

Me 2 30  
UNIVERSIDAD LABASTIDA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias Químicas



**Efecto de Diversos Solventes Orgánicos  
Sobre la Viabilidad de Bacterias  
Gram Positivas y Negativas.**

**TESIS**

**Que para examen Profesional de  
Químico Farmacéutico Biólogo**

**presenta**

**Ma. GUADALUPE GONZALEZ BARRERA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Q. F. B. MSc. MANUEL A. RODRIGUEZ**

1961



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.

UNIVERSIDAD LABASTIDA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias Químicas

Efecto de Diversos Solventes Orgánicos  
Sobre la Viabilidad de Bacterias  
Gram Positivas y Negativas.

TESIS

Que para examen Profesional de

Químico Farmacéutico Biólogo

presenta

Ma. GUADALUPE GONZALEZ BARRERA

DIRECTOR DE TESIS

Q. F. B. MSc. MANUEL A. RODRIGUEZ

1961

*A mis Padres:*

*Sr. Horacio González J.*

*Sra. Luz Barrera de González*

*A mi hermana:*

*Srita. Ma. de Lourdes González B.*

*A mi madrina:*

*Srita. Ma. Guadalupe Barrera L.*

*A la Universidad Labastida.*

*A mi director de tesis*

*Sr. Q. F. B. MSc. Manuel A. Rodriguez*

*A mis Maestros.*

*Al departamento de Microbiología  
de la Facultad de Medicina de la  
Universidad de Nuevo León.*

*À mis compañeras:*

*Ma. Guadalupe Domínguez R.*

*Elva J. Lambertón V.*

*Ma. Esperanza Mirólos del C.*

*Elva G. Ramos L.*

*Ana Ma. Rocha J.*

*Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nuevo León, bajo la dirección del Sr. Q. F. B., MSc. Manuel A. Rodríguez.*

*Monterrey, N. L.*

# INTRODUCCION

*En la actualidad está muy bien establecido que las Eubacterias tienen una anatomía bastante bien definida la cual ha sido precisada por procedimientos químicos y microscópicos empleando numerosas técnicas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).*

*El constituyente más externo es una capa mucilaginosa que generalmente mide menos de 200 milimicras; sin embargo, cuando esta capa crece por adhesión de nuevo material llega a tener un grueso muy considerable a veces hasta de una o más micras y entonces se le denomina cápsula. Esta estructura externa es sostenida y generada por otra estructura denominada pared celular que es una capa gruesa, rígida y porosa que se sabe es la que da la forma a las bacterias. Adherida en su cara interna a esta pared celular se encuentra una delgada membrana de una permeabilidad selectiva que se denomina membrana citoplasmática y que constituye la barrera osmótica de la bacteria. La membrana citoplasmática mantiene encerrado a un sistema coloidal que sabemos es el citoplasma en el cual están contenidos los distintos componentes vitales de la célula tales como proteínas, amino ácidos, vitaminas, otros factores de crecimiento, ácidos nucleicos y otros componentes.*

*Diversos autores han demostrado que la composición química de las cápsulas o membranas mucilaginosas es en la mayoría de las bacterias de naturaleza polisacárida, unas son de stranes, levanes etc., mientras que en otras están constituidas por cadenas mixtas de monosacáridos aminados (como la glucosa aminada) unido a unidades de ácidos urónicos. En otras bacterias sobre todo en el género Bacillus el constituyente básico es un polipéptido y los polisacáridos están ausentes en términos generales.*



Por el contrario la constitución química de la pared celular es completamente distinta de la de la capa mucilagínosa. Los trabajos de Salton (4), Mitchell y Moyle (10), Cummins y Hadd (11), Neaton (15), Park y Stoninger (16), han definido con bastante claridad los componentes más importantes; sin embargo existe una diferencia notable entre los constituyentes de esta estructura entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas. La pared celular de las bacterias Gram positivas tienen como componente principal a un muco-complejo, que es un polímero formado por unidades de N-Acetilglucosamina y ácido muáámico acetilado (3-O-Alfa-carboxistil-glucosamina) unido a péptidos formados por D-Alamina, D-Acido glutámico y lisina o su precursor, ácido diamino-pimélico. Los aminoácidos sulfurados, la histidina, prolina y arginina están ausentes. Además del muco-complejo (que es el substrato para la lisozima) las bacterias Gram positivas contienen otros polímeros estructurales tales como el fosfato de ribitol (ácidos teicoicos) que el *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus arabinosus* y *Bacillus subtilis* comprende hasta el 30% de la pared celular. Polímeros de fosfato de glicerol han sido también caracterizados. El contenido de lípidos en la pared celular de diversas bacterias Gram positivas oscila entre 1 y 5% aproximadamente.

Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular más delgada formada por el mismo muco-complejo y cubierto en la parte externa por una capa de unas 20 milimicras de grueso de lipoproteína. La parte proteica contiene todos los aminoácidos comunes incluyendo aminoácidos sulfurados, arginina y prolina. No contiene ácidos teicoicos y el contenido de lípidos oscila entre un 11 y un 22%. Microfotografías electrónicas obtenidas por Horvick (17), muestran que la pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por dos capas bien definidas que quizá corresponden a la capa de muco-complejo y de lipoproteína.

El contenido de lípidos bacterianos es pues uno de los atributos diferenciales más importantes. Estos pueden ser definidos hasta ahora sólo por el método de extracción usado. En los Gram negativos se reportan cifras hasta de 8% de "lípidos extractables por éter". Si la preparación de pared celular se somete a una hidrólisis ácida enérgica (HCl 6N /2 hs/100C) el total de "lípidos extractables sube" hasta un 22% aproximadamente, mientras que en los Gram positivos la cantidad de "lípidos extractables con éter" es casi negligible, el total de lípidos previa hi-

drólisis llega a un promedio de 2.5%. No hay información suficiente al respecto de la naturaleza química de estos lípidos.

Está bien establecido que la pared celular es una estructura bastante rígida porosa que no sólo sostiene la membrana celular del protoplasto contra presiones hasta de 30 atmósferas sino que también actúa como una "criba" con espacios abiertos hasta de una milinera de diámetro que previene a solutos de P.M. de 10,000 o más (diámetro de 2.5 milimicras) de dejar el protoplasto o llegar a él a través de la pared celular.

La membrana citoplasmática está un poco menos definida químicamente que la pared celular pero se sabe que es de naturaleza fundamentalmente lipoproteica y los estudios de Vennes y Gerhardt (18), usando técnicas inmunológicas han demostrado la disparidad de componentes químicos. Cuando las bacterias son mecánicamente desintegradas por vibración ultrasónica esta membrana se desorganiza en fragmentos pequeños constituyendo un 45% por peso de proteínas y un 22.5% a lípidos sumando aproximadamente un 10% del peso total seco de la bacteria. Se ha encontrado que un gran número de sistemas enzimáticos reside cerca de la membrana citoplasmática (10,13,19,20) y que muchas de las partículas con actividad enzimática obtenibles por desintegración mecánica de las bacterias no son microsomas microplasmáticos sino fragmentos de la membrana citoplasmática con enzimas. La fisiología de esta membrana y su enorme importancia en la permeabilidad bacteriana constituyen en la actualidad un capítulo de extraordinaria importancia que ha atraído el interés de numerosos investigadores y cuya discusión es imposible realizar en este capítulo introductorio. En cuanto a los constituyentes citoplasmáticos se refiere, no difieren éstos mucho de los constituyentes de otras células vegetales y animales con la excepción de la ausencia de estructuras definidas o identificables como mitocondrias.

