso, o directamente del matraz de crecimiento en el caso de aislamiento a partir de aguas.

B) Conservación y medios de cultivo

La conservación de los gérmenes aislados se realiza en tubos de ensayo con tierra manitada al 2 % y fosfatada al 0'2 %, inclinada y alisada su superficie con espátula y debidamente esterilizados.

La siembra e incubación en estufa a 28° origina a las 48 horas las colonias características.

Estos tubos se conservan a temperatura ambiente, en lugar oscuro de preferencia, y de este modo acaban por desecarse la tierra y las colonias lo que favorece extraordinariamente su conservación, y no es necesario efectuar resiembras periódicas, salvo en las estirpes no enquistables, y lo que es más importante, queda inhibido el desarrollo de los comensales oligonitrófilos, que constantemente acompañan al *Azotobacter*.

Para conseguir un cultivo a partir de esta semilla, hasta raclar la superficie de la tierra con asa fuerte y suspender la pequeña cantidad de tierra adherida, en un tubo con medio líquido adecuado, la solución nutritiva de WINOGRADSKI, diluida al 1/5, o bien en un tubo con Medio Base 77 de O. N. ALLEN, y que es el que utilizamos generalmente para el cultivo del germen y cuya composición por litro es la siguiente:

Fosfato dipotásico	PO ₄ HK ₂	0.5 g.
Sulfato magnésico	SO ₄ Mg	0.2 g.
Cloruro sódico	ClNa	0.2 g.
Cloruro férrico	Cl ₃ Fe	indicios
Sulfato manganeso	SO ₄ Mn	indicios

Este medio puede solidificarse por adición de 2,5 % de agar-agar.

En casos especiales, para conseguir un germen en la primera fase de su desarrollo, en la cual presentan un determinado antígeno, que desaparece en las fases posteriores, hemos utilizado como medio de cultivo sólido, el silicogel, impregnado de la solución nutritiva de WINOGRADSKI, diluida al 1/5 y con etanol como fuente carbonada.

Este medio de cultivo es de muy buenos resultados, y su uso no lo hemos generalizado por lo laborioso y largo de su preparación.

Se trata de un gel de sílice, preparado con iguales cantidades de CHH de densidad 1,1 y solución de silicato sódico o potásico de densidad 1,06 que bien mezcladas en la misma placa de Petri, solidifica a las pocas horas: entonces hay que someter las placas a una diálisis en agua corriente, hasta desaparición de la fuerte reacción del iou cloruro, operación que dura tres días como mínimo.

Este gel de sílice se convierte en medio de cultivo si ahora lo cubrimos con el 5 % de su volumen de la solución nutritiva de WINOGRADSKI, operación que exige otro día de espera.

Por último, la esterilización del medio de silicogel no conviene realizarla al autoclave por el elevado porcentaje de placas que se inutilizan. Es preferible realizar su esterilización en la cámara aséptica de cultivos, por medio de la radiación U. V. de una lámpara de cuarzo.

La siembra en este medio hay que realizarla a partir de una suspensión de gérmenes diluida y proyectada sobre la superficie de las placas por pulverización a 1 m. de distancia.

Si estas placas después de incubadas en la estufa y crecida, se abandonan hasta que el silicogel se deseque y quede reducido a simples escamas, puede servir para la conservación de las cepas de *Azotobacter*.

Estas escamas guardadas en condiciones de esterilidad son capaces de germinar al agregarle un medio de cultivo favorable, y conservan su poder germinativo durante largo tiempo.

C) Identificación

Los caracteres diferenciales de las especies, según la clasificación expuesta, no son lo suficientemente claros para su caracterización: la formación de pigmento verde en los cultivos envejecidos es tan constante que incluso las especies verdes (*Agile* y *Vinelandii*) pardlean con el tiempo; desde luego estas especies no plantean problema, pues la obtención precoz del pigmento verde las separa de las restantes y entre ambas la caracterización se realiza por el aspecto monadiforme de los *Agile*. En cambio, al tratar de diferenciar entre *Chroococum* y *Beijerinckia* surge la dificultad de la enorme cantidad de matices, más o menos pardos que todos los cultivos presentan, y las características bacteriológicas conocidas de uno y otro no aclaran la cuestión.

