

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

---

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

Estudio de la Acción de un  
Lisado Filtrado de Salmonellas y  
Bacilo Coli.

TESIS

Para obtener el Título de  
Químico Farmacéutico Biólogo

ROSA MARIA NAVA BOLAÑOS

1960



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A MIS PADRES:**

Con inmenso cariño, porque con esfuerzo y comprensión, supieron estimularme en la culminación de mis aspiraciones.

**A MIS HERMANOS Y TIOS:**

Con todo el cariño que les profeso y como testimonio del deber cumplido, cuando se complementan la aspiración y el esfuerzo.

Al Director de la  
**Facultad de Química Berzelius**  
**Dn. LUIS M. VEREA.**  
con eterna gratitud.

**A MIS MAESTROS:**

Con admiración y respeto por su  
noble misión profesional.

**Al Ing. JOSE LUIS ESTEBANEZ y**  
a los **LABORATORIOS GUTFOL, S. A.**  
por la ayuda que me prestaron en la  
elaboración de la presente.

**A MIS COMPAÑEROS, FAMILIARES Y  
AMIGOS, QUE ME ALENTARON CON  
DESINTERESADO CARINO.**

## INDICE

I.—INTRODUCCION.

II.—GENERALIDADES.

III.—a).—MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.

b).—METODOS DE DETERMINACION Y DESARROLLO.

IV.—RESULTADOS.

V.—BIBLIOGRAFIA.

I

**INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

El objeto de este estudio es comprobar el efecto causado por un lisado filtrado de bacilos entéricos sobre los mismos microorganismos utilizados en su producción y asimismo observar la posible inhibición del crecimiento IN VITRO al poner las cepas en contacto con el filtrado.

Se ha utilizado para ello un testigo de características distintas para poder comparar los resultados.

Unicamente se ha desarrollado una parte del estudio trabajando sólo con medios de cultivo, es decir "IN VITRO", ya que no se utilizaron animales para hacer el estudio "IN VI-VO".



**II**

**GENERALIDADES**

## GENERALIDADES

El lisado utilizado para el estudio se obtiene del cultivo de una mezcla de *Escherichia coli* Var, *communior*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella paratyphi* "A" y *Salmonella paratyphi* "B".

El procedimiento para obtener el lisado filtrado es el siguiente

a) Se siembra en caldo nutritivo una mezcla de los bacilos usados.

b) Incubándose a 37°C siendo ésta la temperatura óptima para su desarrollo, permaneciendo así el tiempo necesario para que el cultivo alcance su máximo crecimiento; llevándose un control del número de gérmenes por medio de un nefelómetro y trazando su gráfica correspondiente.

c) Una vez alcanzado su desarrollo máximo, se lleva a una temperatura de 70°C durante una hora, enfriando rápidamente, y repitiendo esta operación cada 24 horas durante 5 días consecutivos; el objeto de este proceso es matar a los gérmenes y así efectuar la lisis de éstos liberando así las endotoxinas.

d) Una vez realizado el paso anterior, se procede a la filtración, que se efectúa con un Gooch utilizando vacío y una atmósfera estéril, filtrando inmediatamente por bujía para esterilizar el lisado y evitar nueva contaminación.

e) Este filtrado se debe conservar a una temperatura que fluctúa entre 2° y 10°C.

Generalidades de los microorganismos que entran en la producción del lisado filtrado.

La **Escherichia coli** denominada también **bacilo coli**, **colibacilo** o **Bacterium coli commune**; pertenece a la familia de las **Enterobacteriáceas**, al género **Escherichia** y a la especie **Escherichia coli**.

En estado normal se encuentra formando parte de la flora intestinal en su variedad no patógena; siendo la variedad patógena el agente que origina los estados patológicos en los individuos parasitados.

Estos bacilos son cortos, generalmente de 2 a 3 micras gram negativos, ciertas etapas pueden ser móviles presentando flagelos en todo su contorno, pueden encontrarse solos o agrupados en pares o en cadenas; crecen en los medios usuales con gran facilidad, siendo su temperatura óptima 37°C, pero pueden cultivarse también a 45°C. Poseen endotoxinas, exotoxinas y hemolisina. (1), (5).

