

## Tesis de Posgrado

# Contribución al estudio de la citología de las bacterias

Spedalieri, Nydia Yolanda

1950

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Naturales 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Spedalieri, Nydia Yolanda. (1950). Contribución al estudio de la citología de las bacterias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0638\\_Spedalieri.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0638_Spedalieri.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Spedalieri, Nydia Yolanda. "Contribución al estudio de la citología de las bacterias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1950. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0638\\_Spedalieri.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0638_Spedalieri.pdf)

MINISTERIO DE EDUCACION  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICAS  
Y NATURALES

T.  
3

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA CITOLOGIA  
DE LAS BACTERIAS

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales  
presentada por

NYDIA YOLANDA SPEDALIERI

*Exemplar 638*

1950-AÑO DEL LIBERTADOR GENERAL SAN MARTIN - 1950



Al Dr. Alfredo Serdelli, consejero y  
crítico de este trabajo, todo mi agra-  
decimiento.

# FOFBA

## I N D I C E

	Pág.
Cap. I.- Introducción.....	4
Cap.II.- Revisión bibliográfica. Antecedentes y examen crítico de los conocimientos actuales..	6
Cap.III. Material y métodos.....	13
Cap.IV .- Resultados experimentales .....	21
1.Aplicación de la técnica de Gratacos a bacterias Gram positivas, Gram negativas, esporuladas y no esporuladas.....	22
2.Estudio de la variación del corpúsculo teñible en los distintos tiempos de la curva de crecimiento de la bacteria.....	26
3. Comparación con otros métodos de coloración, en especial con aquellos utilizados para la tinción de sustancia nuclear...	29
4. Variantes del método de Gratacos. Ensayos con diferentes reactivos y colorantes....	35
5. Investigación de contenidos celulares. Tinción y tratamiento con disolventes de volutina, glucógeno y grasa. Comparación con la técnica en estudio.....	39
6. Ensayos con disolventes de las sustancias cromáticas. Combinación con la técnica de Gratacos. Comparación de resultados...	47
Cap. V.- Discusión.....	50
Cap.VI.- Resumen y conclusiones.....	53
Bibliografía.....	55

---

# C A P I T U L O    I

## INTRODUCCION

El conocimiento de la existencia del núcleo o de alguna estructura o substancia que desempeñe sus funciones en las células de las bacterias ha sido y es aún objeto de discusión por parte de varios investigadores.

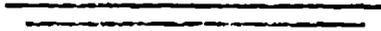
Sin embargo, en los trabajos más recientes, parece haberse comprobado definitivamente, al menos en algunas especies, la presencia de un núcleo cuyas características concuerdan, en mayor o menor grado, con las del núcleo de las células de seres superiores.

En un trabajo publicado por un autor argentino, Miguel L. Gratacos, se detalla, mediante una técnica muy sencilla la forma de poner en evidencia un corpúsculo en el interior de las células bacteriales, al cual el autor le atribuye naturaleza nuclear.

Tomando como punto de partida dicho trabajo se inició el presente estudio en el cual nos proponemos averiguar, hasta donde sea posible, el significado de la coloración de Gratacos y tratar de establecer sus relaciones con la substancia nuclear.

Con este fin se ha efectuado una revisión del método mencionado, generalizando su aplicación a diferentes tipos de bacterias y en las distintas fases de su cultivo; se han hecho comparaciones con otras técnicas de tinción nuclear y también con otras células y se han introducido algunas variaciones en el método.

Hemos incluido, además, un breve estudio de los contenidos celulares en las bacterias, el modo de diferenciarlos y las posibles combinaciones con la técnica de Gratacos.



## C A P I T U L O    I I

### REVISION BIBLIOGRAFICA- ANTECEDENTES Y EXAMEN CRITICO DE LOS CONOCIMIENTOS ACTUALES.

Indudablemente, el concepto de la naturaleza no diferenciada de la célula bacterial, ha sido anulado frente a los estudios que evidencian la presencia de diferentes contenidos y de otras estructuras cuyas características demuestran su naturaleza nuclear.

Si bien es cierto que no hay acuerdo, entre los diversos investigadores que tratan el tema, en cuanto a la forma en cómo se presenta el núcleo bacterial, su existencia está sostenida por las más interesantes teorías, desde la que supone el núcleo difuso en la célula hasta la que descubre en ella estructuras cromosómicas definidas.

Dada la profusa bibliografía existente, tomaremos del trabajo de I.M. Lewis (1941) el resumen de las ocho teorías principales en las que se agrupan los estudios sobre el problema nuclear de las bacterias:

- 1) La bacteria no tiene núcleo ni su equivalente
- 2) La bacteria tiene un cuerpo central cromatínico
- 3) La bacteria es núcleo desprovisto de citoplasma.
- 4) La bacteria tiene cuerpos cromatínicos nucleares esparcidos en el citoplasma.
- 5) La bacteria tiene un núcleo polimorfo, cuya forma varía con la edad de la célula.
- 6) La bacteria tiene un núcleo formado por pequeñas partículas de cromatina dispersas uniformemen-

te en el citoplasma.

- 7) La bacteria tiene uno o más verdaderos núcleos vesiculares.
- 8) La bacteria tiene un " cordón de genes", desnudo e incrustado con cromatina semejante a un único cromosoma.

Todas estas teorías están basadas en los resultados obtenidos, en su mayoría, por técnicas de coloración y reacciones microquímicas, y sus interpretaciones no siempre han sido reales, ya que en muchos casos, posteriores estudios han demostrado que estructuras a las que se atribuía naturaleza nuclear, correspondían a contenidos o material de reserva de la célula.

Una de las reacciones microquímicas más generalizada en estos trabajos es la reacción de Feulgen, mediante la cual se pone en evidencia la presencia del ácido desoxirribonucleico, componente esencial del núcleo, y que ha sido utilizada por muchos investigadores. Este test se basa en la reacción de Schiff, es decir en la coloración violeta característica de los aldehídos que recoloran la fucsina decolorada por el anhídrido sulfuroso. Según Feulgen y Rossembeck, el ácido timonucleico, componente esencial de las nucleoproteínas, previa hidrólisis parcial con ácido clorhídrico, es disociado en ácido fosfórico, glúcido bases púricas y bases pirimidinas; el agente activo es el glúcido, que es una pentosa (desoxirribosa).

Empleando esta técnica se han observado estructuras definidas en el interior de la célula bacteriana, aunque con ligeras discrepancias en cuanto a su forma y posición. Tanto Stille (1937) como Piekarski (1937) encontraron un único cuerpo esférico, Feulgen positivo, cerca de cada extremo de la célula y observaron que dichos cuerpos se dividen precediendo a la división celular. Piekarski propuso el nombre de "nucleoides" para esas estructuras ya que tanto en su comportamiento como en su composición química, son

semejantes a núcleos.

También Neumann demostró gránulos similares en células de Proteus sp. Escherichia coli, Bacillus sp. y otros, usando coloración de Giemsa y la reacción de Feulgen.

Sin embargo Knaysi(1938) duda de la especificidad de esa reacción y opina que su eficacia disminuye en la célula bacterial y en las levaduras donde el ácido nucleico está presente muy frecuentemente como material de reserva. En un trabajo sobre los contenidos celulares y las estructuras nucleares de un estafilococo, este autor hace un detallado estudio de las técnicas de coloración de volutina, grasas, glicógeno, iógeno y cromatina, así como también de los solventes y reactivos necesarios para reconocerlos y diferenciarlos de la substancia nuclear cuya presencia comprueba (Knaysi, 1942). El núcleo así demostrado aparece, en las células en reposo, como un único gránulo esférico o escasamente ovoidal; las células en crecimiento activo presentan de 2 a 4 gránulos entre los cuales se encuentran algunos cuyas formas indican alargamiento y división.

Otro trabajo que aporta pruebas convincentes de la existencia del núcleo en las bacterias es el de C.F. Robison (1942, 1944, 1946) cuyas conclusiones coinciden con las de Badian y Fiekarski. Su método, que es una modificación del método de coloración con Giemsa utilizado por Fiekarski, consiste en tratar los preparados de células vegetativas y de esporas con ácido clorhídrico N a 60°C y luego teñirlos con solución Giemsa. Esta técnica revela estructuras en forma de "dumbbell" (1) que aparecen en distintos estados de división. Estudiando su evolución en el desarrollo de la célula llega a la conclusión de que esos cuerpos cromáticos, Feulgen positivos, en forma de "dumbbell" que aparecen generalmente de a par en las células

(1) Por ser "dumbbell" un término muy generalizado en la literatura correspondiente y por razones de comodidad lo hemos adoptado en nuestras descripciones. Su significado es: palanqueta de gimnasia.

vegetativas, son comparables a los cromosomas de las células superiores.

Confirmando estas conclusiones, los cuerpos cromáticos han sido demostrados por Lewis (1942), Kliencberger-Nobel(1947) Bisset(1948) Flewett(1948) y otros.

Vendrely(1945) explica porqué el núcleo se hace visible después de ser hidrolizadas las células: en el tratamiento con ácido clorhídrico, los ácidos ribonucleicos son eliminados de la célula, y el citoplasma, inicialmente basófilo pierde ese carácter y se vuelve poco coloreable por el Giemsa; los ácidos desoxiribonucleicos, mucho más resistentes, conservan sus propiedades tintoriales y aparecen como estructuras definidas.

Boivin y colaboradores han utilizado un criterio muy interesante para la demostración del núcleo en las bacterias que consiste en la aplicación de enzimas. Partiendo de la base de que en las bacterias el ácido ribonucleico está localizado en el citoplasma y el desoxiribonucleico en el núcleo, y que el primero dificulta la observación de las estructuras nucleares, Tulasne y Vendrely(1947, a, b; 1948) han empleado un método que consiste en tratar las células con ribonucleasa; utilizando luego una coloración adecuada, han observado un cuerpo cromofílico que presenta distintos aspectos de constricción y división y que identifican con el núcleo. El tratamiento con desoxiribonucleasa a continuación de la ribonucleasa, elimina también esos gránulos nucleares.

No menos interesantes y demostrativas son las investigaciones de Knaysi y Mudd(1943) sobre la estructura interna de las bacterias revelada por el microscopio electrónico. En ellas se llega a la conclusión de que el material nuclear se presenta en diferentes estados en las diferentes bacterias y que varía también en el curso del desarrollo de la célula. Así, en células jóvenes, en crecimiento

activo, los gránulos aparecen reducidos en tamaño y en algunas células no fueron visibles; también notaron un aumento en la opacidad del citoplasma, cuya explicación la encuentran en la disolución parcial del material que forma los gránulos durante el crecimiento activo de la célula.

En un trabajo posterior Knaysi y Baker(1947) hicieron germinar esporas de Bacillus mycoides en un medio sin nitrógeno y sin fosfato. En esas condiciones, durante el crecimiento, se consume el ácido ribonucleico citoplasmático (Knaysi, 1948 a) y observadas con el microscopio electrónico, se evidencian cuerpos opacos que han sido interpretados como núcleos. Esos núcleos son, al principio, polares, pero posteriormente pueden ocupar otras posiciones.

Hillier, Knaysi, y Baker(1948) han perfeccionado la técnica para la preparación y observación de las células en el microscopio electrónico. Consiste en hacer crecer las bacterias en una delgada película de colodión adherida al medio nutritivo sólido o líquido, lo que disminuye al mínimo las alteraciones en las células.

En un reciente trabajo, Hillier, Mudd y Smith (1949) examinaron la estructura interna de células de Escherichia coli con el microscopio electrónico, empleando técnicas mejoradas que revelaron las estructuras internas de la célula bacterial con más detalle.

Muchos son los trabajos que podrían aún citarse y cuyas conclusiones coinciden, en mayor o menor grado, con los trabajos expuestos, en cuanto a la forma, número y disposición de las estructuras cromatínicas en las bacterias y su diferenciación de otros contenidos celulares. Por ello nos limitaremos a anotarlos en el índice bibliográfico, evitando así prolongar excesivamente este capítulo.

Y para finalizar nos queda por considerar el trabajo que originó esta tesis. Su autor, Miguel L. Gratacos(1942) basándose en la dificultad que representa el ectoplasma

para la tinción intracelular, utiliza el licor de Schweitzer, seguido por una sencilla coloración, para poner en evidencia el núcleo en las bacterias. En un trabajo similar (Mugaburu, 1945) utilizando otro disolvente de la celulosa y modificando la técnica, se aseguran resultados semejantes.