De las 144 cepas que forman nuestra colección (de las 237 iniciales) sólo hay dos formadores de pigmento verde que catalogamos como *Vinelandii*, y los restantes, formadores de pigmento pardo a negro en los cultivos envejecidos nos limitamos a conocerlos con un número que corresponde al orden de aislamiento o al de la muestra que lo suministró, sin perjuicio de que alguna ocasión nos refiramos a su clasificación como *Azotobacter* o *Beijerinckia* según la común denominación.

D) Preparación y antígenos

Las posibilidades de antígenos en este género son varias; cabe pensar en la existencia de un antígeno flagelar H; un antígeno somático O, y posiblemente un antígeno de envoltura o capsular, K.

SHTERN afirma la existencia de una fracción antigénica termostable.

JENSEN y PETERSEN hablan de la existencia de un antígeno H, termolábil y que enmascara la aglutinación somática O.

Nosotros hemos comprobado la existencia de una fracción termolábil, que tratamos de identificar con el antígeno H de JENSEN, aunque los hechos experimentales nos inclinan a considerarlo como antígeno Capsular y no Flagelar.

Por un lado tenemos que la presencia de flagelos en estos gérmenes es muy escasa, lo que debe ocasionar una reacción de aglutinación muy débil; por otro lado los cultivos de 1-2 días presentan muy débil formación de lo que llamamos "cápsula", demostrable por métodos de tinción; a los cinco días de cultivo parece ser máxima la formación de cápsula, y por último en los cultivos muy envejecidos desaparece.

Pues bien, el comportamiento antígeno de la "fracción termolábil" es paralelo a esta evolución de la cápsula.

En los primeros días de cultivo se consigue la aglutinación frente a un suero O, somático puro, por ebullición momentánea de la suspensión microbiana. Si el cultivo es de cinco días la ebullición se ha de prolongar durante una hora: y si se trata de un cultivo muy envejecido, la aglutinación somática puede conseguirse directamente sobre la suspensión microbiana.

Para la realización de nuestras experiencias hemos dispuesto de la preparación de dos antígenos: un antígeno Total y uno Somático, desprovisto de la fracción termolábil por ebullición durante una hora del antígeno total.

El antígeno total consiste sencillamente en una suspensión en solución isotónica de gérmenes *Azotobacter* en la fase joven, bacilar, muertos por el calor o antisépticos, y cuyas colonias son pequeñas, 2 mm. blanquecinas y de brillante superficie.

La masa de gérmenes necesaria para la preparación de una cierta cantidad de antígeno tiene sobre medios etanolados su más conveniente medio de preparación.

La utilización de otras fuentes de energía, dentro de los alimentos llamados "normales" (benzoato, butanol, etc.) origina crecimiento muy escaso a las 48 horas de cultivo, y con posterioridad, si bien es más abundante, la fase bacilar da paso a otra más envejecida y diferente desde el punto de vista antigénico.

Si se trata de "alimentos anormales", azúcares, el crecimiento es tan rápido y las fases se suceden de tal modo, que a las 24-26 horas de la siembra, momento en que el crecimiento es apreciable, encontramos una fase cocoidea de gruesa cápsula, semejante morfológicamente a la fase envejecida del desarrollo sobre etanol, y antigénicamente muy semejante o idéntica a la fase bacilar del desarrollo sobre etanol.

Preferimos utilizar como antígeno la fase bacilar del cultivo sobre alcohol, por la ventaja que supone poder distinguirla morfológicamente de las fases más avanzadas del ciclo, distinción que es difícil conseguir en los cultivos sobre azúcares.

El medio de cultivo utilizable puede ser indistintamente líquido o sólido: la solución de Winogradski y el silicogel, impregnado de esta solución pueden prestarnos este servicio, aunque para la obtención sistemática del antígeno total hemos preferido la utilización del Agar-77 etanolado al 7 0/00 en frascos de Roux.