La **Salmonella typhosa** llamada también **Bacilo de Eberth** **Eberthella typhosa** o **bacilo de la tifoidea**, pertenece a la familia de las **Enterobacteriáceas**, al género **Salmonella** y a la especie **Salmonella typhosa**. (1).

Es el causante de la tifoidea, encontrándose en los individuos parasitados, en el intestino, hígado y sangre.

La **Salmonella paratyphi "A"**, conocida como bacilo paratífico "A", pertenece a la familia de las Enterobacteriáceas, al género **Salmonella** y a la especie **Salmonella paratyphi "A"**.

Es el agente de la paratifoidea, alojándose en forma similar a los tíficos (1).

La **Salmonella paratyphi "B"**, denominada también bacilo paratífico "B", pertenece a la familia de las Enterobacteriáceas, al género **Salmonella** y a la especie **Salmonella paratyphi "B"** (1).

Produce también paratifoidea y se aloja en el mismo sitio que los anteriores.

Las **Salmonellas** son bacilos cortos, gruesos de 0.4 a 0.6 micras de ancho por 1 a 3 micras de largo y en cultivos viejos se pueden ver filamentosos y cortos, son peritricos y muy móviles, desplazándose con movimientos de translación, son esporulados y no tienen cápsula y sólo algunas colonias Lisas (S) pueden presentarla.

Se tiñen fácilmente con los colorantes de anilina, son Gram negativos. Todos ellos cultivan fácilmente en medios simples con pH de 6.8 a 7.8 y a temperatura de 20°C a 40°C, siendo la óptima de 37°C.

Excepto la **Salmonella typhosa**, las otras **Salmonellas** producen de manera característica ácido y gas con la glucosa y maltosa, pero no fermentan la lactosa ni la sacarosa.

Las formas Rugosas (R) de la **Salmonella paratyphi "B"** desarrollaron grandes colonias mucoides cuando se incuban a 37°C diciéndose entonces que las colonias son Mucoides o M. (5).

**III**

**(a)**

**MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS**

## MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Los medios de cultivo empleados en la realización del estudio fueron:

### CALDO NUTRITIVO.

- 10 g. de Peptona.
- 5 g. de Cloruro de sodio.
- 3 g. de Extracto de Carne. (Bovril).
- 2.5 g. de Glucosa anhidra.

Agua c.b.p. 1000 ml.

Se ajusta el caldo a un pH comprendido entre 7 y 8.

- a.—Se calienta a ebullición para disolver los componentes.
- b.—Y se hierve durante 15 minutos.
- c.—Determinándose la reacción y se ajusta si es necesario con sosa Normal.
- d.—Hirviéndose por 15 minutos para precipitar los fosfatos.
- e.—Una vez tibio se filtra por algodón y papel filtro.
- f.—Poniéndose en tubos (10 ml. en cada uno) y se esteriliza en autoclave a 15 libras durante 20 minutos. (2).

### GELOSA NUTRITIVA. (Agar Nutritivo).

- 5 g. de Extracto de Carne (Bovril).
- 10 g. de Peptona.
- 5 g. de Cloruro de sodio.
- 10 g. de Agar.

Agua c.b.p. 1000 ml. Ajustando el pH entre 7 y 8.

El agar nutritivo o musgo de Ceylán es una sustancia de origen vegetal, extraída de ciertas algas marinas; es un coloide reversible, no tiene ninguna propiedad nutritiva para las bacterias, utilizándose sólo para solidificar los medios de cultivo; Funde hacia los 93°C y solidifica a más o menos los 40°C.

a.—En un litro de agua destilada, se ponen los ingredientes, que se pasan a un matraz de bola.

b.—Se tapa éste con algodón y se lleva al autoclave a 15 libras por 15 minutos, para disolver bien los ingredientes especialmente la gelosa.

c.—Se ajusta el pH del medio añadiendo la sosa Normal requerida, llevándose a ebullición el medio por 10 minutos, reponiendo luego el agua perdida por la evaporación, con agua destilada caliente.

d.—El medio se filtra a través de algodón y se distribuye en tubos de ensaye.

e.—Se esteriliza en autoclave a 15 libras por 20 minutos (2).