El concepto del núcleo bacteriano ha sido de gran controversia en el campo de la Bacteriología y se debe fundamentalmente a la confusión y definir el núcleo dentro de sus conceptos morfológico, químico y genético.

No se puede hablar en las bacterias de un núcleo morfológico en la forma en que se refiere al hablar de células de vegetales superiores o de células animales;

sin embargo, desde hace algún tiempo se conoce la existencia de un núcleo morfológicamente definible en algunas fases de crecimiento de las bacterias empleando coloraciones especiales. Los trabajos de Rabinow (21), Kuaysi (22), De Lamater (22, 23, 24) y otros han contribuido notablemente a aclarar este concepto, sin dejar de haber desde luego grandes controversias en cuanto a los detalles fisiológicos de estas estructuras cromáticas tales como la presencia de cromosomas bien definidos y la existencia de mitosis que defiende la escuela de De Lamater y negada por otros autores.

Puede verse de lo anteriormente descrito que mucho se ha avanzado en el conocimiento anatómico y fisiológico de las bacterias, quedando como es de suponer todavía muchos factores y fenómenos hasta la fecha desconocidos o imperfectamente explicados.

Considerando que uno de los caracteres distintivos más importantes entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas es su distinto contenido de lípidos en la pared celular bacteriana fué avanzada la hipótesis siguiente: si una bacteria Gram negativa con un alto contenido de lípidos en su pared celular era puesta en contacto con solventes orgánicos apropiados que extrajesen los citados componentes lípidos era de suponerse una desorganización de la arquitectura de tal pared celular con el concomitante cambio en su porosidad y en su función protectora, sobre la membrana citoplasmática que habría de traducirse en un aumento de la presión hidrostática sobre el protoplasto además de incrementar el intercambio osmótico al nivel de la membrana citoplasmática ocasionando la ruptura de esta membrana y la muerte bacteriana en un choque osmótico. Por el contrario las bacterias Gram positivas por tener menor cantidad de lípidos en su pared celular la extracción de estos no ocasionaría un cambio en su arquitectura y por lo tanto la porosidad de la pared celular sería poco afectada continuando entonces el papel protector que ésta tiene sobre el protoplasto y por lo tanto no debería afectar muy seriamente la integridad de la membrana citoplasmática que se traduciría en una sobrevivencia mucho más prolongada que las bacterias Gram negativas.

Los experimentos que a continuación se describen fueron diseñados únicamente para probar diferencias de viabilidad de estos dos grupos de bacterias al ser tratados con alcoholes de diferentes pesos moleculares y distintos solventes de lípidos.

## MATERIAL Y METODO

Se seleccionaron para este estudio tres cepas de cocos Gram positivos; una de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*. De los Gram negativos una de *Escherichia coli*, dos de *Pseudomonas aeruginosa* y dos de *Proteus mirabilis*. Todas fueron mantenidas en Agar tripticasa.

Determinación de la curva de crecimiento de cada una de las bacterias usadas: Se seleccionaron tubos de trece por cien milímetros, sin labio y se llenaron con una solución muy diluída de azul de metileno leyéndose al fotocolorímetro Klett con un filtro de una transmisión máxima de 660 milimicrones. Se escogieron que dieran lecturas muy semejantes y se lavaron muy cuidadosamente. Estos mismos tubos se llenaron con 7 ml. de caldo de tripticasa y soya (B-B-L). Se cubrieron con tapón de algodón y fueron esterilizados a la autoclave.

Se inoculó un tubo de estos con cada una de las bacterias a que se les iba a determinar su curva de crecimiento. El inóculo consistió en 0.1 ml de un cultivo en caldo de tripticasa y soya de 18 horas; al terminar de inocular el tubo se cambió el tapón de algodón por uno de hule estéril. Acto seguido se homogeneizó invirtiendo el tubo y se leyó en el fotocolorímetro de Klett a 660 milimicrones. Los tubos fueron entonces incubados a 37°C y fué leída su turbidez a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, y 24 horas de incubación.

Se observó que el máximo crecimiento prácticamente en todas las bacterias ensayadas se obtenía a las 18 horas aproximadamente.

Recuento bacteriano viable.--Una vez seleccionado el tiempo de incubación necesario para un máximo de crecimiento se tomó una porción de cada uno de es-

tos cultivos y se hicieron diluciones en tubos con solución salina estéril (NaCl al 0.85%) que variaba de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . De cada una de estas diluciones se inocular superficialmente 0.1 ml a placas de Agar nutritivo de tripticasa y soya extendiéndose el inóculo con una varilla doblada; se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas y se hizo el recuento de colonias.

Se observó que la dilución  $10^{-6}$  daba en todas las bacterias un recuento que oscilaba entre 50 y 300 colonias y fué escogida como la dilución única que se practicaría antes de incluir el solvente y que serviría como recuento control.

Se escogió arbitrariamente la proporción de 4 ml. de cultivo de 18 horas, y 1 ml. de solvente a la concentración que lo proporcionaba el fabricante. Se cubrió el tubo con tapón de hule estéril y se agitó continuamente tomando muestras a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 minutos inoculándose 0.1 ml en placas de Agar tripticasa y soya previamente secadas a  $37^{\circ}\text{C}$  extendiéndose el inóculo en toda la superficie con una varilla de vidrio doblada estéril. Antes de agregar el solvente se tomó 0.1 ml del cultivo y se diluyó a  $10^{-6}$  y se inocularó 0.1 ml en una placa en la misma forma que las anteriores. Se incubaron por 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se contaron las colonias desarrolladas antes y después de agregar el solvente orgánico.

Las cifras obtenidas fueron tabuladas y después transferidas a gráficas de sobrevivencia logarítmica.

Antes de haberse hecho la decisión de usar 4 ml de cultivo bacteriano de 18 horas, se ensayaron cultivos de 24 horas y bacterias lavadas repetidamente con solución salina normal después de haber sido cultivadas durante 16 horas estáticamente resuspendidas a su volumen original con solución salina. A estos sistemas se les agregó 1 ml de algunos de los reactivos usados y que en estudios preliminares se habían comportado satisfactoriamente, y se estudio su viabilidad a los mismos intervalos ya mencionados encontrándose que no había diferencia importante en su viabilidad ante estos reactivos y a las concentraciones usadas en cultivos de 16 o 24 horas ó en células lavadas previamente antes de exponerlos al agente químico. En vista de esto se decidió usar un cultivo bacteriano ordinario sin ningún tratamiento previo.