El barniz microbiano obtenido se arrastra con una espátula de Drigalski y suspende en solución salina, de manera que puede a una concentración de 5.000 millones por c.c. Esta suspensión se somete a una temperatura de 40-50° durante media hora para matar los gérmenes y evitar la evolución hacia otras fases del desarrollo que impurificarían el antígeno.

Preferimos el calor a los antisépticos, ya que del modo indicada no se altera la componente antigénica termolábil y los antisépticos podrían ocasionar accidentes en las inoculaciones a los animales para la preparación de los sueros correspondientes.

Este antígeno conserva sus propiedades durante largo tiempo y en magnífico estado los 15 primeros días, y aunque suele ocurrir una ligera sedimentación, basta agitar suavemente para que la suspensión recobre su homogeneidad.

Estas suspensiones calentadas a 80° durante una hora; 100° durante una hora y 100° durante dos horas muestran ganancia progresiva de un antígeno termostable, enmascarado por una fracción termolábil que desaparece de una forma paralela.

La calefacción a 120° durante una hora y menos ocasiona la precipitación irreversible de la suspensión microbiana.

Para la obtención de otras fases más avanzadas del ciclo no son utilizables los medios sólidos mencionados, pues en ellos las fases se suceden de forma irregular y a los tres días de cultivo aparecen mezclas de los diferentes tipos morfológicos, inutilizables como antígenos tipo por su manifiesta impureza.

En medios líquidos puede conseguirse una mayor pureza de formas, esto es, una sola fase del ciclo, pues en ellos éstas se suceden con regularidad y así queda excluida la posibilidad de mezcla de los diferentes tipos morfológicos. Por esto se prestan de una manera ideal para la obtención de antígenos, aunque no nos satisfacen plenamente por la escasez del crecimiento conseguido, pues ni aun con la aireación del medio, aquél es tan espléndido como el conseguido en los medios sólidos, aparte los inconvenientes que presenta la aireación de estos medios de cultivo.

En el medio líquido de Winogradski, con etanol como fuente carbonada, a las 18 horas se observa un ligero crecimiento acusado por enturbiamiento o pigmentación, con presencia de gérmenes bacilares, en muy escaso número y de constitución antigénica idéntica a la de los gérmenes obtenidos en los medios sólidos, en los primeros días de cultivo.

No obstante, la escasez de su desarrollo no permite una amplia utilización de los mismos como antígenos.

A los 5-10 días el crecimiento es más abundante, pero las formas bacilares han desaparecido en favor de otras fases más avanzadas del ciclo.

aunque la aparición de la última fase, la quística, no se logra nunca plenamente de esta forma; es necesario el empleo del butanol o del benzoato sódico como fuente carbonada para su obtención rápida y total.

Cuando el examen microscópico muestra total enquistamiento procedemos a la preparación del antígeno correspondiente a los quistes. Para ello decantamos el medio líquido, centrifugamos y el residuo se suspende en solución salina isotónica.

Estas suspensiones de Quistes, con las que pretendíamos demostrar o comprobar su composición antigénica no nos han permitido utilizarlas como antígeno, pues su suspensión, aunque homogénea, está constituida por gránulos, apreciables macroscópicamente, con un aspecto que recuerda la suspensión salina de un germen en *Fase Rugosa*, y por tanto inutilizables para la visualización de una reacción de aglutinación.

E) Preparación de sueros

Obtención de un Suero total.—Con el antígeno de elección preparado, se procede a la obtención del correspondiente suero específico por inoculaciones a conejos de raza común en la vena marginal de la oreja, de los antígenos correspondientes en solución salina y a una concentración aproximada de 1.000 millones de gérmenes por c.c. Por último, comprobación del título aglutinante del suero en preparación, por extracción de 20 c.c. de sangre por punción cardíaca del animal.