### AGAR CON ZUMO DE JITOMATE.

Este medio se emplea para sembrar colonias de **Lactobacilos**, y consta de los siguientes ingredientes:

400 ml. de zumo de jitomate.  
400 ml. de leche.  
2.5 g. de glucosa.  
11 g. de agar.  
600 ml. de agua destilada.

a.—El zumo de jitomate de tomates en conserva. Se vierte el contenido de una lata en un embudo grande con papel filtro grueso. Usándose sólo el filtrado de color amarillo transparente. Se calienta la mezcla de jugo de jitomate, la leche y la glucosa para que se disuelva ésta.

b.—Se agrega el agar al agua y se pone en el autoclave para disolverlo.

c.—Se ajusta la reacción de la mezcla del zumo de jitomate a 6.8 antes de añadir el agar. Se filtra por papel; y el pH definitivo después de esterilizar debe ser aproximadamente de 6.2.

d.—Se juntan ambas mezclas cuando todavía están calientes, filtrándose después por algodón. Distribuyéndose en tubos y esterilizándose en autoclave a 121°C (15 libras) durante 8 minutos. Sacándose del autoclave lo más pronto posible (2).



**III**

**(b)**

**METODOS DE DETERMINACION Y DESARROLLO**

## MÉTODOS DE DETERMINACION Y DESARROLLO

### TÉCNICA PARA OBTENER UNA GRAFICA MICROBIANA EN FOTOCOLORIMETRO.

Para llevarla a cabo se efectúan los siguientes pasos:

a).—A cultivos líquidos que contengan una mezcla de los bacilos en estudio, se ponen a Baño María a temperatura de 60 a 65°C durante una hora, con objeto de inactivar los bacilos.

b).—Estos tubos se centrifugan sacándose a continuación el líquido sobrenadante que corresponde al medio de cultivo; y el sedimento que está formado por las bacterias en estudio se lava con suero fisiológico hasta que no queden trazas del medio.

c).—Una vez lavados los bacilos se transfieren a un matraz de 10 ml., aforándose con suero fisiológico hasta la marca del matraz.

d).—Al fotocolorimetro (Hellige Clinical modelo 900 B) se le adapta el filtro de 660 m $\mu$  y se ajusta a 100% de transmitancia con suero fisiológico; a continuación se toma la lectura correspondiente a los bacilos emulsionados en los 10 ml.

de suero fisiológico, anotándose esta lectura que se toma como la máxima turbidez.

e).—De la emulsión anterior se hacen diluciones al doble, sacando la mitad de su volumen y completando con suero fisiológico para que quede la cantidad original; leyéndose cada una en el fotocolorímetro y anotándose su correspondiente lectura.

f).—Se toma de la dilución menor una gota con la que se llena la cámara cuenta glóbulos; observándose al microscopio y contando los bacilos que se encuentren en la cuadrícula correspondiente para la cuenta de glóbulos rojos; efectuándose ésta en cinco cuadrillos.