# RESULTADOS

Empezando por estudiar el efecto del alcohol metílico sobre bacterias Gram positivas y negativas vemos que la más seriamente afectada es *Pseudomonas aeruginosa* que baja unas 5U. logarítmicas de su recuento viable original; fuera de eso todas las demás permanecen sin ningún efecto sobre su viabilidad.

En la gráfica Núm. 2 se muestra el efecto del alcohol etílico. La viabilidad de los Gram positivos es preservada así como la *E. Coli*; mientras que *Proteus* y *Pseudomonas* sucumben en 5 a 15 minutos.

En la gráfica Núm. 3 vemos el efecto del isopropílico. Obsérvese que los Gram negativos mueren en un minuto o menos; en el mismo tiempo los Gram positivos muestran poca reducción en su viabilidad, después de los 4 o 5 minutos, los más afectados son *Strept. faecalis* y *Strept. pyogenes*, mientras que *Staph. aureus* no tanto. Este es uno de los mejores solventes que encontramos.

Las gráficas 4, 5, 6 y 7 muestran el efecto que de los alcoholes butílico, isobutílico, amílico e isoamílico tienen sobre bacterias Gram positivas y negativas. En los cuatro casos todas ellas se vuelven no viables en menos de un minuto.

En la gráfica Núm. 8 se observa el efecto del hexílico, con excepción de *Staph. aureus* que resiste su acción por buen tiempo, finalmente aunque muere toda la población a los 30 minutos, las demás bacterias sucumben en el término de un minuto.

En la gráfica Núm. 9 vemos que el alcohol caprílico en el término de 1 a 2 minutos dá cuenta de *Proteus* y *E. coli* pero *Pseudomonas* es muy poco afectada. Los Gram positivos son poco afectados, el más fue *Strept. faecalis*. Este es también uno de los buenos reactivos separadores encontrados.

En la gráfica Núm. 10 con isooctílico, Proteus y Escherichia pierden su viabilidad en un minuto pero aquí al igual que el caprílico (alcohol también de 8 carbonos) Pseudomonas no es afectado seriamente. Staphylococcus no es afectado, Strept. faecalis y Strept. pyogenes baja 6 U., logarítmicas.

Ahora veremos el efecto de otros reactivos orgánicos varios, muchos de los cuales son buenos disolventes de lípidos.

La Acetona en la gráfica Núm. 11 muestra muy poco efecto sobre Gram positivos. Proteus y Pseudomonas bajan mucho en viabilidad números escasos de ellos permanecen viables por 20 o más minutos mientras E. coli es afectada en grado moderado.

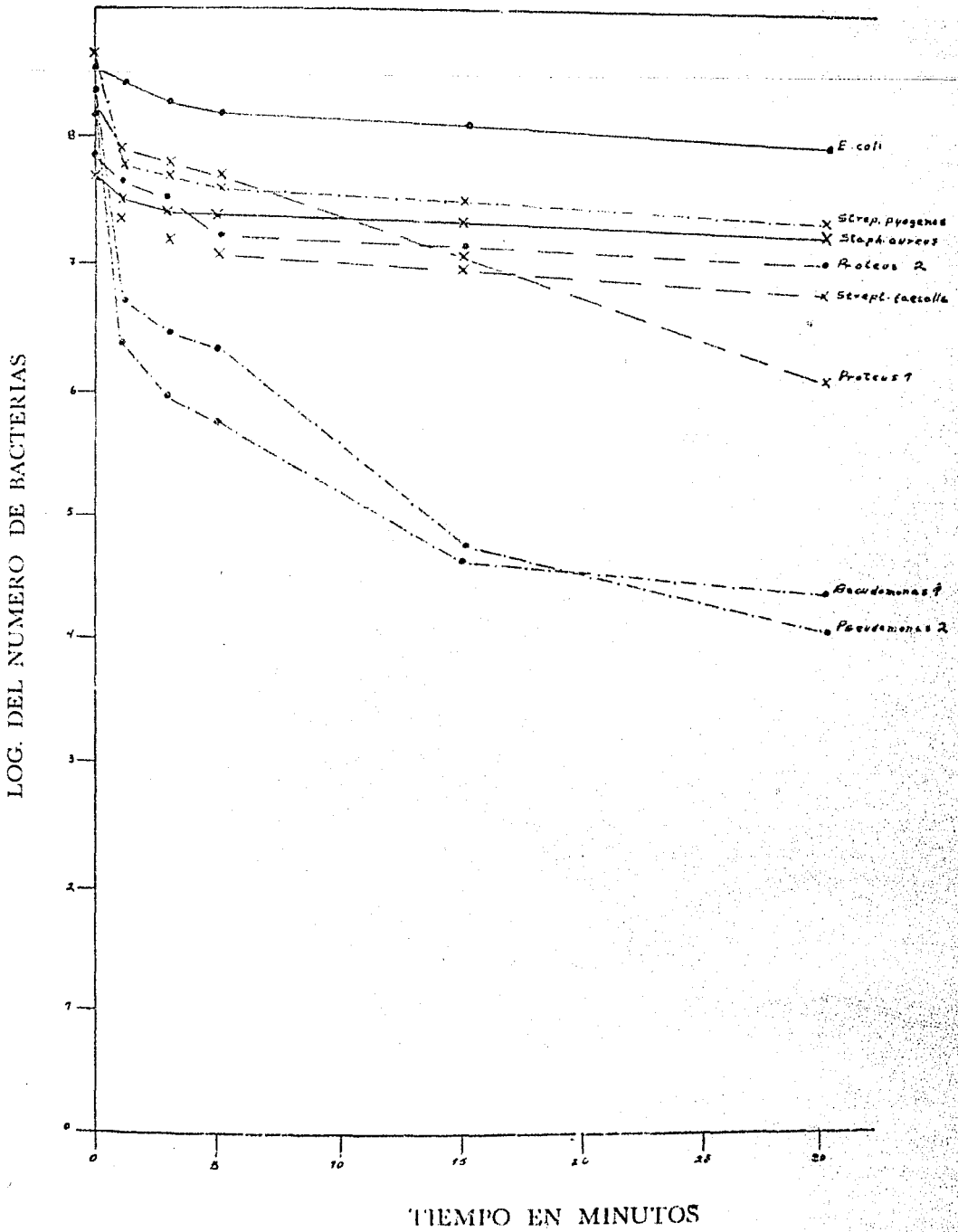
En la gráfica Núm. 12 se puede ver con claridad el efecto letal rápido, en cuestión de un minuto de cloroformo.

El eter etílico que estudiamos en la gráfica Núm. 13 mata rápidamente los Gram negativos y aunque baja el número de sobrevivientes mucho, es capaz de separarlos sobre todo en los primeros minutos.

En la gráfica Núm. 14 vemos el efecto del éter de petróleo; aunque sabemos que es un excelente disolvente de lípidos tiene un efecto muy pobre como bactericida y no afecta seriamente ni a Gram positivos ni a Gram negativos.