Se comprueba el título aglutinante del suero por la reacción de aglutinación al límite, y si éste es superior a 1/1.500 se procede a obtener la mayor cantidad de sangre, por sangría en blanco del conejo, por sección de una de las carótidas externas del mismo.

Por centrifugación del coágulo de sangre y decantación obtenemos el suero, y una vez determinado su título de poder aglutinante, se conserva en tubos cerrados a la lámpara y con un agente conservador Merthiolato sódico de preferencia al 1/20.000, o en su defecto fenol a 1/5.000 y mantenidos en nevera, para mayor garantía de conservación.

Obtención de un Suero Capsular.—Al pretender la obtención de un Suero Capsular puro, es decir, específico únicamente para la fracción termolábil del *Azotobacter* hemos de acudir, no a la inoculación de animales, por la imposibilidad de eliminar del antígeno total la fracción termostable, sino a la saturación de las aglutininas somáticas del Suero Total con un antígeno Somático puro, preparado por calentamiento a ebullición durante 30 minutos del antígeno total.

Por centrifugación del antígeno calentado conseguimos un sedimento que agregamos a una cantidad determinada de suero total y llevamos a un baño de agua de 56-60°; al cabo de dos horas centrifugamos para separar del suero las partículas aglutinadas y verificamos una aglutinación de orientación del sobrenadante frente al antígeno calentado, Somático puro. Si la aglutinación es positiva repetimos la operación hasta conseguir la

total saturación de las aglutininas somáticas; como el antígeno saturante estaba libre de su fracción termolábil, el suero conseguido, Capsular puro, será capaz de aglutinar al antígeno total.

Obtención de un Suero Somático.—Para la obtención de un suero somático puro basta la inoculación a un conejo del antígeno correspondiente, calentado. —Antígeno Somático.

Obtención de Sueros Monoespecíficos. Para conseguir sueros mono-específicos, o al menos con una especificidad más limitada se procede a la saturación de las aglutininas comunes de un determinado suero (x) con las correspondientes homólogas de un antígeno (y), capaz de aglutinar frente a él.

Esta operación, Saturación de Aglutininas, se realiza de manera análoga a la señalada para la obtención del Suero Capsular.

Si las dos cepas es estudio tienen idéntica constitución antigénica, el Suero saturado perderá todo poder aglutinante, pero si no ocurre de este modo, y el suero es aún capaz de aglutinar al menos frente a su antígeno específico, podemos afirmar que la constitución antigénica de ambos es similar, pero no idéntica, es decir, que poseen una o varias fracciones antigénicas comunes, junto a otras no comunes.

Sueros obtenidos

Grupo N.º 1. - Suero N.º 1

El primer suero anti-Azotobacter preparado ha sido el total, correspondiente a la cepa núm. 1 de nuestra colección, productor de un pigmento pardo insoluble en agua y en los disolventes orgánicos, no difusible en el medio y que catalogamos como Beijerinckia de las clasificaciones conocidas.

El título aglutinante del suero conseguido es superior a 1/2.000 e inferior a 1/2.200.

Las pruebas de aglutinación de orientación de este suero frente a los antígenos correspondientes a todas las cepas de nuestra colección sólo nos ofrece tres casos de positividad: frente a los gérmenes núm. 1, 19 y 3616, clasificados como Beijerinckia, y un crecido número de casos negativos frente a las restantes cepas de nuestra colección.

En la Tabla núm. 1 resumimos los resultados de aglutinación del Suero total núm. 1 frente a ciertos antígenos, siendo negativos los no resucitados en la misma.

TABLA NÚM. 1

ANTIGENO	SUERO Az-1	SUERO Az-1 Sat. 19	SUERO Az-1 sat 19 y 3.616	SUERO Az-1 sat 3.616
1	+	+	+	+
10	-	-	-	-
19	+	-	+	+
3616	+	+	-	-
CHROOC. I. P.	-	-	-	-
BEIJ. I. P.	-	-	-	-
VINEL. I. P.	-	-	-	-
AGILE I. P.	-	-	-	-

Nota.— Los antígenos CHROOC. I. P. ...etc., corresponden a los obtenidos a las cepas, especies tipos, recibidas del Instituto Pasteur de París.