Analizando los distintos trabajos expuestos, se deduce que la existencia del núcleo en las bacterias, está afirmada por muy diversas técnicas. Sin embargo, el valor de las mismas en cuanto a la demostración del núcleo se refiere, disminuye al considerárselas aisladas. Así, las técnicas de coloración con las cuales se demuestra la presencia de gránulos basófilos que se tiñen con los colorantes nucleares, no aportan valor convincente, ya que los gránulos de volutina presentan esas mismas características, tanto, que han sido tomados por núcleos en algunos trabajos.

Tampoco es posible afirmar la naturaleza nuclear de los corpúsculos presentes en algunas bacterias por el hecho de dividirse durante la multiplicación celular, ya que ésta es también una propiedad de ciertos contenidos celulares. En cuanto a las técnicas microquímicas utilizadas (Feulgen) algunos autores dudan de su especificidad. Por otra parte, las técnicas de coloración en general, requieren un tratamiento demasiado enérgico para la delicadeza de la célula bacteriana y podrían evidenciar estructuras inexistentes como tales.

Las técnicas hasta ahora desarrolladas con el microscopio electrónico tampoco permiten, por sí solas, asegurar la naturaleza nuclear de las estructuras reveladas.

Hay que tener en cuenta, también, que los resultados obtenidos con una misma técnica varían con las distintas bacterias y aún con la edad de una misma bacteria, lo que

impide definir y generalizar el concepto de núcleo en la célula bacterial. Por otra parte, falta un criterio seguro para la definición de dicho concepto (Knaysi, 1938)

Por lo tanto, sólo un estudio comparativo de las técnicas de coloración y las del microscopio electrónico pueden dar resultados reales en este tan discutido tema y, en ese sentido, cabe señalar el prolífico y detallado trabajo de Knaysi y colaboradores que han logrado aportar en los últimos años, valiosos resultados en el campo de la citología bacterial.

Refiriéndonos ahora al trabajo de Gratacos (1942), diremos que siendo un verdadero hallazgo en lo que a técnicas de coloración se refiere, es de lamentar que su autor no haya dado a conocer las hipótesis en que basa su afirmación acerca de la naturaleza nuclear de los corpúsculos teñibles.

Es nuestro intento, como ya hemos dicho, estudiar el comportamiento de esos corpúsculos frente a los distintos tratamientos y dilucidar, aunque sólo sea en parte, su naturaleza.

---

C A P I T U L O    III

MATERIAL Y METODOS

Con el fin de estudiar el comportamiento de los distintos tipos de bacterias que pudieran presentar variaciones con el método de coloración usado, se trabajó con bacterias Gram positivas, Gram negativas, esporuladas y no esporuladas.

Las cepas utilizadas son de distinta procedencia: en su mayoría pertenecen al material de enseñanza de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; otras han sido tomadas de la colección del Instituto de Microbiología Agrícola del Ministerio de Agricultura y unas pocas han sido aisladas en el laboratorio de tesis.

La lista de las cepas es la siguiente:

Bacillus cereus

Bacillus cereus var. mycoides

Bacillus subtilis

Bacillus sphaericus var. fusiformis

Bacillus laterosporus

Bacillus macerans

Bacillus polymyxa

Bacillus megatherium

Escherichia coli

Micrococcus pyogenes var. aureus

Acetobacter xylinum

Klebsiella pneumoniae

Pseudomonas aeruginosa

Proteus vulgaris

Lactobacillus casei

Lactobacillus delbrueckii

Clostridium butyricum

Un streptococcus de la boca

Un Lactobacillus sp. aislado de maíz en fermentación a 50° C.

Todos estos cultivos fueron mantenidos en agar extracto de carne, salvo Lactobacillus, Acetobacter y Clostridium que fueron repicados en agar agua de levadura los dos primeros y en medio hígado-harina de maíz el segundo.

La temperatura de incubación fué la más adecuada a cada bacteria.

Con fines comparativos se utilizaron también las siguientes cepas de hongos:

Saccharomyces cerevisiae

Schizosaccharomyces pombe

Mycoderma vini

Oospora lactis

Rhizopus nigricans

Mucor sp.

Aspergillus sp.

Penicillium sp.

En algunos casos se trabajó con células desprendidas del epitelio bucal, glóbulos blancos, células epidérmicas de catáfilas de Allium cepa y células de raicillas de Allium sativus.

A continuación se describen las técnicas de coloración empleadas:

1) Técnica de Gratacos

Soluciones:

A) Reactivo de Schweitzer: a una solución de sulfato de cobre al 5 %, conteniendo también 5 % de cloruro de amonio, agregar hidróxido de sodio aproximadamente

te al 10 % hasta producir un abundante precipitado celeste de hidróxido cúprico. Separarlo por filtración o centrifugación, lavarlo con agua destilada, secarlo entre papel de filtro y disolverlo en poco amoníaco.

B) Azul de metileno de Manson:

Azul de metileno \_\_\_\_\_ 2 gr.  
Borax \_\_\_\_\_ 5 gr  
Agua destilada \_\_\_\_\_ 100 c.c.

C) Fucsina básica al 0.5 %

Técnica:

- 1) Extender el preparado en el porta-objeto.
- 2) Fijar por calor, sublimado de ácido acético o alcohol; lavar y secar.
- 3) Cubrir el preparado con el reactivo de Schweitzer y dejar actuar durante 10 minutos. Evitar la evaporación para que no se formen precipitados.
- 4) Lavar con abundante agua. Si hubiera precipitado lavar con amoníaco. Luego, lavar con agua.
- 5) Cubrir con azul de metileno de Manson, un minuto.
- 6) Lavar con agua.
- 7) Cubrir con fucsina básica 1 minuto.
- 8) Lavar y secar.

---

## 2) Técnica de Robinow

- 1) Fijar el preparado con ácido osmico: en un cubreobjeto se coloca la suspensión de bacterias y sin secar se la somete a la acción de una atmósfera concentrada de ácido ósmico, que se consigue de la siguiente manera: en una caja de vidrio cubierta, de aproximadamente 2.5 cm de profundidad, se ponen 4-5 ml. de tetróxido de osmio al 2 % y se agregan perlas de vidrio en cantidad suficiente.

te para que, al colocar el cubreobjeto con la suspensión hacia arriba, quede sobre el nivel del líquido. El tiempo de fijación es variable según el material empleado, pero oscila entre 3-5 minutos.

- 2) Secar al aire
- 3) Sumergir el preparado en solución normal de ácido clorhídrico a 60° C durante 7 minutos
- 4) Lavar rápidamente
- 5) Sumergir en solución buffer diluida (Soerensen M/200) de pH 6.9- 7.0 que contenga una gota por ml. de colorante de Giemsa. Dejar una hora a temperatura ambiente o bien media hora a 37° C.
- 6) Las preparaciones son luego diferenciadas con la siguiente serie de mezclas de acetona y xilol: 20:1 ( 2 -4 segundos), 14:6(10 segundos) y 6:14 ( 10 segundos) y examinadas en xilol. La diferenciación se continúa hasta que los cuerpos cromáticos aparezcan nítidos.

La técnica empleada por nosotros para la fijación fue la siguiente: la solución de tetróxido de osmio al 2 % fué colocada en un frasco pequeño de boca ancha.

La suspensión sin secar, hecha sobre un porta-objeto o sobre un cubre-objeto fué puesta invertida sobre la boca del frasco, de tal modo que la gota con la suspensión recibiera directamente los vapores de ácido ósmico.

Dió buenos resultados, también, mezclar una gota de la solución de tetróxido de osmio con la suspensión húmeda de bacterias, sobre el mismo porta, dejándola luego secar al aire. El resto de la técnica se siguió como en la original; suprimiéndose la diferenciación.

### 3) Técnica de Feulgen:

- 1) Fijar el preparado por vapores de ácido ósmico ( 20 minutos) o por sublimado de alcohol.

- 2) Hidrolizar, sumergiendo el preparado, primero en frío en solución normal de HCl, durante 1 minuto; luego en soluc. normal de HCl a 60° C durante 4-15 minutos. Lavar rápidamente en HCl normal frío.
- 3) Lavar en agua destilada, ligeramente.
- 4) Sumergir el preparado en el reactivo de Feulgen durante 2 horas como mínimo.
- 5) Lavar con la solución sulfurosa siguiente:

Agua \_\_\_\_\_ 200 c.c.

Bisulfito de sodio al 30 % \_\_\_\_\_ 10 c.c.

ácido clorhídrico normal \_\_\_\_\_ 10 c.c.

- 6) Lavar con agua.

El reactivo de Feulgen se prepara de la siguiente manera: disuélvase 0.5 gr. de fucsina básica ( diamant fuchsin Grübler) vertiendo sobre ella 100 c.c. de agua destilada en ebullición y agitando bien. Enfríese a 50°C y fíltrese. Agréguese 10 c.c. de HCl normal al filtrado y después 0.5 gr. de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( o NaHSO<sub>3</sub>) agítese muy bien esta solución y colóquese en la obscuridad en un frasco bien tapado por 12 a 18 horas. En este tiempo la solución debe haberse decolorado y debe aparecer sin color, lo que es preferible, o color paja. Guardar el reactivo en la obscuridad. Si toma tinte rojo o rosa, se ha vuelto inutilizable.

---

#### 4) Técnica de Newton:

Soluciones:

A: Sol. acuosa de cristal violeta  
al 1 %

B: I \_\_\_\_\_ 1 %

IK \_\_\_\_\_ 1 %

alcohol 80% a 100 c.c.

- 1) Fijar el preparado a la llama
- 2) Teñir con sol. A durante 3-10 minutos
- 3) Lavar con agua destilada
- 4) Tratar con solución B durante 15-50 segundos
- 5) Lavar con alcohol absoluto.

---

5) Técnica de la hematoxilina férrica de Heidenheim

Soluciones:

A) Picro-formol de Bouin:

Formol comercial\_ \_ 1 parte en volumen

Agua destilada\_\_\_\_\_ 3 partes en volumen

Acido pícrico\_\_\_\_\_ a saturación

En el momento de su empleo se le agrega 5 % de ácido acético cristalizabile-

B) Mordiente: solución acuosa al 4 % de alumbre férrico (sulfato amónico-férrico). Al preparar esta solución hay que tener cuidado de seleccionar los cristales de color violeta puro.

C) Solución acuosa al 0.5 % de hematoxilina. Esta solución se prepara mejor disolviendo los cristales de hematoxilina primero, en una pequeña cantidad de alcohol 95 %.

1) Fijar en solución A por tiempo variable según el material. Nosotros fijamos por 20 minutos los preparados en porta objetos y por 12-24 horas cuando se fijó en bloque el medio de cultivo. Para detalles nucleares las levaduras se siembran en medio sólido (zanahoria, por ej.) y una vez desarrollado se fija en bloque el medio de cultivo

para evitar alteración en las células. En el fijador de Bouin se deja 24 horas. Se pasa por alcohol 70 % y luego se hace el fro. tis; se deja secar y se lo sumerge en alcohol 70 % durante 24 horas.

- 2) Sumergir el material en la solución B por un período de tiempo que oscila desde media hora hasta 24 horas; este último tiempo ha sido el más generalmente usado por nosotros.
- 3) Lavar bien con agua
- 4) Sumergir en la solución de hematoxilina donde se deja el mismo tiempo que el mordiente.
- 5) Diferenciar en el mordiente diluido (2%) controlando bajo el microscopio.

---

6) Técnica de la hematoxilina férrica modificada por Tuant\*

Soluciones:

A) Líquido de Navashin:

a)  $\text{CrO}_3$  \_\_\_\_\_ 1.5 gr.

Ac. acético glacial' \_\_\_ 10 ml.

Agua destilada \_\_\_\_\_ 90 ml.

b) Formalina \_\_\_\_\_ 40 ml

Agua destilada \_\_\_\_\_ 60 "

En el momento de usar, mezclar a y b

B) Sol. de sulfato amónico-férrico al 2%

C) Sol. de hematoxilina al 0.5 %

D) Sol. acuosa saturada de ác. pícrico.

- 1) Sumergir el material en el líquido de Navashin durante 20 minutos aproximadamente
- 2) Lavar en agua corriente durante 20 minutos.

- 3) Sumergir en sulfato amónico-férrico durante 20 minutos
- 4) Lavar en agua corriente durante 6-10 minutos luego lavar con agua destilada.
- 5) Teñir con hematoxilina durante 20 minutos.
- 6) Lavar con agua.
- 7) Diferenciar en solución acuosa saturada de ác. pícrico, controlando bajo el microscopio.
- 8) Lavar en agua corriente durante 30 minutos.

7) Técnicas para la tinción de inclusiones:

I) Volutina: teñir los preparados fijados a la llama, con azul de metileno y solución de Lugol, que ennegrece los cuerpos de volutina.