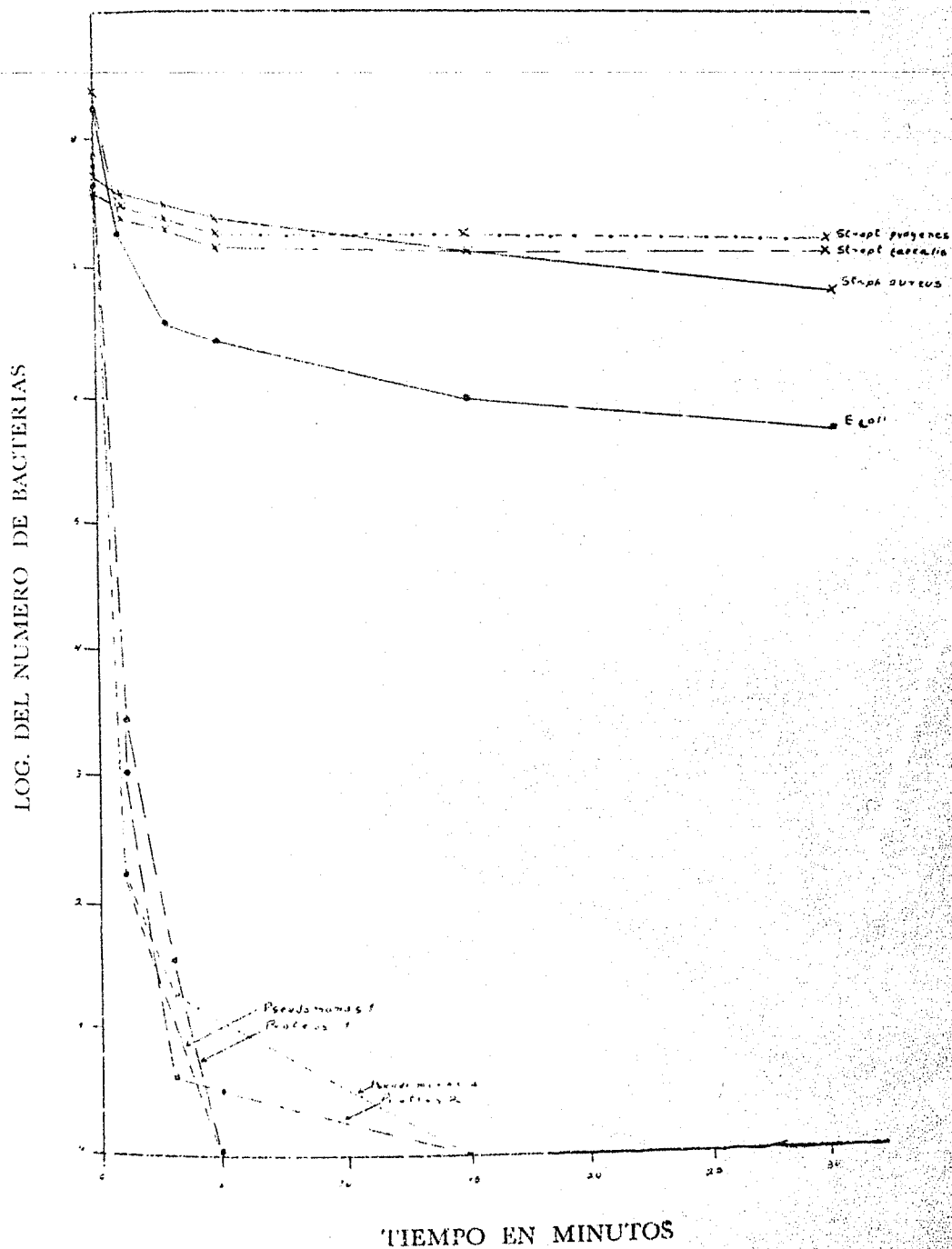
En la última gráfica, la Núm. 15 observamos que el tetracloruro de carbono inactiva rápidamente a los Gram negativos y afecta mucho menos a los Gram positivos, permitiendo separarlos aunque a ambos Streptococos los afecta en forma moderada.