Discusión de la Tabla núm. 1.—Los gérmenes 1, 19 y 3616 pertenecen a un Grupo Serológico claramente distinto de los restantes Azotobacter de nuestra colección y tienen al menos una fracción antigénica común que denominamos B₁ y que caracteriza a los Gérmenes de este Grupo 1.

Los gérmenes 1 y 19 tienen además otra fracción antigénica común que denominamos *a* y que desaparece del Suero Az-1 al sautrar éste por antígeno total 19.

Los gérmenes 1 y 3616 tienen otra fracción común al menos, denominada *b* y que desaparece del Suero Az-1 al ser éste saturado por antígeno 3616, pero claramente distinta de la *a* y de la B₁.

Grupo núm. 2. - Suero 10

Para conseguir la calificación de un nuevo Grupo Serológico escogimos al azar uno de los gérmenes que quedaron fuera del Grupo 1, germen núm. 10 formador de pigmento pardo no difusible y con el que preparamos el Suero Az-10, que caracteriza a los gérmenes del Grupo 2, es decir, que todos aquellos que aglutinen con este suero pertenecen al mencionado Grupo Serológico.

El título aglutinante de este suero ha resultado ligeramente superior a 1/3.500 y los resultados de las experiencias de aglutinación frente a los antígenos disponibles han resultado positivos en gran número de casos, y precisamente a gérmenes que responden a los caracteres clásicos de los Beijerinckia.

En la Tabla núm. 2 resumimos los resultados de las aglutinaciones de orientación de los gérmenes del Grupo 2.

Discusión de la Tabla núm. 2.—Como se ve en las diversas columnas de la misma se han realizado hasta seis distintas saturaciones de aglutininas para conseguir sueros de especificidad más limitada o sueros monoespecíficos, si posible fuera; a partir del Suero Az-10, determinante del Grupo, realizamos una saturación de las aglutininas comunes con el núm. 334 y de este modo la reacción de aglutinación de este nuevo suero frente a los restantes antígenos será negativa para todos aquellos de constitución idéntica al 334, aunque debemos tener en cuenta que si bien esta condición es necesaria, no es suficiente, pues cabe la posibilidad de que tengan menor número de fracciones antigénicas que el 334, como asimismo otras no comunes ni al 334 ni al 10.

El título aglutinante de este suero saturado ha resultado ser 1/2.000 por lo que vemos han quedado saturadas un 65 % aproximadamente de sus aglutininas.

Los resultados de la aglutinación frente a los antígenos de este Grupo, expresados en la columna 3, son todos positivos, a excepción del mismo 334, por lo que afirmamos que éste posee una o varias fracciones antigénicas comunes a los de su Grupo, pero no es presumible una identidad absoluta con ninguno de ellos.

TABLA NÚM. 2

Columna	SUERO Az-10, saturado con							SUERO Az-334, saturado con		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ANTIENOS		334	y 9	y 3602	y 11	9	3602		10	y 9
9	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
12	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
334	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
3601	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
3602	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3604	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
3605	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
3606	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3607	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3609	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3611	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
3617	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
3625	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3628	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
3630	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3638	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3650	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3652	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3655	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3671	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
3590	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
3593	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
3597	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3598	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Este suero saturado ha sido de nuevo saturado con el antígeno correspondiente del germen 9 —columna 4— con ocurrencia de seis casos negativos en las experiencias de aglutinación del mismo frente a los restantes antígenos, y que corresponden a los gérmenes núm. 9, 12, 3604, 3611 y 3617.

Podemos afirmar que estos seis gérmenes son antigénicamente similares entre sí y poseen una o varias fracciones antigénicas comunes, caracte-

rísticas del Grupo 2 y que denominamos B_2 , y otra u otras fracciones comunes que caracterizan un Subgrupo o Tipo y que denominamos c.