En levaduras puede también usarse la tinción vital, empleando sol. de rojo neutro al 0.001 o 0.005 %, o bien sol. de azul de metileno.

Un método aconsejado por Knaysi para la tinción de volutina en bacterias es el siguiente: Fijar el preparado a la llama, y teñirlo con azul de metileno de Meyer (1 ml. de sol. alcohólica saturada de azul de metileno en 10 ml. de agua), por dos minutos. Escurrir el colorante y sumergirlo durante 3 minutos en sol. acuosa de azul de metileno al 1 % conteniendo 1 o 2 % de ácido acético (para cultivos maduros o viejos 1 % de ác. acético; para cultivos en crecimiento activo, 2 %)

El porta se lava luego con agua corriente, se seca y examina.

II) Glucógeno: puede teñirse con Lugol fuerte; los gránulos toman color marrón rojizo sobre citoplasma amarillento.

III) Iógeno: se tiñe de color azul con I

IV) Cuerpos grasos

Soluciones:

A) Lugol diluido de 3-5 veces

B) Fucsina básica al 0.1 %

Suspender las bacterias en escasa cantidad de sol.A. Dejar 5 minutos y luego agregar unas gotas de fucsina básica. Observar entre porta y cubre.

---

C A P I T U L O    IV

RESULTADOS EXPERIMENTALES

De acuerdo con lo expuesto en la introducción se trazó el siguiente plan de trabajo:

- 1) Aplicación de la técnica de Gratacos a bacterias Gram positivas y Gram negativas, esporuladas y no esporuladas
- 2) Estudio de la variación del corpúsculo teñible en los distintos tiempos de la curva de crecimiento de la bacteria.
- 3) Comparación con otros métodos de coloración, en especial con aquellos utilizados para la tinción de sustancia nuclear.
- 4) Variantes del método de Gratacos. Ensayos con diferentes reactivos y colorantes.
- 5) Investigación de contenidos celulares. Tinción y tratamiento con disolventes de volutina, glicógeno y grasa. Comparación con la técnica en estudio.
- 6) Ensayos con disolventes de las sustancias cromáticas. Combinación con la técnica de Gratacos. Comparación de resultados.

A continuación se detalla el trabajo experimental y los resultados obtenidos correspondientes a cada uno de los tópicos enumerados.

1.- Aplicación de la técnica de Gratacos a bacterias Gram positivas y Gram negativas esporuladas y no esporuladas.-

De acuerdo con la explicación dada en el capítulo anterior, se aplicó el método de Gratacos a una variedad de bacterias, así como también a otras células, con el fin de establecer comparaciones que pudieran ser útiles en la interpretación de esta coloración. Los tiempos de tratamiento con cada reactivo han sido, por lo general, los establecidos en la técnica; sin embargo, en algunos casos, fué necesario variarlos, de acuerdo con las propiedades tintoriales del material utilizado.

En la ~~gran~~ mayoría de las bacterias tratadas por este método, se observó un corpúsculo único, esférico o alargado, central y de color violeta muy oscuro que se destaca nítido sobre el fondo rojo del resto del citoplasma. (Fig. 1)

En las bacterias esporuladas el tamaño del corpúsculo es ligeramente mayor que en las no esporuladas.-

En cuanto a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, no hemos observado diferencias notables en la coloración.-

Con fines comparativos se aplicó el mismo método a otras células como se detalla a continuación:

Hongos: siguiendo la misma técnica que la empleada en las bacterias, en levaduras se han coloreado células de Saccharomyces cerevisiae, Mycoderma vini y Schizosaccharomyces pombe.

En Saccharomyces cerevisiae la coloración se presenta poco nítida, no apareciendo los corpúsculos bien definidos. Parece ser que en el interior de la célula existe gran cantidad de material teñible, que impide la diferenciación de alguna posible estructura.-

En Mycoderma vini, en cambio, la aplicación de la técnica evidencia la presencia de gránulos de diferentes tamaños, por lo general esféricos y distribuidos en toda la cé-

lula. Un aspecto semejante presenta Schizosaccharomyces pombe.

Se han utilizado también hifas jóvenes de Penicillium sp., Aspergillus sp., Mucor sp., Rhizopus nigricans y Oospora lactis.-

La coloración de mohos se hizo en la siguiente forma: en las especies que forman micelio aéreo abundante, se tomó una porción del mismo y se la fué sumergiendo en las soluciones correspondientes, puestas en pequeños recipientes de vidrio. En los mohos que no forman micelio aéreo abundante o para observar esporas en germinación, la técnica seguida fué la siguiente: se sembró el hongo en cada de Petri con un medio favorable, y una vez alcanzado el desarrollo adecuado, se procedió a efectuar la coloración en la misma caja, vertiendo en ella las sucesivas soluciones. Esta técnica resulta sencilla y evita el incómodo manipuleo de las hifas que no sólo las daña sino que, en muchos casos, se pierde parte del material en los sucesivos pasajes por las soluciones. Ya que con este procedimiento es necesario una mayor cantidad de cada solución, puede hacerse una coloración simultánea sembrando, en una misma caja dividida en sectores, varios hongos. Una vez efectuado el último lavado, se hace un preparado con cada material entre porta y cubre.

En el micelio de Penicillium sp Aspergillus sp., Rhizopus sp y Mucor sp. aparecen gran cantidad de contenidos entre los que se destacan algunos corpúsculos de forma definida, esféricos o alargados, distribuidos en forma irregular. En otros casos los filamentos aparecen teñidos uniformemente. En las esporas se observan corpúsculos de distinto tamaño distribuidos en su interior.

En Oospora lactis, en cambio, la coloración se presenta, en los filamentos jóvenes, como corpúsculos de muy diverso tamaño y de borde muy neto que se destacan nítidos sobre el citoplasma rojo. En los oidios se tiñen numerosos gránulos pequeños. (Fig. 1, e)

En esporas en germinación de Rhizopus nigricans se han observado corpúsculos más o menos esféricos, en gran cantidad, distribuidos irregularmente en el interior del cuerpo de la espora y en el tubo germinativo.

Otras células; se colorearon células de catáfilas de Allium cepa y de raicillas de Allium sativus. La técnica empleada fué la siguiente: utilizando una lanceta y una pinza, se separaron capas de células epidérmicas e introduciéndolas en pequeños tubos de vidrio, con ambos extremos cubiertos por gasa, fueron sumergidas en las distintas soluciones. Luego se las observa entre porta y cubre.

En estas células fué necesario disminuir el tiempo de tratamiento con el licor de Schweitzer, dado que se destruyen muy fácilmente las paredes celulares. Con todo, las coloraciones resultantes no fueron satisfactorias, debido a que el material se tiñe muy intensamente.

Se hicieron, además, observaciones en células desprendidas del epitelio bucal y en leucocitos de sangre humana, coloreados con Gratacos.

En las primeras el material obtenido del epitelio bucal se extendió sobre un porta objeto y se siguió la técnica corriente. Es de hacer notar que sin licor de Schweitzer la coloración es semejante.

En los leucocitos, la coloración se hizo con frotis de sangre hechos en igual forma que para observaciones clínicas. Se evitó en este caso, como es lógico, la fijación por calor y se acortó el tiempo de tratamiento con el licor de Schweitzer.

Tanto en células epiteliales como en los leucocitos se constató la coloración de Gratacos, si bien en los últimos resultó algo más difícil la observación, debido a la desintegración de la mayor parte de las células.

De estas observaciones podemos deducir que en todas las bacterias ensayadas se ha demostrado, mediante la técnica de Gratacos, la presencia de un corpúsculo cuya forma, y posición podrían corresponder a un núcleo. Sin embargo, en las levaduras y en los mohos ensayados, las coloraciones evidencian la presencia de un contenido no nuclear cuyas características varían con el material de que se trate. No obstante es interesante hacer notar que en otras células nucleadas (cél. epiteliales, leucocitos) la técnica de Gratacos revela un núcleo sin alteraciones visibles de forma, tamaño y posición.

---

2.- Estudio de la variación del corpúsculo teñible en los distintos tiempos de la curva de crecimiento de la bacteria aplicando el método de Gratacos.-

Ante la imposibilidad de efectuar estas observaciones en todas las bacterias ensayadas, se eligió Bacillus cereus var. mycoides por presentar algunas condiciones ventajosas: tamaño conveniente de la célula, desarrollo rápido y nitidez invariable en la coloración.

La técnica seguida fué la siguiente: de un cultivo viejo de Bacillus cereus var mycoides hecho en agar nutritivo standard, se sembró una estría del mismo medio y se incubó a 37° C. Se hicieron frotis a los 5, 15, 30, 60, 90 minutos y a las 12 y 24 horas de edad, tiempos que fueron elegidos por ser en ellos donde se presentan las características más interesantes en la evolución del corpúsculo.

Los frotis fueron hechos en cubreobjetos y luego montados con bálsamo de Canadá. Para poder efectuar la coloración simultánea de todos los frotis y evitar así las posibles variaciones involuntarias en la técnica, se adoptó, por sugerencia del Sr. R. Carlisle, un soporte que consiste en lo siguiente: en un tapón de goma sostenido en su parte central por una varilla de vidrio, se hacen, alrededor del mismo, 2 o 3 incisiones paralelas, de aproximadamente medio centímetro de profundidad, de tal modo que, separando escasamente los labios de la incisión e introduciendo entre los mismos un cubreobjeto, quede éste firmemente sostenido al cerrarse el corte. De esta manera pueden ubicarse, en cada uno de los cortes, varios cubres. Esto facilita mucho la tarca, ya que los preparados pueden ser manipulados simultáneamente en los distintos recipientes que contengan las soluciones de coloración.--

Las observaciones anotadas son las siguientes: (Fig. 2, A)  
a) Esporas (de un cultivo viejo): con la técnica de Gratacos las esporas aparecen incoloras; los escasos bacilos

- presentes están teñidos uniformemente, sin diferenciación alguna, o bien presentan un corpúsculo muy pequeño en su interior.
- b) a los 5 minutos de incubación: aproximadamente el 50 % de las esporas presentan una coloración intensa rojo violeta en casi su totalidad; solamente en los extremos la coloración se atenúa. Es como si el corpúsculo cromático, ahora visible, ocupara casi totalmente la célula, cuyo tamaño ha aumentado ligeramente. Hay aún un gran número de esporas incoloras.
  - c) A los 15 minutos de incubación: el corpúsculo teñible presenta ahora visible forma esférica, que se destaca sobre el fondo rojizo del cuerpo de la célula. Quedan aún escasas esporas incoloras.
  - d) A los 30 minutos de incubación: en líneas generales presenta el mismo aspecto que la anterior, aunque las células son de un tamaño ligeramente mayor. No hay esporas incoloras.-
  - e) A los 60 minutos de incubación: las células se presentan alargadas, así como también el corpúsculo interior, que sigue ocupando la casi totalidad de la célula.
  - f) A la hora y media de incubación: el corpúsculo aparece ahora en posición central, alargado en el mismo sentido del eje longitudinal de la bacteria que ya ha alcanzado su tamaño definitivo. Se presentan muy pocos bastones largos con dos corpúsculos en su interior, que corresponden a dos bacterias, aunque el límite de separación entre ambas células no es claramente visible.
  - g) A las 12 horas de incubación: hay muy pocas células aisladas que conservan las características presentadas en f, es decir, un corpúsculo alargado en su interior. La mayoría están formando cadenas en las que se ven corpúsculos más o menos esféricos de menor tamaño que los que se presentan en las células aisladas. En algunas se ven estructuras alargadas, como si se estuviera iniciando un proceso de división, pero no son muchas.

h) A las 24 horas de incubación; los corpúsculos se presentan de tamaño menor que en los anteriores; por lo general están situados en la parte central, pero en muchas células se observan otros corpúsculos más pequeños distribuidos irregularmente en toda la célula.-

En algunas bacterias comienzan a formarse las esporas en la parte central, quedando relegados a los extremos los corpúsculos teñibles.

---

De lo expuesto anteriormente se deduce que, mediante la aplicación de la técnica de Gratacos en los distintos tiempos de desarrollo de la bacteria, es posible observar que el corpúsculo teñible sufre una evolución, principalmente en lo que se refiere a su forma y tamaño.

El material cromático comienza a aparecer en los primeros minutos de incubación, al principio ocupando totalmente la célula, luego delimitándose más definitivamente en la parte central de la misma. En células jóvenes el corpúsculo es de mayor tamaño y de forma alargada. A medida que la célula crece, el tamaño del corpúsculo disminuye algo y adopta una forma más esférica. De tal modo que, en el curso del desarrollo de la célula, es posible observar sucesivas fases en la evolución del corpúsculo, entre las cuales no faltan aquellas que podrían interpretarse como procesos de división del mismo.