GRAFICA I --- ALCOHOL METILICO

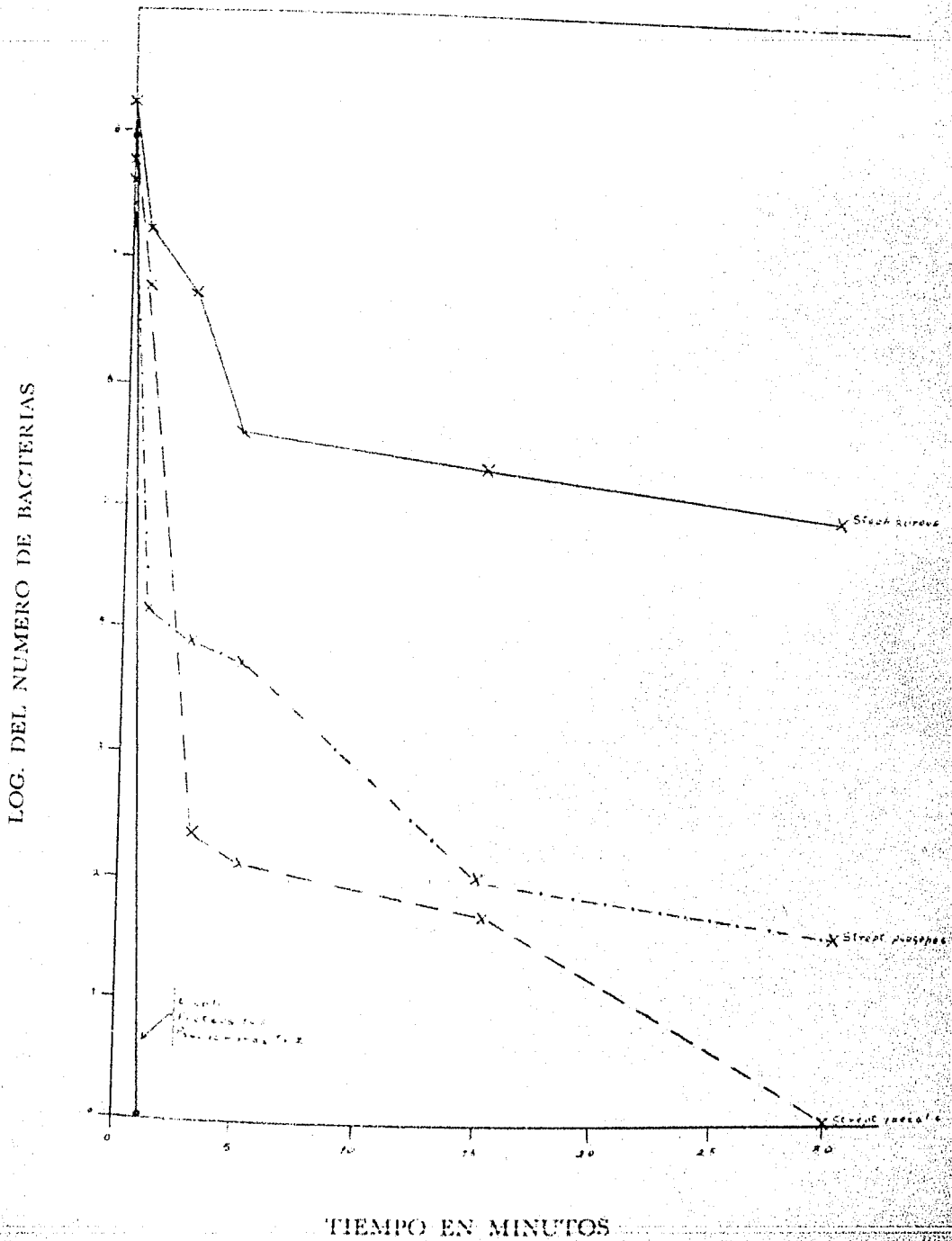




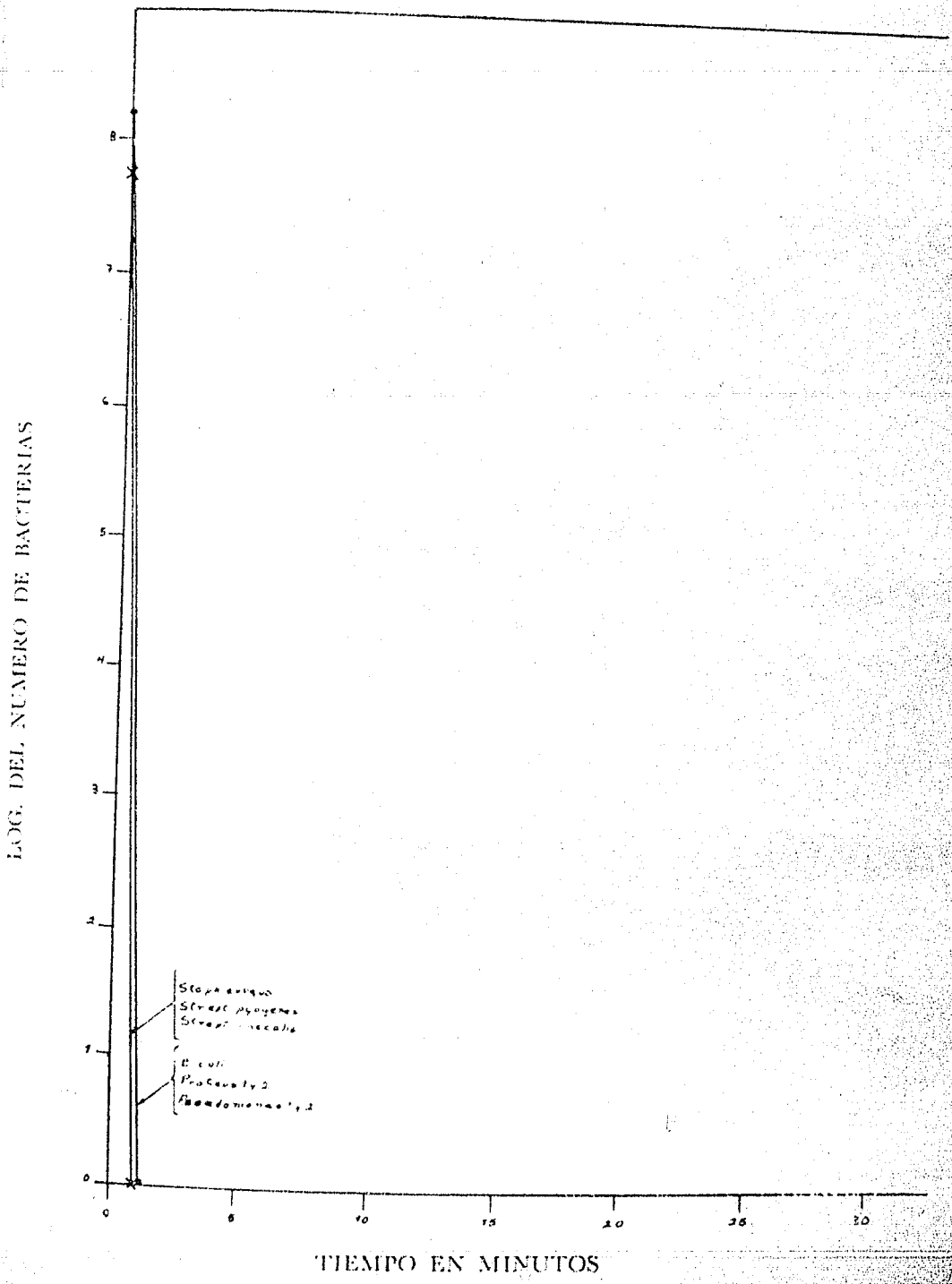
GRAFICA II — ALCOHOL ETILICO