Igualmente el primitivo Suero saturado Az-10 ha sido objeto de dos nuevas saturaciones: con los antígenos 11 y 3602 —columnas 6 y 5 respectivamente—. En el caso de la saturación con 3602, el número de casos negativos ha sido de nueve, gérmenes que consideramos como de igual o muy semejante constitución antigénica, y que permite agruparlos en un Tipo caracterizado por la presencia de una fracción antigénica que denominamos d, presente en el Suero 10 y que desaparece del mismo al ser saturado por las aglutininas comunes del 3602. Por supuesto posee las fracciones antigénicas B_2 , común igualmente a los gérmenes del Tipo c, por ser la característica del Grupo 2 y que desaparece del Suero Az-10 al ser éste saturado por el 334.

En la saturación con antígeno 11, columna 6-, la aglutinación frente al antígeno específico 10 es negativa, índice de haber desaparecido del Suero toda clase de aglutininas, y por tanto es presumible, y se ha comprobado experimentalmente, que el resto de las aglutinaciones han de ser también negativas.

Con arreglo al criterio seguido habíamos de considerar al germen 11 como idéntico al 10, pero la saturación directa del Suero Az-10 con antígeno 11, denuncia positiva la aglutinación frente al antígeno 10, lo que impide tal calificación, y de pasada no confirma las precauciones con que hemos formado los Tipos antigénicos, al afirmar que la razón en que nos apoyamos para su formación es necesaria pero no suficiente.

Dos nuevas saturaciones del Suero Az-10 directamente con antígeno 9 —columna 7— y con 3602 —columna 8— confirman la existencia de varias fracciones antigénicas dentro de las consideradas.

Vemos como los seis casos negativos de la columna 4 quedan reducidos a uno solo en la 7, correspondiente al 3617, que es por tanto más similar al 9. De igual modo, las diez negatividades de la columna 5 quedan reducidas en su homólogo la 8 a cuatro casos negativos.

Con objeto de definir más estrechamente las fracciones antigénicas de este Grupo hemos preparado un nuevo Suero con el que realizar saturaciones en un nuevo sentido. El germen elegido ha sido el 334, y el título aglutinante del Suero obtenido es algo superior a 1/2.500.

Los resultados de la aglutinación de orientación de este nuevo suero, frente a todos los antígenos disponibles han sido positivas para todos los gérmenes catalogados como del Grupo 2, y sólo con ellos, es decir, que se mantienen los resultados obtenidos anteriormente con el Suero Az-10, hecho que nos define perfectamente al Grupo y señala la presencia de varias fracciones antigénicas, características del mismo.

Este suero ha sido saturado frente a los antígenos 10 y 9 y los resultados de las aglutinaciones de orientación realizadas con los mismos son los de las columnas 10 y 11 de la Tabla 2.

En el primer caso son cinco los casos negativos, presumiblemente idénticos entre sí, y si atendemos a su comportamiento en las columnas 3 a 8 tenemos este hecho confirmado y establecido de la siguiente forma:

Los gérmenes 10, 11, 3601, 3671 y 3590 podemos considerarlos de igual estructura antigénica, aunque pudiera existir en alguno de ellos otra fracción antigénica, ausente en los demás.

La columna 11 muestra la saturación del suero 334 con antígeno 10 y 9. Los casos negativos han sido, sin tener en cuenta los conseguidos en la primera saturación, dos, correspondientes al 3604 y 3617, los cuales atendiendo al resultado de la columna 4, podemos considerarlos idénticos al germen 9.

Grupo núm. 3 - Suero] 55

De entre los gérmenes, excluidos de los Grupos 1 y 2 se ha elegido para la preparación de un nuevo Suero el germen núm. 55, formador de pigmento intensamente negro, no difusible, etc., caracteres que le señalan como *Chroococum* de entre las clasificaciones conocidas.

El suero conseguido tiene un título aglutinante ligeramente superior a 1/3.250 y con él se han conseguido nueve casos de aglutinación positiva entre los gérmenes de nuestra colección.