3.- Comparación con otros métodos de coloración, en especial con aquellos utilizados para la tinción de substancia nuclear.

Con el fin de establecer comparaciones con el método de Gratacos y sacar posibles conclusiones sobre la naturaleza de los corpúsculos teñibles, se hicieron ensayos aplicando métodos de coloración, en especial aquellos recomendados como convenientes para revelar estructuras nucleares, adaptándolos, desde luego, a la técnica microbiológica.-

Comenzando con el método de Robinow hicimos preparados periódicos siguiendo el mismo esquema que se describió en 2). La bacteria usada fué, también, en este caso, Bacillus cereus var. mycoides para mejor comparación. (Fig. 2. B)

a) Al 0 minuto de incubación: las esporas se presentan incoloras, con un único corpúsculo sobresaliendo del citoplasma, de color violeta obscuro. Se observan también algunas bacterias aisladas, teñidas uniformemente sin ninguna diferenciación.

b) A los 5 minutos de incubación: el corpúsculo teñible de las esporas se ha extendido ocupando casi totalmente la célula cuyos extremos aún permanecen incoloros. El tamaño de la célula también ha aumentado. Quedan, además, gran cantidad de esporas que presentan el aspecto descrito anteriormente.

c) A los 15 minutos de incubación: el aspecto no ha variado mayormente salvo en cuanto al aumento de la afinidad basófilica del citoplasma que ha tomado color azul claro. Hay, desde luego, mayor número de células que presentan el corpúsculo ocupando casi todo el citoplasma.

d) A los 30 minutos de incubación: las células aparecen totalmente coloreadas, con el corpúsculo más obscuro ocupando la misma posición que en c)

e) A las 12 horas de incubación: las bacterias apare-

cen en cadenas o aisladas. Presentan en su interior una serie de estructuras teñidas más profundamente que el citoplasma. Son alargadas y están dispuestas en sentido transversal al eje mayor de la bacteria. Por lo general hay dos por célula.

f) A las 24 horas de incubación: el preparado se presenta semejante al anterior. En algunos filamentos no hay diferenciación, en otros los corpúsculos son más pequeños.

A continuación damos un breve resumen de las principales características descritas por Robinow.

Esporas: un cuerpo cromático, pequeño, unido al citoplasma, que presenta distintas formas según la posición de la espora. Por acción del HCl N, a 60° C, el núcleo se contrae, siendo ésa la causa de la forma asimétrica que presenta la espora, con el núcleo sobresaliente.

Cinco minutos de incubación: los cuerpos cromáticos aumentan de tamaño y hacen invisible la diferenciación en la espora, que se tiñe profundamente.

Quince minutos de incubación: el material cromático reaparece en el centro de la célula y gradualmente aumenta de tamaño.

Cuarenta minutos de incubación: comienzan a formarse bandas anchas que pueden tomar distintas formas: tetradas de cuerpos esféricos, figuras en X o anchas bandas cromáticas formadas por un par de cuerpos en forma de "dumbbell")

Dos horas de incubación: las células vegetativas se alargan y las estructuras cromáticas intracelulares se dividen; el plano de división es en ángulo recto al eje mayor de la célula. Cada división celular es precedida por una división de cada uno de los dos componentes de la estructura cromática.

Después de 7-10 horas de incubación: abundan células con material cromático disperso y un poco más tarde el cul-

-tivo consiste principalmente de largos filamentos algunos de los cuales contienen unos pocos gránulos muy pequeños que se tiñen profundamente.

Es de hacer notar que las estructuras cromáticas descritas por Robinow tienen forma de "dumbbell" y están en posición transversal al eje mayor de la bacteria, dividiéndose a lo largo, es decir, paralelo al eje menor de la célula. Además, en los bacilos, en las primeras fases de crecimiento, se observan grupos de 2 o 4 cuerpos cromáticos distribuidos simétricamente en la célula.

Ahora bien, comparando este esquema con el descrito anteriormente (en el punto 2) se observa que tanto la forma como el tamaño y la evolución del corpúsculo teñible a través del ciclo de cultivo de la bacteria no son iguales. Confrontando los preparados de esporas teñidos con ambos métodos, vemos que, en Gratacos, la espora aparece incolora, sin ninguna diferenciación, mientras que en Robinow es bien visible la presencia de un corpúsculo sobresaliente y teñido intensamente. A los 5, 15 y 30 minutos el aspecto presentado por ambos métodos es semejante. A las 12 horas se notan nuevamente diferencias con ambos métodos; el corpúsculo teñido por Gratacos es siempre central, esférico o alargado y de mayor tamaño que el que revela Robinow. Con esta última técnica las estructuras se presentan como pequeñas barras transversales al eje mayor de la bacteria. Con los métodos de observación usados por nosotros no nos es posible determinar la forma precisa de esas barras pero sí podemos afirmar que su tamaño es menor y su número mayor, que el que presenta el método de Gratacos. (Cuadro I, A)

Se ha aplicado también la técnica de Robinow a otros organismos. En células de Oospora sp el aspecto es diferente al presentado con Gratacos; los corpúsculos son grandes, más o menos esféricos de contornos algo borrosos; por lo general hay dos por célula. No se observan gránulos pequeños como en la coloración de Gratacos. (Cuadro I, B)

En Saccharomyces cerevisiae la tinción es muy profunda e irregular.

En Mycoderma vini el aspecto es semejante al descrito en Oospora sp es decir pocos gránulos y por lo general de contornos borrosos.

Otro método ensayado por nosotros es el de Newfón. Las coloraciones observadas con esta técnica son muy variables, de tal modo que no hemos podido sacar conclusiones que puedan generalizarse. En Bacillus subtilis, por ejemplo, el aspecto presentado es semejante al de Gratacos, en cuanto a forma y posición del corpúsculo, no así, en lo que respecta al tamaño ya que con este método el gránulo es de tamaño menor.

En Bacillus cereus var mycoides, en algunos casos, la coloración presenta gránulos incoloros en el interior de la célula, como si se tratara de material no teñible. En otros casos se observan muchos corpúsculos pequeños, de color intenso, distribuidos irregularmente en todo el citoplasma.

En Oospora lactis las células aparecen teñidas intensamente y presentan gránulos incoloros o de color claro, como si fuera material no teñible, que se asemejan, en cuanto a forma y posición, a los gránulos más grandes de la coloración de Gratacos.

En Mycoderma vini, el aspecto es semejante pero se ven además, gránulos pequeños de color violeta intenso distribuidos irregularmente.

En las hifas de mohos esta coloración no revela diferenciación alguna; sin embargo, en las esporas se distingue material finamente granulado distribuido en todo el citoplasma.

Aplicando la técnica de Feulgen hemos obtenido los siguientes resultados:

En B. cereus var. mycoides observamos gránulos color rojizo semejantes a los de Gratacos aunque de menor tamaño. (Cuadro I, A)

En Oospora sp. la coloración de Feulgen presenta un aspecto diferente al de la coloración de Gratacos. Se observan

puntos ~~rojo~~<sup>violeta</sup> oscuros, por lo general cerca de los extremos de las células; en la mayoría se ven 1 o 2 gránulos de forma irregular. En los filamentos esos gránulos están distribuidos más o menos regularmente en la parte central. En otros casos se ven dos gránulos juntos, de igual tamaño como si hubiera tenido lugar un proceso de división. (Fig. 3, d) (Cuadro I, B)

En Mycoderma vini el aspecto presentado es semejante, salvo que los corpúsculos son más esféricos y por lo general hay uno solo, central, por célula. En los filamentos están distribuidos regularmente en la parte central.

Para orientarnos mejor en las comparaciones con levaduras, hemos hecho coloraciones de núcleo aplicando la técnica de la hematoxilina férrica de Heidenheim como sigue:

los cultivos de las levaduras utilizadas fueron hechos sobre zanahoria cruda y, una vez obtenido el desarrollo adecuado, se fijó el material introduciendo la estría de zanahoria en el líquido fijador; pasado el tiempo requerido para la fijación, se hicieron frotis en los portaobjetos y se continuó la técnica como está descripta en el capítulo correspondiente. En otros casos, los frotis se hicieron directamente de estrías de agar mosto de malta.

En células de Saccharomyces cerevisiae el aspecto presentado difiere del de Gratacos ya que se observa un punto más o menos esférico, oscuro, de tamaño mucho menor que el de los corpúsculos teñidos por Gratacos.

Las mismas observaciones han sido hechas en Oospora lactis. En los oidios aparecen 1, 2 o 3 corpúsculos pequeños correspondiendo a su estructura plurinucleada. (Fig. 3, c) (Cuadro I, B)

Esta técnica aplicada a Beccerius var. mycoides no dió resultados satisfactorios.

---

En conclusión, las llamadas coloraciones nucleares difieren, al menos en las bacterias y levaduras ensayadas, de la coloración de Gratacos. Generalizando, podemos decir que, en levaduras, la forma, posición y especialmente el número de

gránulos revelado por Grafiacos, no coincide con las otras técnicas. En B.cereus var mycoides la coloración de Feulgen presenta aspectos semejantes en cuanto a forma y posición, no así en cuanto al tamaño de los gránulos. La técnica de Robinow ofrece diferencias de forma, tamaño y número de corpúsculos.

---

#### 4.- Variantes del método de Gratacos.

##### Ensayos con diferentes reactivos y colorantes

Con el fin de averiguar si los reactivos utilizados en el método de Gratacos podían ser sustituidos por otros que dieran resultados similares, se hicieron variantes en las soluciones y en el orden de las mismas.

En la tesis presentada por el Sr. J.C. Mugaburu(1945) se detallan algunas modificaciones de la técnica de Gratacos, una de las cuales es la de suprimir el amoníaco en el reactivo de Schweitzer y disolver el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  en etileno diamina; en esta forma se obtiene un compuesto, también disolvente de la celulosa, que, aplicado a bacterias y a algunas Actinomycetales, permite demostrar, según el autor, un corpúsculo con todos los caracteres morfológicos y microquímicos del núcleo.

Las variantes establecidas por nosotros son las siguientes:

A) Cambio de los colorantes: previo tratamiento con licor de Schweitzer se tiñó el material con:

Safranina<sup>4%</sup> verde brillante ( sol. alcohólica 0.2%)

Giemsa puro

Solución Giemsa( 0.5 c.c. del colorante Giemsa  
en 2 5 c.c. de agua destilada)

Eosina (1%)- Azul de metileno ( 1 %)

Violeta de Genciana ( 0.4 %)Fucsina básica(0.5%)

Azul de metileno de Manson -Alcohol-Fuc.básica.

Los tiempos de acción de cada colorante fueron variados convenientemente de acuerdo a la naturaleza de cada colorante y teniendo en cuenta también las afinidades tintoriales del material empleado.

En todos los casos el resultado fué similar al obtenido con la técnica de Gratacos; debemos destacar que con el colorante de Giemsa hemos obtenido muy buenos preparados.(Fig.3)

Se hicieron tinciones también con las soluciones de

Gram-Nicolle (Violeta de Genciana- Yodo-Alcohol 95%- Fucsina básica) previo tratamiento con licor de Schweitzer pero no se obtuvieron preparados satisfactorios. Sin embargo, combinando Yodo-Violeta de Genciana o Yodo -Fucsina básica se logró en algunos casos, resultados positivos.

B) Cambio del orden de los reactivos: con el fin de dilucidar el papel desempeñado por los reactivos en esta coloración, se hicieron ensayos alterando el orden de los mismos. Se obtuvieron resultados muy variables, de los cuales podemos sólo deducir que el licor de Schweitzer debe actuar siempre en primer término para poder obtener resultados positivos; estos resultados no son alterados por el cambio en el orden de las soluciones colorantes.

C) Sustitución del licor de Schweitzer por otros reactivos: estos ensayos fueron hechos con el fin de averiguar la posibilidad de obtener resultados similares a los de Gratacos reemplazando el licor de Schweitzer por otros reactivos. Estos son:

NH<sub>3</sub> concentrado

Solución de: NH<sub>3</sub> concentrado \_\_\_\_\_ 10 c.c.

H<sub>2</sub>O \_\_\_\_\_ 1 c.c.

NO<sub>3</sub>Ag \_\_\_\_\_ 1 gr.

NaOH N/1

NaOH 10 %

HCl concentrado

HCl N/1

SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentrado

SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0.1 N

Solución acuosa saturada de Cl<sub>2</sub>Cu

Solución en NH<sub>3</sub> concentrado de Cl<sub>2</sub>Cu

Solución de ferrocianuro de K al 1 %

Solución de ferrocianuro de K al 5 %

Cloruro de Zn clorhídrico.