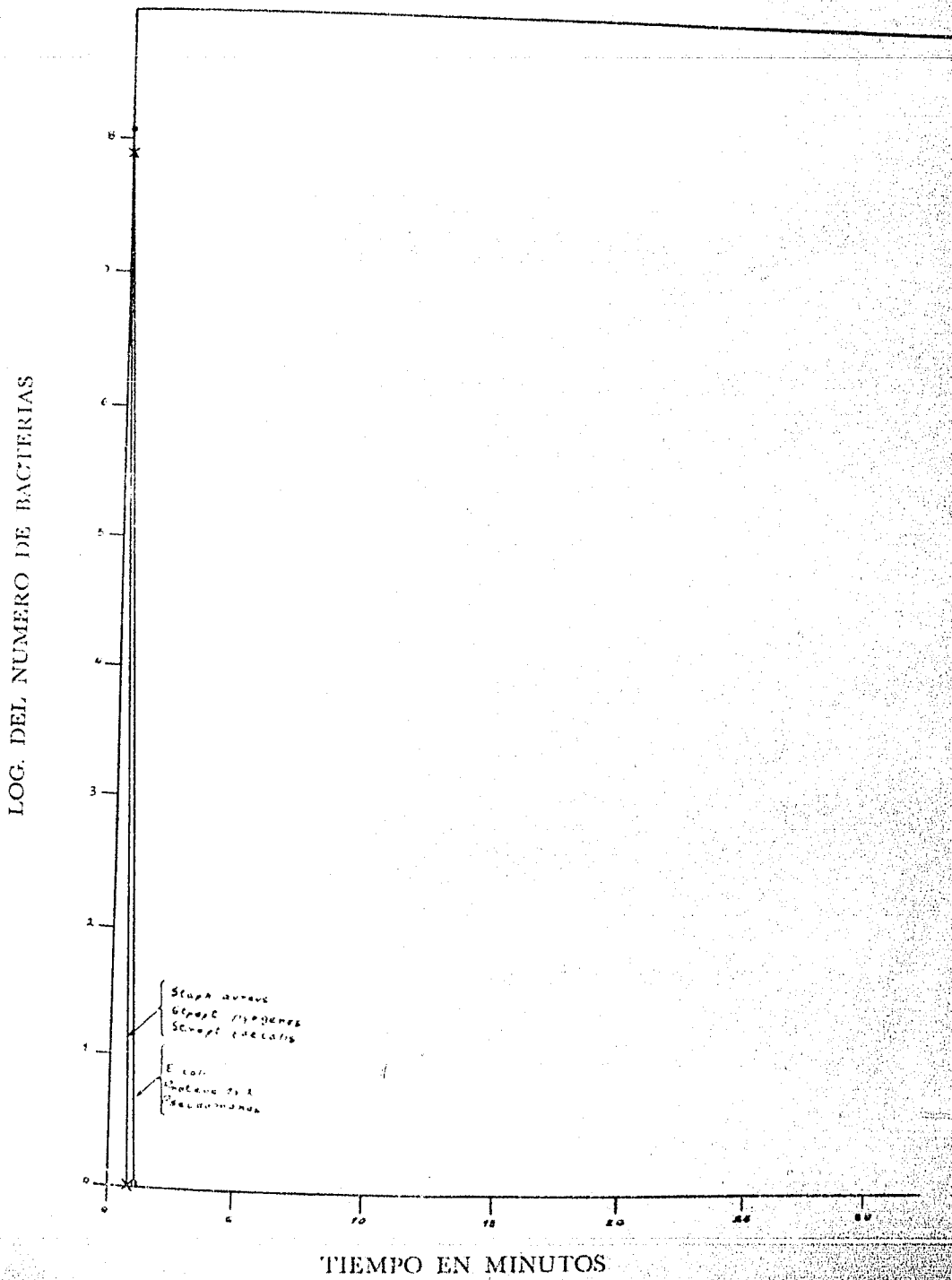
GRAFICA III - ALCOHOL ISOPROPILICO



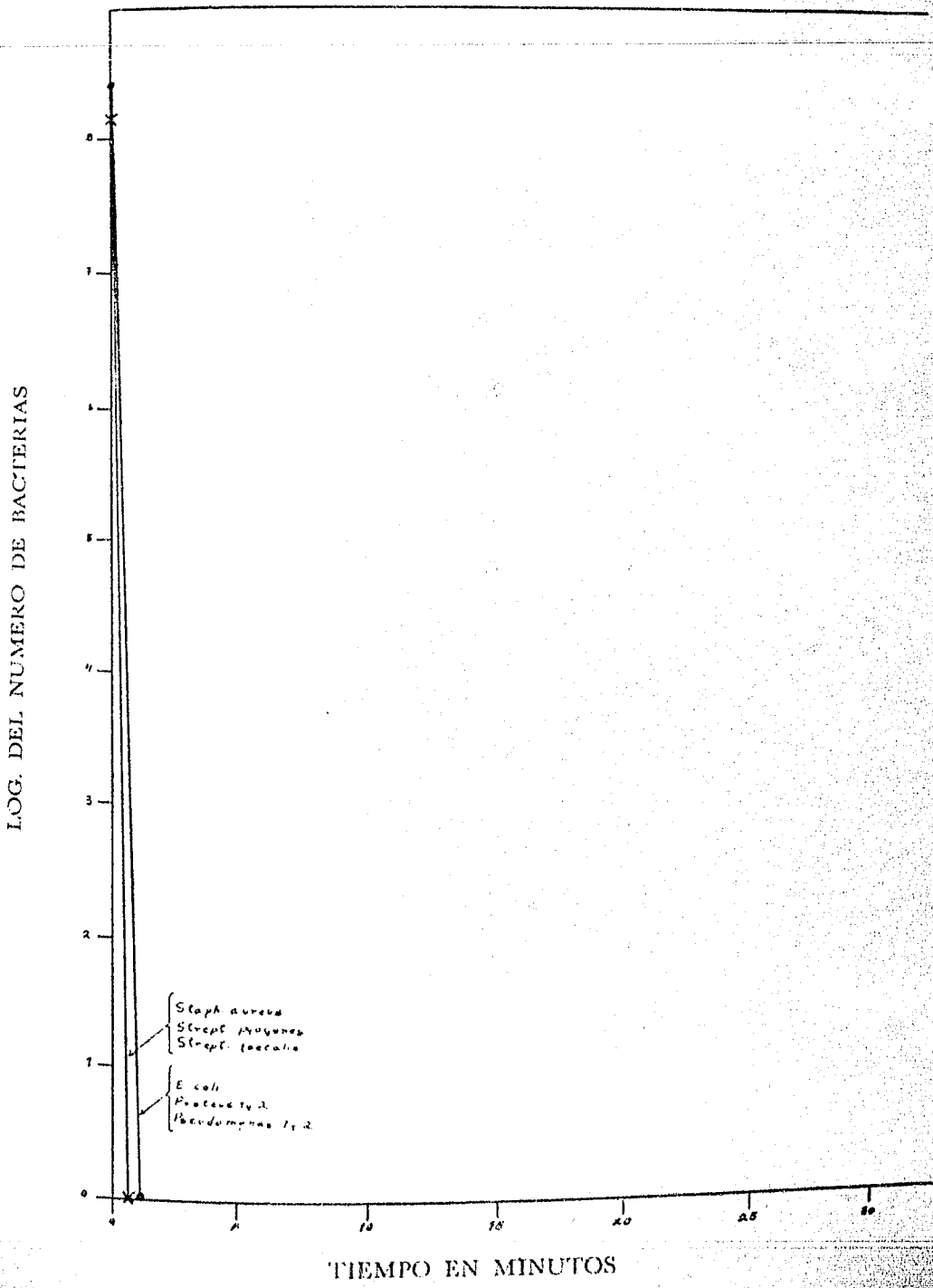
GRAFICA IV — ALCOHOL N — BUTILICO



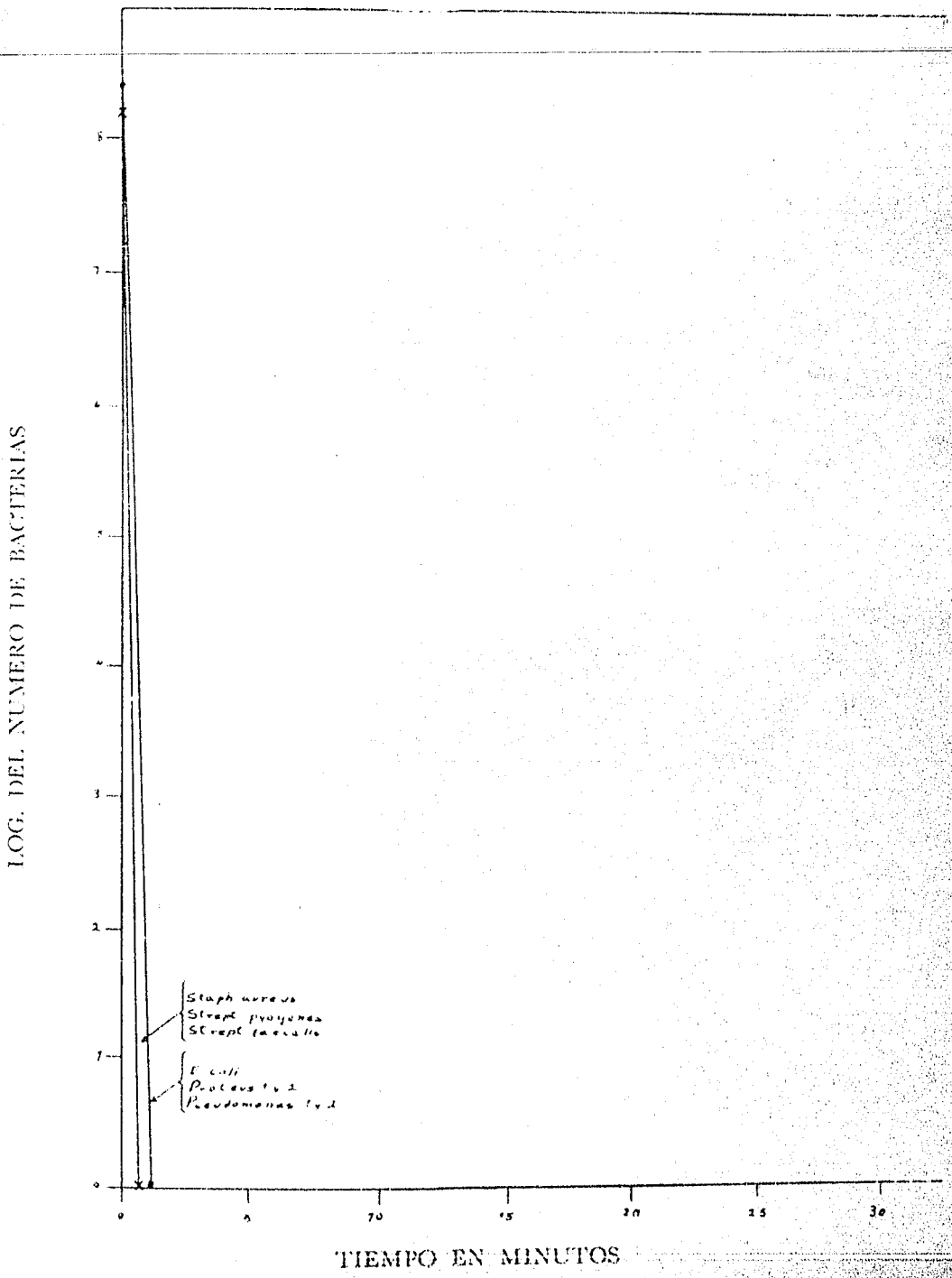