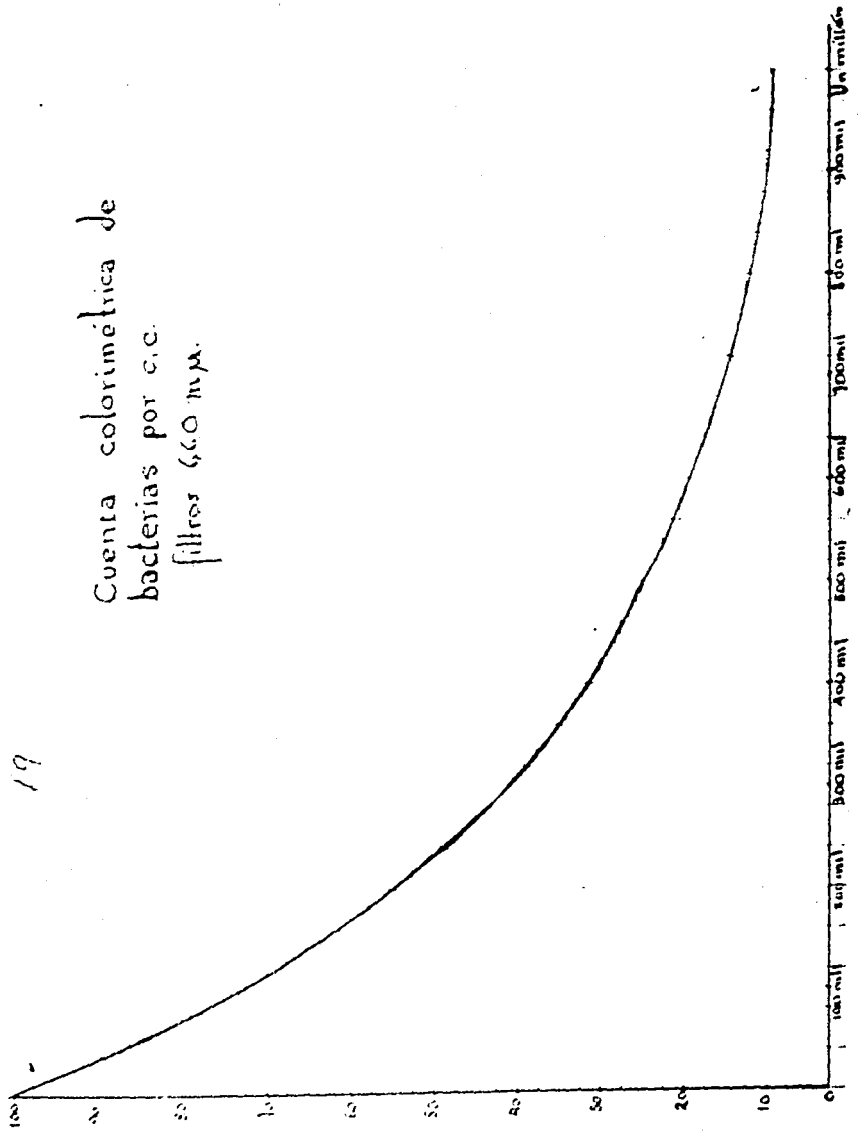
g).—Una vez efectuado el cuanteco de bacilos, se hace el siguiente cálculo: se multiplica la cantidad de bacilos obtenida por 0.000 25, que corresponde al volumen de los cinco cuadros contados, luego se multiplica por 4 000, cantidad que corresponde al volumen que hay en un  $\text{mm}^3$ , y a su vez se multiplica por la dilución de la muestra con la que se hizo la cuenta; y a partir de este valor se sacan los valores correspondientes a las subsiguientes diluciones.

h).—Se traza una gráfica trazando en el eje de las abscisas la lectura correspondiente a la transmitancia del fotocolorímetro y en el eje de las ordenadas se marca la cantidad de bacilos que se encontraron en cada una de las diluciones. El número de bacilos encontrados en la dilución mínima se va duplicando para obtener así el número de las siguientes diluciones.

El fotocolorímetro debe tener el filtro correspondiente a 660  $\text{m}\mu$ , por ser el máximo y el más conveniente para la determinación, que es nefelométrica.

19

Cuenta colorimétrica de  
bacterias por c.c.  
filtrar 6.0 m.m.



La gráfica nos revela el resultado de la determinación anterior.

### CONTROL BACTERIANO DEL LISADO FILTRADO

Este control se efectúa sembrando las cepas en estudio en caldo nutritivo (método ya indicado); y se saca cada 24 horas una muestra que se deposita en la celdilla del fotocolorímetro, se toma la lectura viendo en la gráfica el número de bacterias correspondiente, obteniéndose en esta forma la curva de crecimiento de los mismos.

Es de importancia para esta determinación tomar el pH del cultivo, ya que los gérmenes que lo integran son susceptibles a tales cambios.

### PROCEDIMIENTO DE LOS DISCOS DE PAPEL.

a).—Para la ejecución de este método se preparan discos de papel filtro Whatman núm. 2, cortándolos en círculos con un diámetro de 10 a 12 mm.; los que se esterilizan en una caja Petri a calor seco.

b).—Por otra parte se siembra en una caja Petri que contenga gelosa; en el caso de que los bacilos en estudio se encuentren en medio sólido, se utiliza gelosa solidificada y se siembra por estria.