En la Tabla núm. 3 se dan los resultados de las aglutinaciones de este Grupo. Las saturaciones realizadas han sido tres: frente al antígeno 331 y frente al 3603 y una nueva del primer suero saturado con 331, con 3603.

Del estudio de la Tabla 3, por una discusión semejante a la realizada con la Tabla 2, deducimos:

El Grupo 3 está formado por nueve gérmenes distintos de nuestra colección, que poseen al menos una fracción antigénica común, presente en el Suero Az-55 y en los demás y que denominamos *A₃* y que define al Grupo.

Los gérmenes 17, 331, 3624 y 3658 poseen además una fracción común, presente en el Suero Az-55 y que desaparece de éste al ser saturado por el antígeno 331 y que denominamos *alfa*, y que caracteriza un Tipo.

Los gérmenes 7 y 3603 forman un nuevo Tipo o Subgrupo, caracterizado por la presencia de una fracción antigénica común a ellos y que denominamos *beta*.

Los gérmenes 3631 y 3654 constituyen otro Tipo, caracterizado por la presencia de una fracción antigénica denominada *gamma*.

TABLA NÚM. 3

Columna	SUERO Az-55, saturado con			
1	2	3	4	5
ANTIGENOS		33 ¹	y 3603	3603
7	+	+	-	-
17	+	-	-	+
55	+	+	+	+
33 ¹	+	-	-	+
3603	+	+	-	-
3624	+	-	-	+
3631	+	+	-	+
3654	+	+	-	+
3658	+	-	-	+

Por último se ha conseguido igualmente la preparación de los Sueros anti, correspondientes a las cepas de los Az. *Chroococum*, *Agile* y *Vinelandii*, procedentes del Instituto Pasteur de París, y no presentan comunidad antigénica con ninguno de los tres Grupos descritos.

Conclusiones

La preparación de Sueros anti-Azotobacter es posible de realizar por inoculaciones sucesivas a conejos de raza común.

Los *Azotobacter* y *Beijerinckia* presentan en su constitución antigénica:

1.^o—Un antígeno termostable identificado como antígeno somático, O.

2.^o—Un antígeno termolábil identificado como capsular, K, y que enmascara la aglutinación somática.

Se han identificado tres Grupos Serológicos, que denominamos I, II y III, caracterizados por la presencia de un antígeno principal que define al Grupo, y que denominamos con las letras mayúsculas A y B, respectivamente para *Azotobacter* y *Beijerinckia* según la común denominación, y con un subíndice numérico del Grupo a que pertenece.

Los Grupos I y II están formados por *Beijerinckia* y el III por *Azotobacter Chroococum*.

Los antígenos menores, determinantes de los Tipos o Subgrupos los conocemos con las letras minúsculas a, b, c,... cuando se trata de *Beijerin-*

kia y con las letras griegas alfa, beta, etc., en el caso de *Azotobacter* propiamente dicho.

El Grupo I se caracteriza por la presencia de una fracción antigénica B_1 . En este Grupo se han identificado también dos antígenos menores, *a* y *b*.

El Grupo II se caracteriza por la presencia de una fracción antigénica B_2 y en él se han identificado dos nuevos antígenos menores, *c* y *d*.

El Grupo III se caracteriza por la fracción antigénica A_3 y además tres antígenos menores denominados alfa, beta y gamma.

Azotobacter Vinelandii presenta una constitución antigénica semejante a los anteriores, con dos antígenos perfectamente definidos, uno termostable y otro termolábil.

Azotobacter Agile presenta igualmente carácter antigénico, pero no se ha podido demostrar en él la presencia de una fracción antigénica termolábil, por el hecho de que las suspensiones de *Az. Agile* sometidas a 100° durante una hora y menos, pierden la homogeneidad de un modo irreversible.

R E S U M E N

Se estudia el comportamiento antigénico del género *Azotobacter* con vistas a establecer una clasificación antigénica del mismo.

Az. Chroococum y *Vinelandii* y los *Beijerinckia* presentan dos antígenos fundamentales: un antígeno termostable, Somático, O, y un antígeno capsular, K, termolábil y que enmascara la aglutinación somática.