GRAFICA V -- ALCOHOL ISO-- BUTILICO



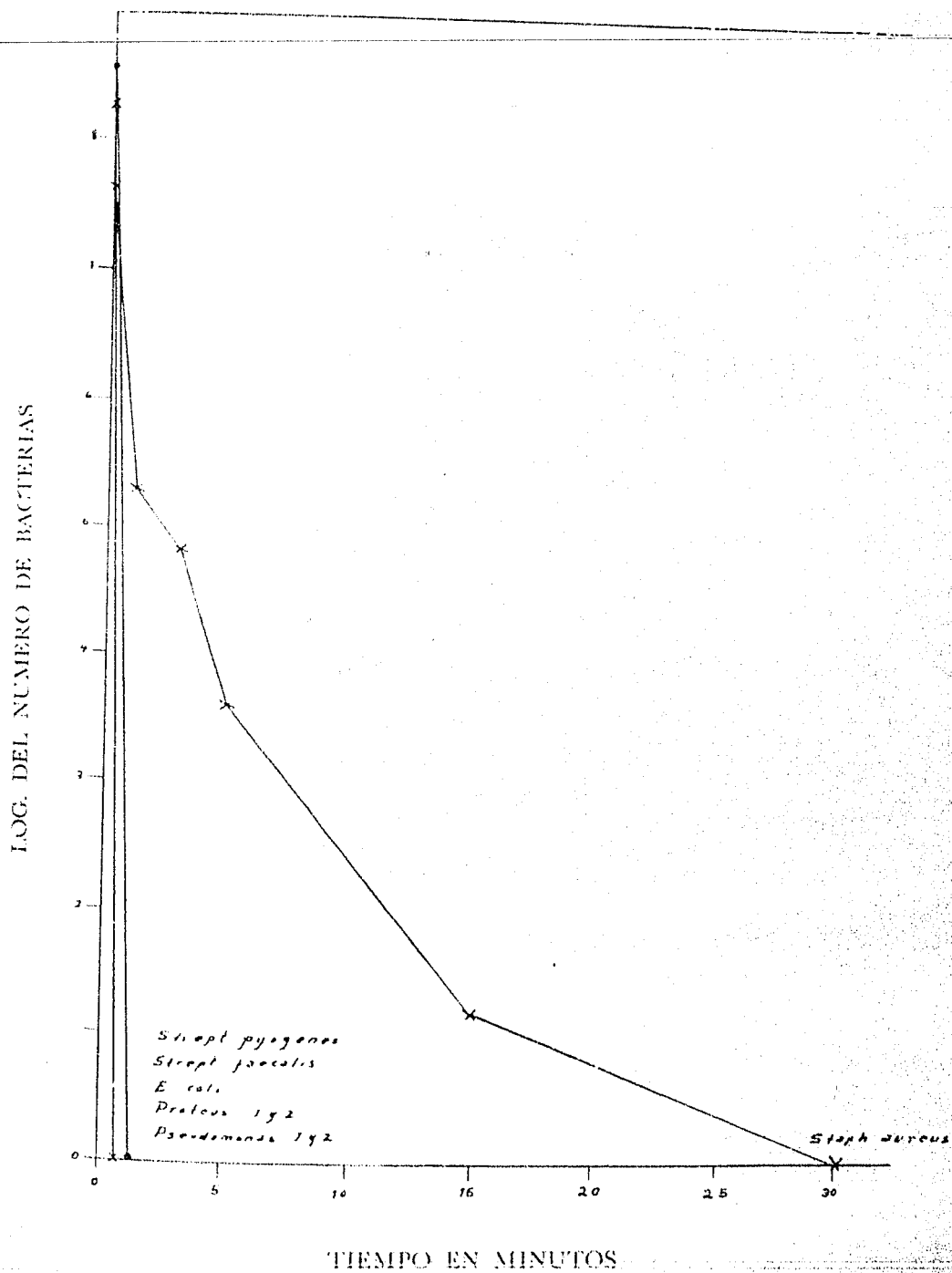
GRAFICA VI -- ALCOHOL N -- AMILICO



GRAFICA VII — ALCOHOL ISO — AMILICO