En cambio, si los gérmenes se encuentran en medio líquido, se toman partes alícuotas de éste y siembran en gelosa sin solidificar, logrando así emulsiones de los bacilos con el medio que posteriormente solidifica.

c).—Con unas pinzas flameadas con alcohol, se introdu

cen varios discos de papel dentro de pequeños tubos estériles que contengan el lisado o bien diluciones en éste con caldo nutritivo, utilizándose también un tubo testigo con caldo solo.

d).—Por medio de pinzas estériles se sacan los discos de papel ya mojados, depositándose éstos con cuidado sobre las placas de agar recientemente sembradas.

e).—Dispuestas las cajas Petri como ya se indicó, se incuban a 37°C al cabo de 24 a 48 horas, observándose las placas para ver si ha habido inhibición de las colonias que se encuentran alrededor de los discos de papel (2).

#### PROCEDIMIENTO DE LAS COPAS DE OXFORD.

a).—Para su realización se siembra en caldo simple cada uno de los microorganismos por estudiar.

b).—Se licúan tubos que contengan gelosa nutritiva vaciándose el contenido de cada uno en una caja Petri y antes de que solidifique el medio se siembran las cajas con el medio de cultivo ya indicado, usando para ello pipetas de 1 ml. y poniendo en cada una 1 ml. del cultivo que contenga los gérmenes, emulsionándolos bien con la gelosa.

c).—Una vez sembradas las cajas se procede a poner en cada una, tres a cuatro cilindros de Oxford que se calientan un poco en su base, colocándose por medio de unas pinzas flameadas sobre la superficie de la placa, procurando que no queden muy hundidos en el medio, pero sí lo suficiente para que no se derrame el líquido en el periodo de incubación.

d).—Ya puestos los cilindros en el medio sembrado, se procede a llenarlos con el lisado filtrado por medio de pipetas capilares; poniendo en cada caja lisado de diferente dilución.

e).—Dispuestas las cajas Petri como ya se indicó, se incuban a 37°C durante 24 a 48 horas, después de las cuales se observan los resultados obtenidos. El halo de inhibición debe estar en relación directa con la dilución del lisado (2).

#### PREPARACION DE UN ANTIGENO PARA PRUEBAS DE AGLUTINACION.

a).—Para su obtención se parte de un cultivo de *E. coli*, *S. typhosa*, *S. paratyphi "A"*, y *S. paratyphi "B"*; este medio de cultivo se calienta durante una hora a baño maría a la temperatura de 60 a 65°C para matar los microorganismos.

b).—Una vez muertos los bacilos se centrifugan los tubos de cultivo, extrayendo por medio de pipetas capilares el caldo, e introduciendo en ellos unas cuentas de vidrio para homogeneizar el sedimento, que se lavará con suero fisiológico hasta que no quede rastro del medio de cultivo; lográndose ésto por medio de agitación con las perlas de vidrio y adición de suero fisiológico; seguida de centrifugación y extracción del líquido sobrenadante. Repitiéndose esta operación cuantas veces sea necesaria.

c).—Habiéndose logrado el paso anterior se hace una dilución con suero fisiológico hasta que la turbidez del líquido se aproxime a la cantidad de bacterias requerida (3000 millones por ml.), utilizando para ésto la gráfica microbiana anteriormente descrita.

d).—Para conservar este antígeno se le agrega una solución de Merthiolate; poniendo 10 ml. de solución (1:1000) por 90 ml. de suspensión bacteriana, dando así, una concentración final de 1:10,000 del conservador antes indicado. (2).

## PRUEBAS DE AGLUTINACION MACROSCOPICA.

a).—Para su realización se disponen de 10 pequeños tubos de ensayo dispuestos en una gradilla.

b).—Se pone 0.5 ml. de solución salina fisiológica partiendo del segundo tubo.

c).—Se agrega 1 ml. del lisado filtrado en el primer tubo. sacándose de este 0.5 ml. que se pasan al segundo tubo, se agitan y se sacan de éste 0.5 ml. que se ponen en el tercer tubo y así sucesivamente hasta llegar al tubo número nueve del cual se descartan los 0.5 ml. que le correspondían al tubo 10; debido a que este tubo lleva los 0.5 ml. de suero fisiológico.

d).—A cada tubo se le añade 0.5 ml. del antígeno bien agitado, mezclándose con el resto del líquido.

e).—Estos tubos se meten a baño maría a 52°C durante 15 a 20 horas, observando después los resultados obtenidos (2).