El tiempo de acción dado a cada solución fué el mismo que el establecido en la técnica de Gratacos para el licor de Schweitzer, es decir 10 minutos. Los colorantes empleados fueron los mismos de Gratacos. En algunos casos los reactivos se hicieron actuar en frío y en otros, a 60°C.

Los resultados obtenidos con estas modificaciones han sido sumamente variables ya que, en algunos casos los organismos empleados se presentaban teñidos uniformemente, sin ninguna diferenciación; en otros, el contenido aparentaba un aspecto vacuolar y en fin, en otros se observaban unas estructuras de forma y posición irregulares que no podían ser comparadas con las de Gratacos.

Sin embargo, utilizando  $\text{NH}_3$  concentrado en vez del licor de Schweitzer y teñiendo luego con Giemsa, hemos podido observar, en Oospora lactis, unas estructuras semejantes a las observadas con la técnica de Gratacos, aunque mucho menos numerosas y algo irregulares en su posición. En las células aisladas, esas estructuras se presentan como gránulos rojos, grandes, de forma irregularmente esférica o, más comúnmente, alargada; en los filamentos esos gránulos se distribuyen en forma regular; no existen corpúsculos pequeños como en los preparados teñidos con Gratacos. Esto no se ha observado en los otros materiales tratados con esta misma técnica.

Resultados semejantes hemos obtenido en Oospora lactis utilizando NaOH al 10 %.-

Si se trata con HCl N a 60°C un preparado de esporas de B.cereus var mycoides y luego de lavado se lo tiñe con los colorantes de Gratacos, el aspecto presentado es igual al que se observa con la técnica de Robinow, es decir, un corpúsculo sobresaliente, de color violeta oscuro, que se destaca sobre el citoplasma de color rojo.

Indudablemente, basándonos en los resultados expuestos, no nos es posible establecer conclusiones, ya que la variabilidad de los mismos nos lo impide. Además, el reducido número de ensayos realizados no nos permite tampoco anotar resultados definitivos, sobre todo en lo que respecta al punto C), en el cual, como es fácil comprender caben innumerables modificaciones no sólo de los reactivos sino también de los tiempos y condiciones de acción de los mismos.

Debemos, pues, en este tópico limitarnos a las siguientes conclusiones:

1) En la coloración de Gratacos el cambio de los colorantes, así como la alteración del orden de los mismos no modifica los resultados.

2) La sustitución del licor de Schweitzer por cualquiera de los reactivos mencionados y en las condiciones descritas, no permite lograr los resultados obtenidos con la técnica de Gratacos.

---

5.-Investigación de contenidos celulares.  
Tinción y tratamiento con disolventes  
de volutina, glucógeno y grasa. Comparación  
con la técnica de Gratacos.-

El conocimiento de las inclusiones en las células bacteriales tiene su origen en el trabajo de A. Meyer quien introdujo métodos de estudio microquímicos seguros.

Sabido es que, en el curso del desarrollo de las bacterias pueden encontrarse frecuentemente, en su interior, inclusiones celulares que consisten principalmente de material de reserva en solución o bien en forma de partículas. Cuando las células son jóvenes, el citoplasma generalmente se presenta homogéneo. A medida que envejecen aparecen inclusiones o vacuolas de diferente naturaleza: hidrocarbonada, grasa o nitrogenada. En algunas bacterias se encuentra también azufre y ocasionalmente carbonato de calcio.

A continuación describiremos brevemente algunas de las propiedades de dichas inclusiones y anotaremos algunas observaciones hechas en otras células con fines comparativos.

Glicógeno: es éste un material de reserva de naturaleza hidrocarbonada que se encuentra en algunas especies de levaduras, mohos y bacterias y que puede ser reconocido por el color marrón rojizo que toma cuando las células son teñidas con una gota de solución de Lugol. No es soluble en agua a 100°C, es hidrolizado por ácidos minerales.

En nuestros ensayos con bacterias teñidas con Lugol, el citoplasma aparece uniformemente teñido de color marrón rojizo. Knaysi dice que en células vegetativas en las que el glucógeno está en solución coloidal, no es fácil distinguirlo del color marrón del citoplasma.

En Oospora lactis, en cambio, esta coloración revela la presencia de numerosos gránulos de tamaño variable y de color marrón caoba, descripción que coincide con la dada por Guillermond (Tesis, 1902).

Iógeno: es también un carbohidrato, relacionado con el almidón. Su presencia en las células puede evidenciarse con iodo, que le confiere color azul.-

Nosotros lo hemos observado en células de Clostridium butyricum que acumula iógeno como material de reserva.

Grasa: es un material de reserva cuya naturaleza no está aún bien dilucidada. Está presente en todas las células bacteriales como un constituyente del protoplasma, pero en algunas especies se deposita como material de reserva en forma de pequeñas gotas esféricas, refringentes, que pueden ser teñidas con colorantes tales como Sudan III, Sudan Black B, que se disuelven en la grasa impartándole su propio color.

Las células que contienen gotas de grasa, por lo general no se tiñen uniformemente con las soluciones acuosas de colorantes protoplasmáticos, sino que presentan una apariencia alveolar.

Dado que nos fué imposible conseguir Sudan Black B y que los resultados obtenidos con Sudan III no fueron satisfactorios, adoptamos el método utilizado por Lewis (1941) que describimos en el capítulo correspondiente, y que consiste en utilizar como colorante de grasa, el precipitado formado al tratar una solución acuosa de fucsina básica con iodo. Aunque el precipitado es soluble en alcohol y puede ser empleado como solución alcohólica diluida, se obtienen mejores resultados suspendiendo las células en el agente precipitante y agregando un volumen igual de fucsina básica diluida. La acción colorante parece depender de la solubilidad lipoidal del precipitado, que tiñe los cuerpos grasos disolviéndolos y saturándolos con el colorante. Los frotis fijados y secos no son útiles para estos métodos de tinción.

Con esta técnica hemos coloreado grasa en Bacillus cereus var mycoides en el cual aparece como gotas esféricas de diferente tamaño coloreadas de rojo brillante; estos resultados son similares a los descritos por Lewis (1934).

En Oospora lactis hemos hecho también coloración de grasa, pero hemos utilizado como colorante el triclorante Guéguen (Negróni, 1938) que tiene Sudan III en su composición. En este caso, la aparición de gotas de grasa es según Guillermond (Tesis, 1902) un signo de degeneración, más visible en los medios poco nutritivos.

Nosotros hemos coloreado grasa en células provenientes de un cultivo viejo de Oospora lactis. En el interior de los oidios, se observan grandes gotas (por lo general, dos) que ocupan casi toda la célula.

Volutina: es un material de reserva nitrogenado, de naturaleza química similar a la del ácido nucleico, ampliamente distribuido en bacterias, levaduras y mohos y que ha sido también designado en la literatura como gránulos de Babes, Ernst y corpúsculos metacromáticos. Se presenta como gránulos de forma y tamaño variable y menos refringentes que los cuerpos grasos.

Tiene gran afinidad por los colorantes básicos; con soluciones viejas de azul de metileno, la volutina toma color púrpura reacción que indujo a Babes a introducir el término de corpúsculos metacromáticos para designar esa propiedad particular de tinción; de ahí el nombre de metacromatina con que también se conoce a la volutina. El nombre de volutina fué propuesto por Grimme para designar los gránulos teñibles de Spirillum volutans.

El test principal por el cual se distingue la volutina de otras inclusiones celulares fué dado por Grimme y Meyer; los gránulos se disuelven y desaparecen en agua a 80°C en 5 minutos y más perfectamente aún en agua hirviendo. No son solubles en alcohol, pero sí en soluciones de álcalis y en ácido sulfúrico al 5 %. Se tiñen con colorantes básicos pero no con los colorantes de grasa.

Tinciones intra-vitam pueden hacerse empleando soluciones acuosas muy diluidas (0.001 a 0.005 %) de rojo neutro o azul de metileno.

Volutina no se encuentra en células jóvenes en crecimiento activo, pero abunda en células maduras.

Hemos hecho ensayos de tinción de volutina en bacterias que la acumulan como substancia de reserva pero sólo en muy pocas hemos podido observar pequeños gránulos (Bacillus polymyxa)

En Oospora lactis hemos hecho también tinción vital en la siguiente forma. se hizo una suspensión de células en agua y se observó entre porta y cubre dejando deslizar una solución acuosa al 1 % de azul de metileno. Al penetrar el colorante en la célula la metacromátina precipita dentro de las vacuolas, en forma de gránulos de tamaño variable, teñidos profundamente de azul y animados con movimiento browniano.

Para establecer comparaciones con la técnica de Gratacos hemos confrontado los preparados teñidos por este método con los correspondientes a las substancias de reserva.

Morfología: morfológicamente algunos de los materiales teñidos podría presentar semejanza con los corpúsculos de Gratacos. Por ejemplo, los glóbulos de grasa de Bacillus cereus var mycoides presentan una disposición semejante, aunque en su tamaño son algo irregulares. En Oospora lactis, los gránulos de glucógeno y los glóbulos de grasa podrían también identificarse, desde el punto de vista morfológico con los gránulos pequeños y los cuerpos esféricos de mayor tamaño que aparecen en la coloración de Gratacos.

---

Tests microquímicos: con el fin de investigar el comportamiento de los corpúsculos teñidos con la técnica de Gratacos frente a los disolventes más generalmente usados en este tipo de trabajos, se hicieron ensayos de solubilidad con agua hirviendo, HONa normal, solución de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  al 0.02 - 0.5 %, solución de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 5 %, solución de HCl al 10 % y alcohol absoluto. Los frotis tratados con estas soluciones fueron coloreados con la técnica de Gratacos y comparados con frotis he-

chos simultáneamente y sin ningún tratamiento previo a la coloración. El material utilizado fué Bacillus cereus var. mycoides y Oospora lactis. (Cuadro II)

a) Solubilidad en agua hirviendo: para averiguar si los corpúsculos de Gratacos se disuelven en agua hirviendo tal como sucede con los de volutina, hicimos coloraciones de Bacillus cereus var mycoides y Oospora lactis en células jóvenes y viejas, antes y después de dicho tratamiento. Con tal fin los frotis fijados por calor se introdujeron en vasos de precipitado pequeños, con agua destilada y se los hizo hervir durante 5 y 10 minutos colorándolos luego con la técnica de Gratacos y comparándolos con los respectivos testigos.

Se comprobó que en células jóvenes y viejas de Bacillus cereus var mycoides los gránulos disminuyen de tamaño o desaparecen totalmente a los 5 o a los 10 minutos de tratamiento con agua hirviendo. En cambio en células jóvenes de Oospora lactis, persisten los gránulos, presentando un aspecto similar al que se observa con la coloración de Gratacos, es decir, gránulos grandes, esféricos y numerosos corpúsculos pequeños, de color violeta oscuro, distribuidos en todo el citoplasma.-

La coloración de Gratacos en células viejas de O. lactis no tratadas con agua hirviendo revela corpúsculos muy pequeños localizados en una parte de la célula; no se observan los gránulos esféricos, grandes, presentes en células jóvenes. Después del tratamiento con agua hirviendo, en las células viejas quedan pocos gránulos ( en los oidios 1,2 o 3) de color rojizo claro y de forma irregular.

Este test fué aplicado también a células de Schizosaccharomyces pombe en las cuales hay gránulos de metacromatina. Las células teñidas con la técnica de Gratacos presentan numerosos gránulos pequeños distribuidos en todo el citoplasma; sometiendo los frotis al tratamiento con agua hirviendo durante 10 minutos, se constató la desaparición de esos gránulos; sin embargo, la coloración de Gratacos en estas condi-

ciones revela la presencia de un gránulo de contornos difusos y generalmente excéntrico.

b) Solubilidad en  $\text{CO}_3\text{HNa}$ : se comprobó tratando los frotis fijados por calor, con solución de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  ( 0.02 -0.5%) durante dos horas a temperatura ambiente. En esta forma, se disuelven los gránulos de volutina pero no las nucleoproteínas. Aplicando en estas condiciones la técnica de Gratacos se observa que en O. lactis no desaparecen los gránulos típicos de Gratacos; en B. cereus var mycoides aparecen ligeramente más pequeños.

c) Solubilidad en  $\text{HCl}$  normal: el tiempo de tratamiento fué también de 2 horas. En B. cereus var mycoides persisten los gránulos aunque algo más pequeños; el citoplasma aparece casi incoloro.