Se han identificado tres Grupos Serológicos, I, II y III; los dos primeros formados por *Beijerinckia* y el III por *Az. Chroococum*. En cada Grupo existen varias fracciones antigénicas diferentes que permiten el establecimiento de Tipos antigénicos dentro de cada Grupo.

R E S S U M E E

On'y étudie la conduite antigénique du genre *Azotobacter* avec la finalité d'établir une classification du même.

Az. Chroococum et *Vinelandii* présentent deux antigens fondamentalement: un antigen thermostable, Somatic, O, et un antigen capsular, K, termoalbil et que masque la aglutination somatic.

On a identifié trois groupes Serologiques, I, II et III; les deux premières constitués par *Beijerinckia* et le troisième par *Az. Chroococum*. Dans ebaque groupe il'y'a plusieurs fractions antigenics différentes que permettront établir des Types antigenics dans ebaque groupe.

S U M M A R Y

The antigenic behaviour of the gender *Azotobacter* was studied in order to found a antigenic classification of the same gender.

The *Az. Chroococcum* and *Vinelandii* consist of two principals antigens: one thermostetting antigen, Somatic, O, and other one thermolabile, that mask the somatic agglutination.

Three serologicals Groups, I, II and III have been identified; the formars are *Beijerinckia* and the latter is *Chroococcum*. In each Group there are severals differents parts that permit to found antigens Types, or Subgroup, in each Group.

BIBLIOGRAFIA

- BEIJERINK M. V.—1901. *Ueber oligonitrophile mikroben*. Zentrallh. Bkt. II Aht. 7; 561.
- VLADIMIR SEVCIK.—1952. *Growth of Az. on coal dust*. Centrall. Biol. 1-52, 4.
- WINOGRADSKI S.—1936. *Ouvres completes*. Cap. XVI p. 756, 758, 759.
- BISSET K. y HALE C.—1953. *J. Gener. Microb*, 8-442.
- JENSEN y PETERSEN.—1951. *Roy. Vet. Agr. Coll. Year Book* 95.
- LOEHNIS F.—1921. *Studies upon the life cycles of the bacteria*. Mem. Nat. Acad. Sci. 16, 2.^a memoir, 1-335.
- COLLINS F. M.—1952. *The fermentations reaction of Az, strains determined by the use of eosin-methylene-blue agar*. Austral. J. Sci. 15, 27-8.
- CALLAO V. y MONFOYA E.—1958. *Diferenciación de especies de Az, por la acción de ciertos colorantes*.
- ASO K. y YOSHIDAR.—1928. *Application of the serum reaction in the clas. of Az*. Proc. 1st Intern. Congr. Soil. Sci. 3; 150-151.
- EISENSTARK A.; WARD JR. y KYLE T. S.—1950. *Study of large bodies in Az*. *Agile.—J. Bact.* 60; 525-531.
- SHEPHERD E. A.—1918. *Serological properties of Az*. *Mikrob.* 17, 445-51.
- PETERSEN E. J.—1955. *Taxonomic studies on Az*. *Chroc. y Beij.* Lipman.—*Roy. Vet. agr. year book* 119-125.
- LIPMAN J. G.—1901. *Soil bact. studies.—Report New Jersey Agr. exp. sta.* 25; 238-289
- POCHON y BAILLIAC H.—1958. *Traité d semicrob. des sols*. 74.
- BREED R. S.; MURRAY E. G. D. y HITCHENS A. P.—1957. *Bergey's manual of determ. Bact.*—Williadians and Wilking C.^o.
- SUSHIKINA N. N. y SERGUNINA L. A.—1955. *M. V. Lomanosov State Univ. Moseow. Mikrob.* 24; 403-14.
- POCHON J. y TCHIAN.—1918. *Precis de Microb du sol*. Mason y Cie. Paris.
- ALLEN O. N.—1951. *Experiments in soil bact.* Burgess Publishing C.^o Minnesota.