## METODO POR INHIBICION DE CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO.

a).—Este se efectúa haciendo una siembra inicial en caldo nutritivo; realizándose con cada bacteria por separado e incubándose el medio durante 24 horas a 37°C.

b).—Se disponen pequeños tubos de ensayo; en el primero de los cuales se ponen 5 ml.; en el segundo 2.5 ml.; en el tercero 1.25 ml.; y en el cuarto 0.625 ml. de lisado filtrado. Completando el volumen de los tubos a 5 ml. con caldo nutritivo; y poniendo en el último de ellos únicamente caldo.



**IV**  
**RESULTADOS**

## RESULTADOS

### CONTROL BACTERIANO DEL LISADO FILTRADO

Al efectuar la prueba para determinar la curva de crecimiento se obtuvieron como promedio los datos que a continuación se señalan:

Días	pH	Lectura del Foto-colorímetro	Núm. de Bacterias por mm <sup>3</sup>
1	7	78	75 mil
2	7	75	90 mil
3	7.5	40	280 mil
4	7.5	35	325 mil
5	8	23	460 mil
6	8	14	690 mil
7	8.5	10	950 mil

Observándose que el crecimiento bacteriano en los primeros días es lento, pero después aumenta hasta alcanzar su máximo desarrollo.

## METODO DE LOS DISCOS DE PAPEL.

En las pruebas efectuadas por este procedimiento hubo inhibición mínima del crecimiento bacteriano alrededor de los discos. Esta inhibición se efectúa en el periodo comprendido entre 24 y 48 horas después de sembradas las cajas Petri con *E. coli*, *S. typhosa*, *S. paratyphi "A"*, *S. paratyphi "B"*, y una mezcla con todos ellos; y usando como testigo otra mezcla de lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus* de Moro y *Lactobacillus bulgaricus* de Grigireff).

El halo de inhibición está comprendido entre cero y 3 mm: dependiendo este halo de la dilución del filtrado.

La siguiente tabla muestra un promedio de la zona de inhibición del lisado filtrado.

Dilución.	Zona de inhibición.
1	3 mm.
1 : 1	2 mm.
1 : 3	1 mm.
1 : 7	0.5 mm.
Testigo con caldo.	No hubo inhibición.
Testigo con mezcla de lactobacilos.	No hubo inhibición.

## METODO DE LAS COPAS DE OXFORD.

Al concluir el proceso ya descrito, se obtuvo un resultado positivo, ya que la inhibición producida por el lisado alrededor de las copas, que se encuentran en las cajas sembradas con *E. coli*, *S. typhosa*, *S. paratyphi "A"*, *S. paratyphi "B"*, y una mezcla con todos ellos; y usando como testigo otra mezcla de Lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus* de Moro y *Lactobaci-*

*Bus bugarius de Grigiroff*); empleándose gelosa jitomate para su desarrollo.

Esta inhibición se efectuó entre 24 y 48 horas después de sembradas las placas; siendo su halo de cero a 10 mm. alrededor de la copa y la inhibición proporcional a la dilución del lisado.

La siguiente tabla nos muestra un promedio de la zona de inhibición.

Dilución.	Zona de inhibición.
1	10 mm.
1 : 1	7 mm.
1 : 3	5 mm.
1 : 7	3 mm.
Testigo con caldo.	No hubo inhibición.
Testigo con mezcla de lactobacilos	No hubo inhibición.

Este método dió mejores resultados debido a que la cantidad de lisado filtrado fué mayor que la del método anterior.

#### AGLUTINACION MACROSCOPICA.

En las determinaciones efectuadas para el lisado por este método se observó aglutinación en todos los tubos incluyendo el testigo, y únicamente se observó una aglutinación mayor en los tubos números uno que corresponden al lisado puro, descendiendo ésta rápidamente no siendo apreciable para los fines que se pretendían.

Se usó como método tentativo y no se siguió utilizando por los resultados dudosos, llegándose a la conclusión de que no podía servir como base.