En O. lactis han desaparecido los gránulos típicos de la coloración de Gratacos.

Según los trabajos consultados, con este tratamiento se disuelve el material nuclear.

d) Solubilidad en alcohol absoluto: luego de 12 horas de tratamiento a temperatura ambiente persisten los gránulos tanto en O. lactis como en B. cereus var mycoides, en este último algo menos nítidos.

e) Solubilidad en ácido sulfúrico al 5 % : tiempo de tratamiento , 2 horas. En B. cereus var mycoides desaparecen totalmente. En O. lactis persisten 2 o 3 gránulos de contornos borrosos. Han desaparecido todos los gránulos pequeños. La volutina es soluble en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 5 %.

f) Solubilidad en  $\text{HCl}$  al 10 %: los frotis tratados durante 24 horas revelan, en O. lactis 2 o 3 gránulos de límite difuso en el interior de los oidios. Han desaparecido los gránulos pequeños.

En B. cereus var mycoides desaparecen totalmente los corpúsculos.

Las nucleoproteínas se eliminan con este tratamiento.

Como se ve, estos tests microquímicos son algo contradictorios. Según Knaysi, los corpúsculos por él encontrados en células de Staphylococcus sp y a los cuales atribuye naturaleza nuclear, son solubles en HCl al 10 % en 24 horas y en hidróxido de sodio normal en 2 horas; pero son insolubles en agua hirviendo durante 10 minutos, en  $\text{CO}_3\text{HNa}$  al 0.02 por ciento en dos horas y en ácido nítrico al 2 % en 12 horas.

En bacterias, los corpúsculos de Gratacos no se comportan de manera análoga cuando se someten a estos <sup>tests</sup> ya que son solubles en agua hirviendo y no en hidróxido de sodio normal; sin embargo en  $\text{CO}_3\text{HNa}$  no se disuelven pero sí en HCl al 10 %

---

6.- Ensayos con disolventes de las sustancias cromatínicas. Combinación con la técnica de Gratacos. Comparación de resultados.

R.Tulasne y R.Vendrely (1948) lograron localizar, en la célula bacterial, los ácidos ribo y desoxirribonucleicos y establecieron que el primero, responsable del carácter fuertemente basófilo del citoplasma, puede ser eliminado de la célula mediante el tratamiento con ribonucleasa; el segundo, localizado en el núcleo, desaparece por acción de la desoxirribonucleasa.-

En un trabajo posterior, Miguel L. Gratacos (1947) describe el aspecto presentado por las bacterias luego de haber sido sometidas a la acción de extracto de páncreas a 40°C, durante 3 a 5 horas, según las bacterias y su resistencia, y teñidas posteriormente con soluciones colorantes comunes en bacteriología. Según sus observaciones en la célula así tratada quedan unas zonas incolores que corresponden al lugar que ocupa el corpúsculo basófilo coloreado por la técnica de Gratacos.

Para observar el comportamiento de los corpúsculos de Gratacos sometidos a la acción disolvente de ribo y desoxirribonucleasa, se prepararon preparados de B.cereus var mycoides con ambas enzimas, primero por separado y luego haciendo actuar ambas a la vez.

Las enzimas fueron gentilmente suministradas por el Dr. J. Mendives quien las preparó según los métodos de Kunitz y Northrop, sin llegar hasta la obtención de las mismas puras, cristalizadas. Para eliminar todo posible contenido de desoxirribonucleasa que pudiera contener la solución de ribonucleasa, se calentó esta última a 100°C, temperatura a la cual se destruye la primera.

Siguiendo la técnica descrita por Tulasne y Vendrely, los frotis fueron fijados en el líquido de Chabaud (alcohol 80 % 60 ml; fenol, 15 gr; formalina 5 ml; ácido acético 2 ml) du-

rante 20 minutos. Luego fueron lavados con agua y cubiertos con las soluciones respectivas conteniendo ribo y desoxiribonucleasa.

Los frotis sometidos a la acción de la ribonucleasa fueron puestos a 60°C, temperatura óptima para la actividad de la enzima. Los frotis tratados con desoxiribonucleasa fueron dejados a temperatura ambiente. Un tercer grupo de frotis fué tratado primero con ribonucleasa y luego con desoxiribonucleasa. El tiempo de acción de las enzimas fué en todos los casos de 15 minutos.

A continuación los preparados fueron lavados con agua y coloreados con la técnica de Gratacos.

Los resultados son los siguientes: Los preparados tratados con la solución de ribonucleasa no presentan ninguna diferenciación; las bacterias aparecen uniformemente teñidas de color rojizo.

En los frotis sometidos a la acción de la desoxiribonucleasa se observa la mayoría de las bacterias teñidas uniformemente sin corpúsculos; sin embargo, pueden verse células que presentan zonas incoloras por lo general centrales y que podrían corresponder a la posición de los gránulos de Gratacos.

En los frotis tratados con ambas enzimas tampoco se observa diferenciación alguna en la mayoría de las células siendo pocas las que presentan zonas incoloras y algunos pequeñísimos gránulos distribuidos en forma irregular en el citoplasma.

Las mismas observaciones han sido hechas en los preparados teñidos con la técnica de Robinow luego de tratados con las enzimas.

---

Naturalmente, que al no trabajar con enzimas puras no podemos asegurar conclusiones categóricas, ya que los mismos resultados obtenidos no son lógicos; pero es indudable

que la acción de las enzimas nombradas elimina de las células el material teñido con la técnica de Gratacos.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Gratacos vemos que, en cierto modo, nuestras observaciones hechas en frotis tratados con desoxiribonucleasa coinciden con las descritas por el citado autor.

---

C A P I T U L O V

DISCUSION

Son numerosos los trabajos que en los últimos años se han dedicado a la discusión de la existencia del núcleo en las bacterias. Mediante diferentes métodos y con ayuda de técnicas modernas, perfeccionadas por ejemplo del microscopio electrónico, numerosos autores aseguran la existencia de estructuras cuyas características morfológicas y microquímicas permiten afirmar su naturaleza nuclear.

Las observaciones de diferentes autores coinciden en los hallazgos de estructuras nucleares en el interior de las células y corresponden, en líneas generales y salvo ligeras variantes, a las descripciones hechas por Robinow con la técnica  $O_3 O_4$  - HCl - Giemsa.

Miguel L. Gratacos, mediante una técnica original y sencilla, ha demostrado en células bacteriales la presencia de corpúsculos fuertemente basófilos que se destacan en forma nítida sobre el citoplasma teñido menos profundamente.

Es indudable que en esta coloración el licor de Schweitzer, disolvente de la celulosa, desempeña un papel fundamental en la aparición del corpúsculo teñible ya que con ninguno de los reactivos utilizados en su lugar hemos podido obtener los mismos resultados; sin embargo, no compartimos los fundamentos de la teoría de Gratacos en lo que se refiere a la naturaleza celulósica de la pared de la célula bacterial.

Si analizamos esta coloración desde el punto de vista morfológico y la comparamos con métodos de tinción nuclear.

vemos que existen algunas discrepancias en cuanto a forma, tamaño y distribución de los gránulos en la célula. Así, por ejemplo, comparada con el método de Robinow se observa que en B. cereus var mycoides, en la espora no hay diferenciación con la técnica de Gratacos, mientras que la de Robinow revela un corpúsculo que se destaca por su posición y por sus propiedades tintoriales del resto de la célula. Esta discrepancia desaparece en las siguientes fases de desarrollo de la bacteria en donde ambos métodos revelan aproximadamente las mismas características, pero reaparece nuevamente en las células maduras en las cuales las estructuras en forma de "dumbbell" descritas por Robinow no son comparables a los gránulos esféricos o alargados y menos numerosos revelados por la técnica de Gratacos. Es probable que esas estructuras estén incluidas en estos gránulos y tal vez con una diferenciación adecuada pueda lograrse su revelación. En un trabajo reciente, Smith (1950) comprueba que en Bacillus megatherium las estructuras cromatínicas son más complicadas y algo difíciles de interpretar pues no están distribuidas con la regularidad vista en células de Escherichia coli y Proteus sp. En B. megatherium están distribuidas en grupos o bandas de masas granulares y la forma de los cuerpos cromatínicos varía de esférica hasta alargada, en forma de barras, encontrándose también formas intermedias similares a las estructuras "dumbbell". Smith hace la salvedad de que no se estudió en este caso el problema de la sobrefijación que parece ser, en otras células (E. coli) el responsable de la condensación y granulación de la cromatina, en cuyo caso aparecen corpúsculos regulares, esféricos, muy semejantes a los revelados por Gratacos.

La aplicación de la técnica de Gratacos a otras células nucleadas ha puesto de manifiesto otras estructuras de naturaleza no nuclear. Es este el caso de los corpúsculos presentes en Oospora lactis, Saccharomyces cerevisiae, Mycoderma vini, Schizosaccharomyces pombe, esporas en germinación de

Rhizopus nigricans y en general en los filamentos y esporas de Mucor sp, Penicillium sp y Aspergillus sp. Las comparaciones hechas en Oospora lactis con la técnica de tinción nuclear de la hematoxilina férrica presenta diferencias marcadas en la coloración de Gratacos ya que en el primer caso aparecen núcleos en número muy inferior ( 2-3 por oidio) al de los corpúsculos teñidos por Gratacos. Resultados semejantes obtuvimos con Sacharomyces cerevisiae ( un corpúsculo nuclear por célula).

Un detalle interesante surgido de la aplicación de la técnica de Gratacos a otras células nucleadas ( células epiteliales, leucocitos) es que las estructuras nucleares no solamente no son destruidas con ese tratamiento, sino que aparecen teñidas sin aparentes modificaciones que pudieran revelar una alteración de las mismas.

En cuanto a la naturaleza química de los corpúsculos de Gratacos es difícil dar una conclusión definitiva ya que con los tests de coloración y microquímicos, de muestran un comportamiento que no coincide con los atribuidos a las nucleoproteínas o a las sustancias de reserva o degeneración celular. En bacterias dichos corpúsculos son solubles en agua hirviendo, en HCl al 10 % , en  $SO_4H_2$  al 5 % y en  $NO_3H$  al 2 % e insolubles en alcohol absoluto, en HONa normal y en  $CO_3HNa$ . Sin embargo es significativo el hecho de que en los frotis de levaduras tratados con alguno de los disolventes, ( por ej. agua hirviendo) y teñido con Gratacos, persistan gránulos de contornos difusos, cuya posición y número coincide con la de los cuerpos nucleares.

Los gránulos de Gratacos son solubles también en las enzimas pancreáticas, aunque no podemos afirmar si la solubilidad es en ribonucleasa o en desoxirribonucleasa. Tampoco compartimos aquí la opinión de Gratacos al considerar esta prueba como un apoyo de la teoría de la naturaleza nuclear del corpúsculo, ya que al actuar ambas enzimas eliminan el material cromático de la célula, sea o no nuclear.

Un ensayo con las enzimas puras y por separado deberá ser hecho antes de poder responder a este punto.

## C A P I T U L O      VI

### RESUMEN Y CONCLUSIONES

Tomando como base el trabajo de Miguel L. Gratacos sobre la demostración del núcleo en las bacterias, se ha intentado aclarar el significado de la coloración por él descubierta, tratando de deducir, aunque sólo sea en parte, la naturaleza de los corpúsculos teñibles.

Con ese fin se ha estudiado en este trabajo, las posibles variaciones que pudieran presentar los diferentes tipos de bacterias sometidos a la técnica de Gratacos, así como también las semejanzas o diferencias que existen en comparación con otras células en las cuales la presencia de un núcleo no es discutida; se han observado, además, las modificaciones presentadas por el corpúsculo teñible en las distintas fases del cultivo de la bacteria y su comportamiento con las diferentes técnicas utilizadas por otros autores para la demostración del núcleo.

Por considerarlo útil se ha incluido un breve estudio de los contenidos celulares de las bacterias, el modo de diferenciarlos y las posibles combinaciones con la técnica de Gratacos.

Las conclusiones resultantes son las siguientes:

- 1) En todas las cepas de bacterias estudiadas, la técnica de Gratacos revela la presencia de un corpúsculo cuya forma, tamaño y posición son, con ligeras variantes, similares en todas las células vegetativas.

2) En Bacillus cereus var. mycoides, el corpúsculo teñido con esa técnica presenta una evolución a través del ciclo de desarrollo de la bacteria.

3) Las estructuras reveladas por la técnica de Gratacos comparadas con las evidenciadas por técnicas de tinción nuclear, presentan algunas diferencias en cuanto a forma, tamaño, posición o número.

4) En el método de Gratacos, el cambio de los colorantes o la alteración del orden de los mismos, no modifica los resultados. La sustitución del licor de Schweitzer por otros reactivos no permite lograr la coloración típica de Gratacos.

5) No ha sido posible averiguar la naturaleza química de los corpúsculos teñidos con el método de Gratacos.

6) No se descarta la naturaleza nuclear de los elementos teñidos por Gratacos, pero, por los resultados de la coloración de células de levaduras y otros hongos obtenidos con métodos de tinción nuclear y de otros contenidos intracelulares, puede afirmarse que, con el método en estudio se tiñen, además, contenidos que no son nucleares.

*Edna G. Spedalieri*

*[Signature]*

Ante la imposibilidad de obtener microfotografías satisfactorias por falta de material fotográfico adecuado, nos hemos visto obligados a reemplazarlas con esquemas.

Fig. 1

Coloración de Gratacos

Cepas de aproximadamente 12 hs. de edad

- a) Bacillus cereus var. mycoides
- b) Bacillus subtilis
- c) Lactobacillus casei
- d) Escherichia coli
- e) Oospora lactis
- f) Mycoderma vini

Ante la importancia de los estudios de morfología celular en el conocimiento de la fisiología de las plantas, se han realizado en el presente trabajo una serie de investigaciones sobre el comportamiento de las células vegetales durante el proceso de la división celular.

Fig. 1

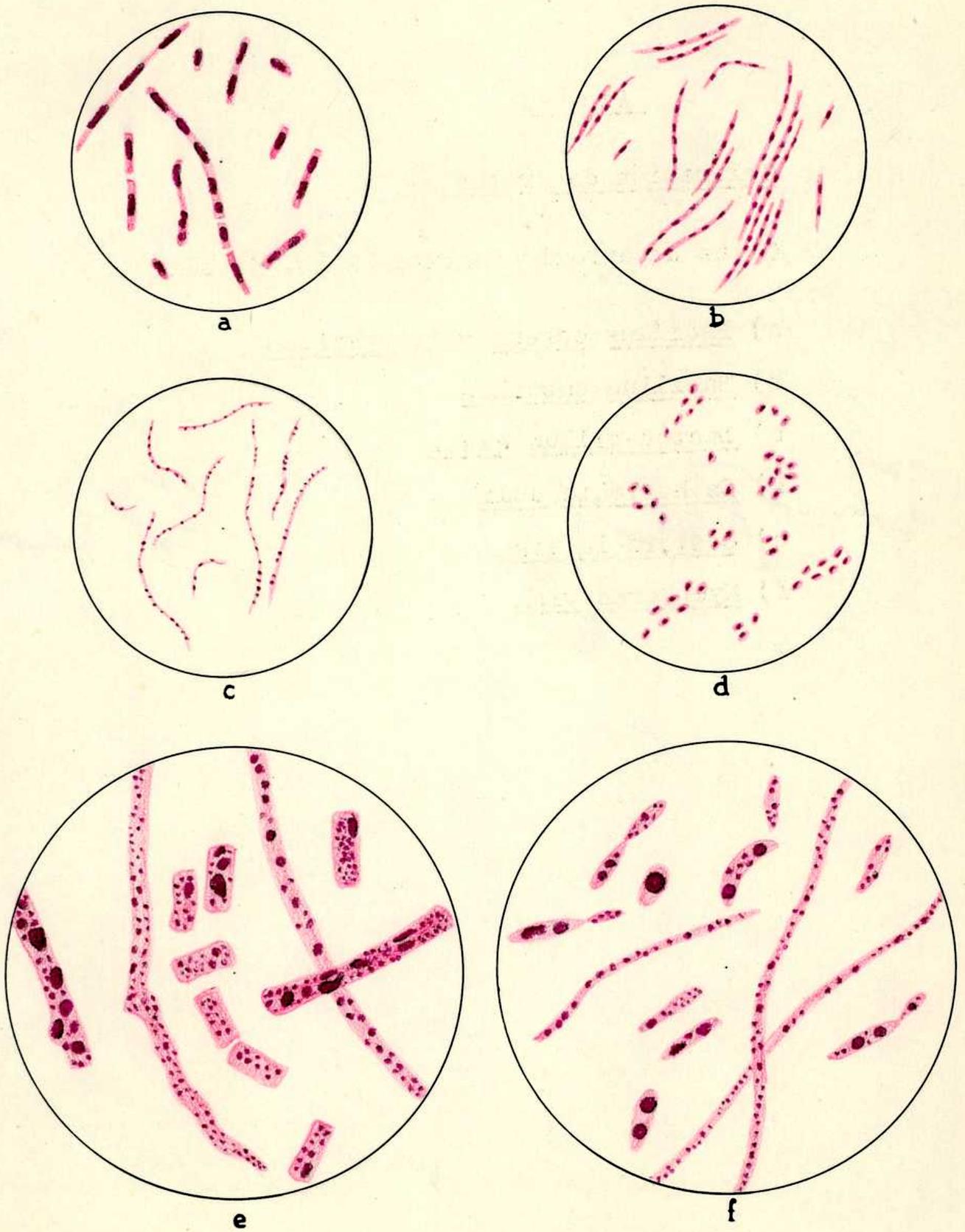


Fig. 2

Evolución del corpúsculo intracelular  
en distintos estados del desarrollo de  
B.cereus var. mycoiðes

A. Método de Gratacos

- a) Esporas(cultivo viejo)
- b) 5 minutos de incubación
- c) 30 minutos de incubación
- d) 60 minutos de incubación
- e) 90 minutos de incubación.
- f) 12 horas de incubación.

B.Método de Robinow

- a) Esporas(cultivo viejo)
- b) 60 minutos de incubación
- c) 12 horas de incubación.

Fig. 2

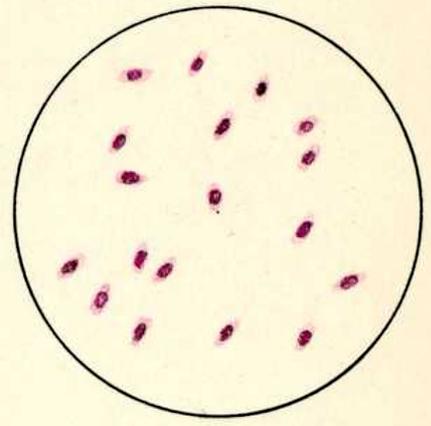
A



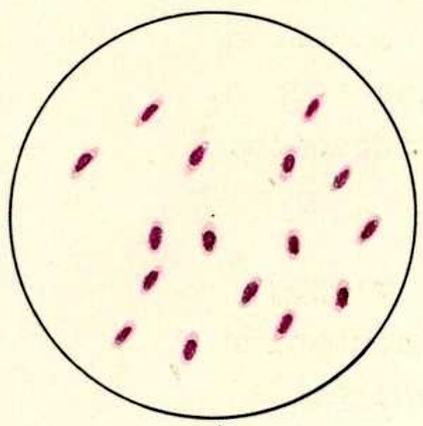
a



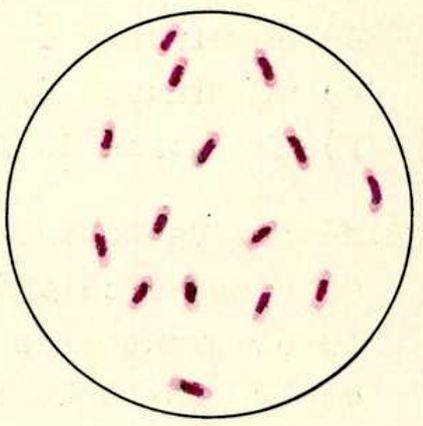
b



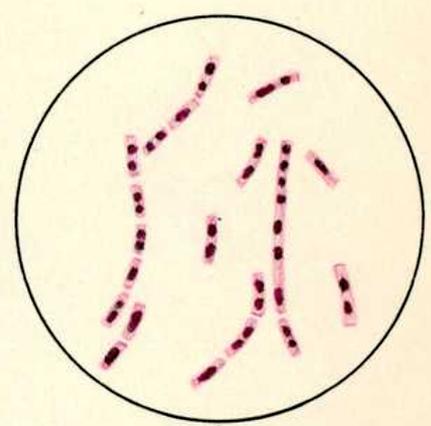
c



d

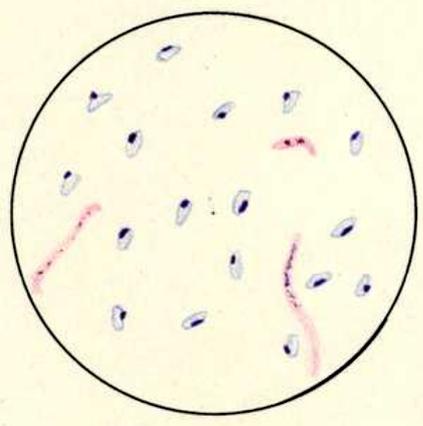


e

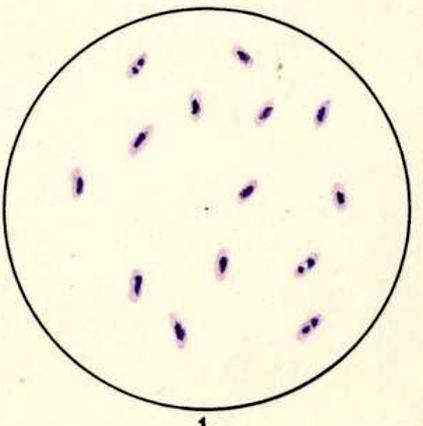


f

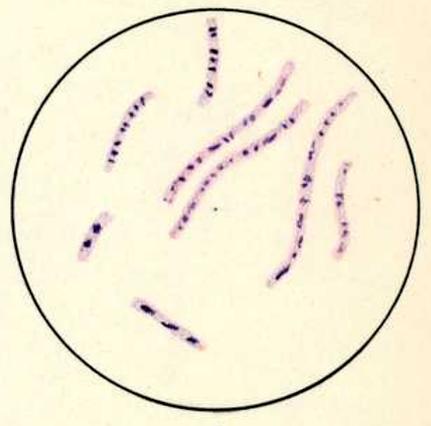
B



a



b



c

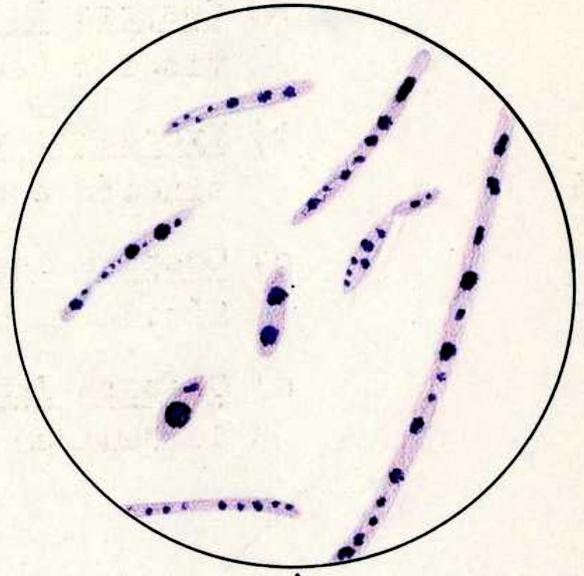
Fig. 3

- a) Oospora lactis Método de Gratacos;  
tinción con Giemsa
- b) Mycoderma vini Método de Gratacos;  
tinción con solución Giemsa
- c) Oospora lactis. Tinción nuclear  
Método de Hematoxilina de Heidenheim
- d) Oospora lactis Tinción nuclear. Método  
de Feulgen

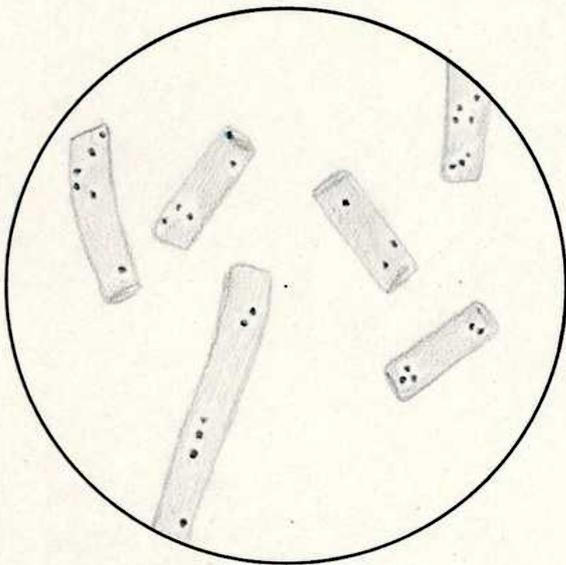
Fig. 3



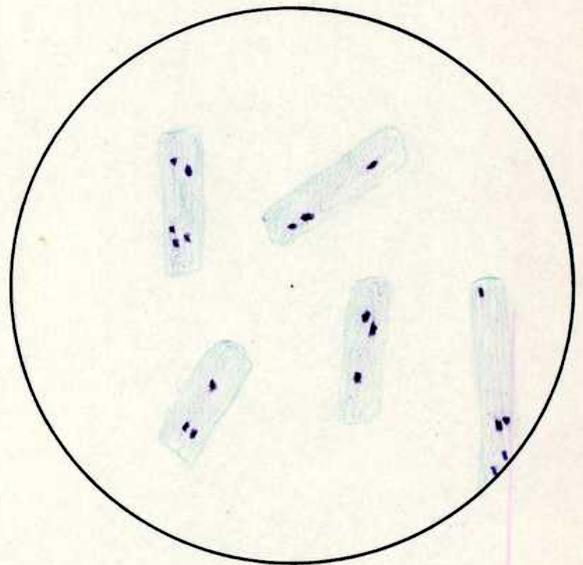
a



b



c



d

Cuadros comparativos de las características de los corpúsculos teñidos por distintos métodos en Bacillus cereus var. mycoides y en Oospora lactis.