## INHIBICION DE CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO.

Al efectuarse las operaciones necesarias se obtuvieron como promedio los siguientes datos:

### *Escherichia coli.*

Dilución	Lectura en el Foto-colorímetro	Cantidad de Bacterias por mm <sup>3</sup> .
1	57	190 mil.
1 : 1	55	195 mil.
1 : 3	53	200 mil.
1 : 7	52	210 mil.
Testigo	50	220 mil.

### *Salmonella typhosa.*

Dilución	Lectura en el Foto-colorímetro	Cantidad de Bacterias por mm <sup>3</sup> .
1	84	50 mil.
1 : 1	81	55 mil.
1 : 3	80	60 mil.
1 : 7	79	70 mil.
Testigo	77	90 mil.

### *Salmonella paratyphi "A".*

Dilución	Lectura en el Foto-colorímetro	Cantidad de Bacterias por mm <sup>3</sup> .
1	98	5 mil.
1 : 1	96	10 mil.
1 : 3	80	70 mil.
1 : 7	75	90 mil.
Testigo	70	110 mil.

**Salmonella paratyphi "B"**

Dilución	Lectura en el Foto-colorimetro	Cantidad de Bacterias por mm <sup>3</sup> .
1	86	40 mil.
1 : 1	85	45 mil.
1 : 3	84	50 mil.
1 : 7	83	55 mil.
Testigo	80	65 mil.

De lo que se deduce que hay inhibición del crecimiento en las cepas estudiadas.

## CONCLUSION

De todos los resultados obtenidos se llega a la conclusión de que el LISADO FILTRADO inhibió "IN VITRO" el crecimiento de la **Escherichia coli**, **Salmonella typhosa**, **Salmonella paratyphi "A"** y **Salmonella paratyphi "B"**; mas no inhibió el de los **Lactobacillus acidophilus de Moro** y el del **Lactobacillus bulgaricus de Grigiroff**; pudiendo considerarse activo para determinados grupos e inactivo para algunos otros.

V

**BIBLIOGRAFIA**



BIBLIOGRAFIA

- 1.—Januzzi E. *Tratado de Microbiología*. 6a Ed. Editorial Formosa, S. A. 1955.
- 2.—Kubler J., Spillering H., Strohriegel W. *Microbiología*. 5a Ed. Editorial Formosa S. A. 1955.
- 3.—Sala J. *Microbiología. Principios de Bacteriología*. 2a Ed. Mc. Graw-Hill, Buenos Aires, 1955.
- 4.—Topley W., Wilson J. M. G. & *Bacteriología y Fisiología*. 2a Ed. Mc. Graw-Hill, S. A. 1960.
- 5.—Luzzati H. *Bacteriología*. 2a Ed. Editorial Hispano Americana, 1955.
- 6.—Nahn H. J. 1959. A new type of virus from whitefly. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 102: 377-378.
- 7.—Gutha, G. 1959. Temperature tolerance and kinetics of thermal inactivation in P. coli: common phase of various concentrations. *Proc Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 102: 487-489.

- 8.—Panizza D., Picco M. 1959. Bioquematical tests for classification of Enterobacteriaceas. *Boll. Int. Sieroter. Milán.* **38.** 222-228.
- 9.—Guzzon V., Picco M. 1959. Farmacological research on the endotoxins of *Salmonellas paratyphi A, B.* *Boll. Int. Sieroter. Milán.* **38.** 77-79.
- 10.—Bergamini E. 1959. Determination of *Salmonella typhi* and *S. paratyphi B*, in water by means of filtrating membranes. *Boll. Int. Sieroter. Milán.* **38.**
- 11.—Welsh, M. 1959. Transformation of spheroplast and lysis of *Escherichia* by actinomycetin. *C. R. Soc. Biol., Paris.* **153.** 370-372.
- 12.—Dodin A., Brygoo, E. R., Sureau, P. 1959. Recherchi et numeration des enterobacteris por hemocultive ses membranes filtrantes. *Ann. Inst. Pasteur.* **96 y 97.** 439-491.
- 13.—Margorina, L. M., Makarova, M. A. 1959. Nature and biological carac. of atypical forms of enterobacterias. *J. Micr. Epid.* **30.**
- 14.—Jacob, F. y Alderberg, A. 1959. Transference of genetic properties by incorporation with the sexual factor *Escherichia coli.* *C. R. Acad. Sci., Paris.* **248-249.** 189-191.