## A

<u>Bacillus</u>	Características	Métodos de tinción			
		Gratacos	Robinow	Feulgen	Hematoxilina férrica(1)
<u>Cereus</u>	Coloración diferencial	+	+	+	?
var.	Forma	esférica o alargada en el sentido del eje mayor de la bacteria.	estructura transversales al eje mayor de la bacteria (dumbbell)	esférica.	?
<u>mycoides</u>	Tamaño	$\frac{1}{4}$ a $2/4$ de la célula (áreas)	$1/5$ de la célula (cada estructura, áreas)	$\frac{1}{4}$ de la célula (áreas)	?
(12 horas incubación a 37° C)	Número	Un corpúsculo por célula	Dos corpúsculos por célula	Un corpúsculo por célula	?
	Posición	Central	central simétrica	central	?

(1) Con esta técnica, en bacterias no se obtuvieron coloraciones satisfactorias.

**B**

	Caracterís- -ticas	Métodos de tinción			
		Gratacos	Robinow	Feulgen	Hematoxili- na férrica
<u>Oospora</u>	Coloración Diferencial	+	+	+	+
<u>lactis</u>	Forma	esférica u oval	esférica, de contornos borrosos	irregular, ligeram- te alarga- da	esférica
oidios (12 hs de inc. a 37°C)	Tamaño (2)	muy variable (dentro de la misma célula (2))	aprox. 1.5 μ - 2 μ de diámetro	aprox. 1.5 μ - 3 μ de diámetro	aprox. 1 μ de diáme- tro.
	Número	muy nu- merosos	general- mente dos	uno o dos por oidio	uno, dos o tres por oidio
	Posición	distribuidos en toda la célula	por lo ge- neral subtermina- les	por lo general subter- minales	por lo ge- neral sub- terminales

(2) El tamaño de los oidios oscila entre 7 μ x 5 μ ; y 15 μ x 5 μ

II

Cuadro comparativo de la solubilidad de los corpúsculos de Gratacos y nucleares

Solubilidad en:	Corpúsculos de Gratacos		Corpúsculos nucleares
	<u>B.cereus</u> var. <u>mycoides</u>	<u>Oospora</u> <u>lactis</u>	
H <sub>2</sub> O a 100°C	+	-	-
CO <sub>3</sub> HNa (0.02 -0.5%)	Disminuyen de tamaño	-	-
HCl (10%)	+	Persisten 2 o 3 gránulos	+
HONa /N	-	+	+

+:Soluble

--:Insoluble

B I B L I O G R A F I A

- Bisset, K.A. 1948 Nuclear fusion and reorganization in a Lactobacillus and a Streptococcus.- J. Gen.Micr., 2: 248-251.
- Bisset, K.A. 1948C Observations upon the bacterial nucleus.- J.Hyg. , 46: 264-266.
- Boivin, A. et Vendrely, R. 1943 Les nucléoprotéides, constituants des cellules bactériennes.-C.R.Soc. Biol., 137:432
- Burdon, K.L. 1946 Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried fixed slide preparations.-J.Bact., 52: 665-678.
- Burdon K.L., Stokes, J.C. and Kimbrough, C.E. 1942 Studies of the common aerobic spore-forming bacilli. I Staining for fat with Sudan Black B-Safranin.- J.Bact., 43: 717-724.
- Cassel, W.A. 1950 The use of perchloric acid in bacterial cytology.-J.Bact., 59: 185-187.
- Chi-Chen, Yu. 1936 Sur une nouvelle technique, analogue à la réaction de Feulgen et son application à l'étude de l'évolution des éléments nucléolaires et des satellites. Compt. R. Acad. des Sci., 202: 1083-1085.
- Conn H.J. and Darrow, M.A. 1943 Staining procedures used by the biological Stain Commission. Biotech.

Publ. Genève.

- Da Cunha, A.M. et Muñiz, J. 1929. Reaction nucleaire de Feulgen chez les spirochètes et les bacteries.-C.R.Soc.Biol., 100:951.
- Dubos, R.J. 1946. The bacterial cell.-Harvard University Press Cambridge, Mass.
- Dyar, M.T. 1947. Isolation and cytological study of a free-living spirochete. J.Bact., 54:483-492.
- Eisenstark, A., Mc Mahon, K.J. and Eisenstark, R. 1950. A cytological study of a pleomorphic strain of Azotobacter with the electron and phase microscopes and the Robinow nuclear staining technique.- J. Bact., 59:75-81
- Flewett, T.H. 1948. Nuclear changes in Bacillus anthracis and their relation to variants. J.Gen. Microbiol. 2: 325-333.
- Gratacos, M.L. 1942. Técnica para la demostración del núcleo en las bacterias.-Rev.Inst. Bact.Nac., 21: 251
- Gratacos, M.L. 1947. Acción de la nucleasa en las bacterias. Trabajo inédito, presentado a la Academia Nacional de Medicina para optar al premio " A.Bachmann" .
- Guillermond, A. 1902. Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures.-Thèse Doct. Ès Sciences Sorbonne, 289 p Storck edit. Lyon.
- Guillermond, A. 1904, a. Sur le noyau de la levure. Ann.Myc. 2: 184-189.
- Guillermond, A. 1941. The cytoplasm of the plant cell. Waltham, Mass. U.S.A.

- Guillermond, A., Mangenot, A. et Plantefold L. 1933, Traité de cytologie végétale Masson et Cie. Paris.
- Henrici, A.T. 1941. The yeasts; genetics, cytology, variation, classification and identification.-Bact. Rev. 5:97
- Hillier, J., Knaysi G. and Baker R.F. 1948. New preparation techniques for the electron microscopy of bacteria. J.Bact., 56: 569-576.
- Hillier, J., Mudd S. and Smith, A.G. 1949. Internal structure and nuclei in cells of E.coli as shown by improved electron microscopic techniques. J.Bact., 57: 319-330.
- Hollande, A. Ch. 1934. Contribution à l'étude cytologique des microbes (Coccus, Bacillus, Vibrio, Spirillum, Spirochaeta). Arch. Protistenk., 83 465-608.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc Graw Hill Book Co., Inc., New York.
- Klieneberger-Nobel, E. 1945. Changes in the nuclear structure of bacteria. particularly in spore formation.-J.Hyg. Camb. 44: 99-108.
- Klieneberger-Nobel, E. 1947. A cytological study of Mixococci J.Gen. Microbiol., 1: 22-37
- Klieneberger-Nobel, E. 1947. Morphological appearances of various stages in B.proteus and coli. J.Hyg. 45: 410-412 .
- Knaysi, G. 1938. Cytology of bacteria.-Bot. Rev., 4:83-112.
- Knaysi, G. 1942. The demonstration of a nucleus in the cell of a Staphylococcus.- J.Bact. 43:365-385.
- Knaysi G. 1943. A cytological and microchemical study of Thiobacillus thiooxidans .- J.Bact., 46: 451-461.

- Knaysi, G. 1944 . Elements of bacterial cytology.-Ithaca, N. Y., Comstock Pub. Co., (Cornell Univ.)
- Knaysi, G. 1945 , Investigation of the existence and nature of reserve material in the endospore of a strain of B.mycoides by an indirect method J.Bact., 49: 617-622.
- Knaysi G. 1945 , On the origin and fate of the fatty inclusions in a strain of Bacillus cereus.- Science, 102: 424.
- Knaysi, G. 1946 . Further observations on the nuclear material of the bacterial cell.-J.Bact., 51: 177-180
- Knaysi G. 1948 a. Preliminary observations on germination of the spores of Bacillus mycoides in a nitrogen-free medium and certain properties of the transparent cells. J.Bact., 55:753-757
- Knaysi G. 1948 b. The endospore of bacteria. -Bact. Revs. 12: 19-77
- Knaysi G and Baker R.F.- 1947. Demonstration with the electron microscope, of a nucleus in Bacillus mycoides grown in a nitrogen-free medium.- J. Bact. 53:539-553.
- Knaysi G, and Mudd, S. 1943, The internal structure of certain bacteria as revealed by the electron microscope; a contribution to the study of the bacterial nucleus.-J.Bact., 45:349-359
- Lewis I.M. 1934 . Cell inclusions and endospore formation in B mycoides. J.Bact. 28:133-144.
- Lewis, I.M. 1937. Cell inclusions and life cycle of Azotobacter. J.Bact., 34: 191.
- Lewis, I.M. 1940, The genus Spirillum E.H.B.G with special reference to cell inclusion and the chromidial theory. J.Bact., 40: 271-285.

- Lewis I.M. 1941. The cytology of bacteria.-Bact. Rev.5: 181-230
- Lewis, I.M. 1942. The cytology of bacteria. Chronica Botanica, 7:2 49- 250.
- Lindgren, C.C. 1935. Genetical studies of bacteria. I. The problem of the bacterial nucleus. Zentr. Bakt. Parasitenk., abt. II, 92: 40-47
- Mc Clung, C.E. 1937. Microscopical technique. 2d.ed.P.B. Hoeber, Inc., New York
- Mc Clung, M.M. 1950. Morphological studies in the genus Nocardia II. Cytological studies. J.Bact.,59: 589-602.
- Mudd S. and Smith A.G. 1950. Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei.I. Adaptation of cytological processing to electron microscopy; bacterial nuclei as vesicular structure. J.Bact.,59:561-573
- Mugaburu, J.C. 1945. El núcleo en las Eubacteriales.-Rev.Pae. Cs.Químicas.Univ. Nac. La Plata, 20:107-204.
- Negróni, P. 1938. Morfología y Biología de los Hongos.-Ed. El Ateneo. Buenos Aires.
- Pickarski G.1937. Cytologische untersuchungen an paratyphus-und coli-bacterien. Arch. f.Mikrob. 8:428-439.
- Robinow C.F. 1942. A study of the nuclear apparatus of bacteria. Proc. Roy. Society London, B, 130: 299-324
- Robinow C.F. 1944. Cytological observations on Bact. coli, Proteus vulgaris and various aerobic spore-forming bacteria with special reference to the nuclear structures. J.Hyg.,43: 413-423.

NOTES

- Robinow, C.F. 1946. Nuclear apparatus and cell structure of rod-shaped bacteria. Addendum to R.J. Dubos. The bacterial cell. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Stille, B. 1937. Zytologische untersuchungen an bacterien mit hilfe der feulgenschen nuclealreaktion-Arch.f. Mikr., 8: 125-148.
- Smith, A.G. 1950.- Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei. II. An improved staining technique for the nuclear chromatin of bacterial cells. J. Bact., 59:575-587.
- Tulasne, R. 1947. Sur la mise en évidence du noyau des cellules bactériennes. C.R. Soc. Biol., 141: 411-413
- Tulasne R. et Vendrely R. 1947. Mise en évidence des noyaux bactériens par la ribonuclease.-Compt. Rend. Soc. Biol., 141:674-676.
- Tulasne, R. and Vendrely R. 1947, h Demonstration of bacterial nuclei with ribonuclease. Nature, 160: 225-226
- Tulasne, R. and Vendrely, R. 1948. Cytology of staphylococci before and after treatment with penicillin. Nature, 161: 316-317.
- Vendrely, R et Lipardy, J. 1946. Acides nucléiques et noyaux bactériens. C.R. Acad. des Sc. 223:342-344.