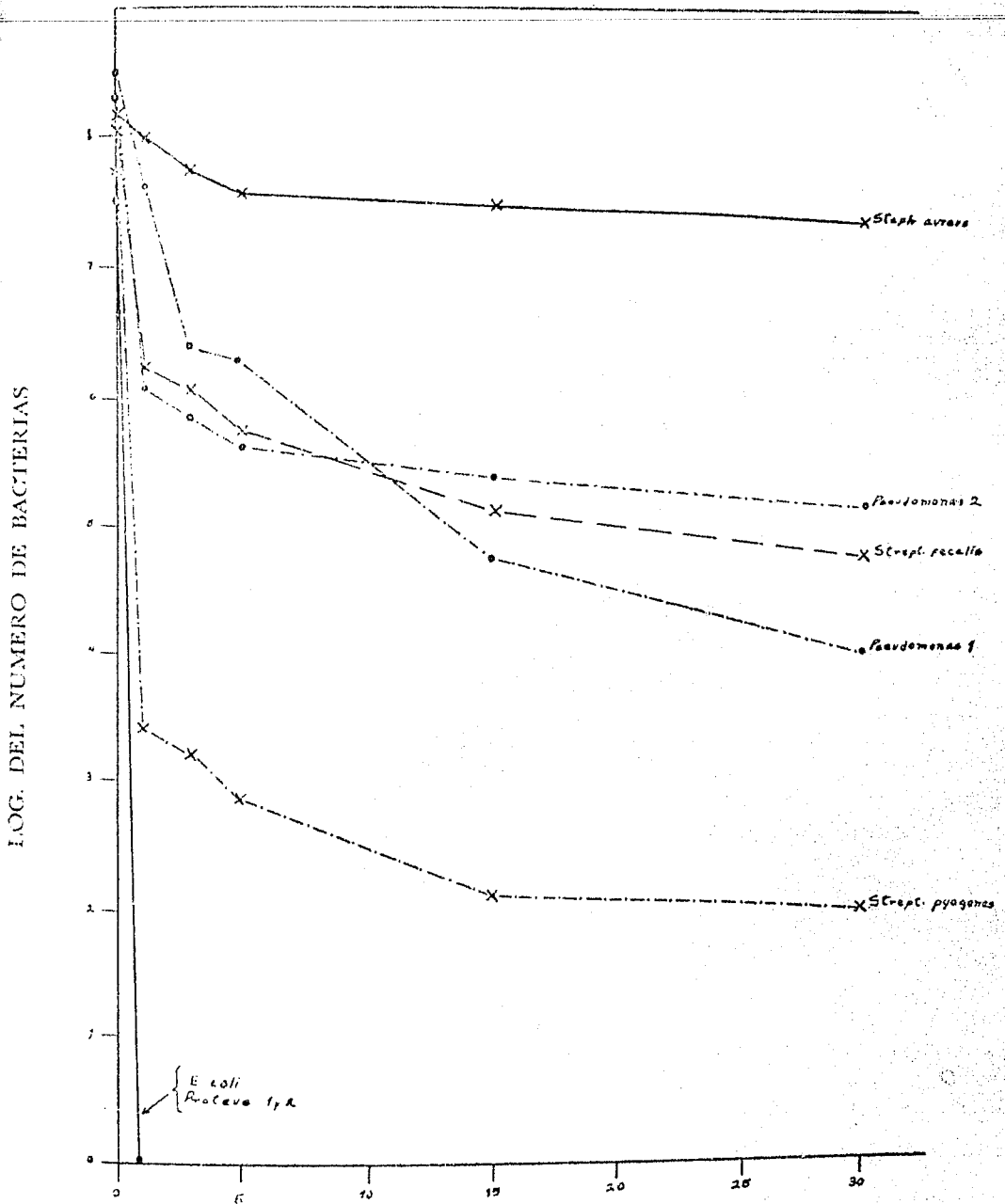
GRAFICA VIII -- ALCOHOL 2 -- HEXILICO





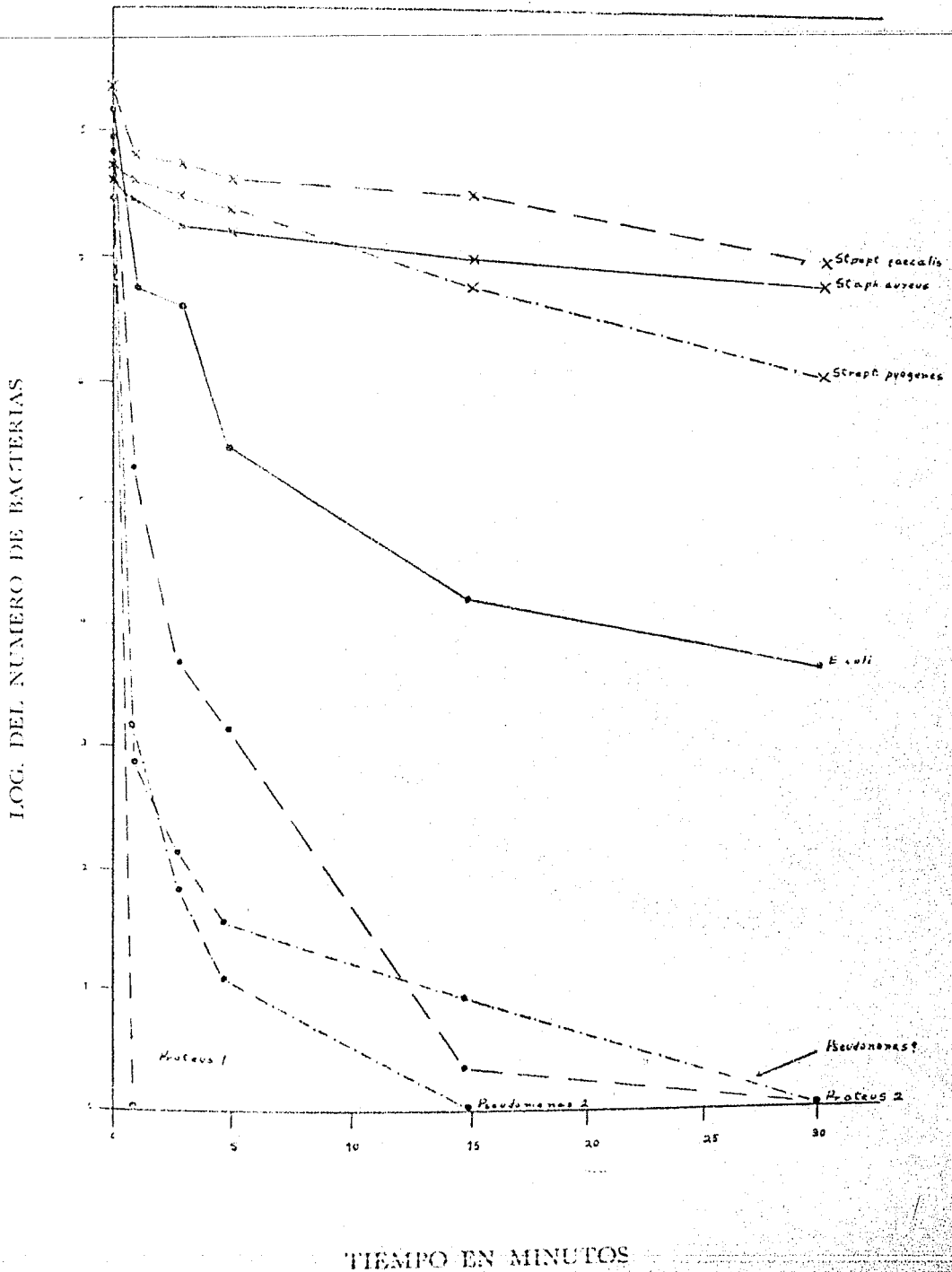


GRAFICA N - ALCOHOL ISOCTILICO



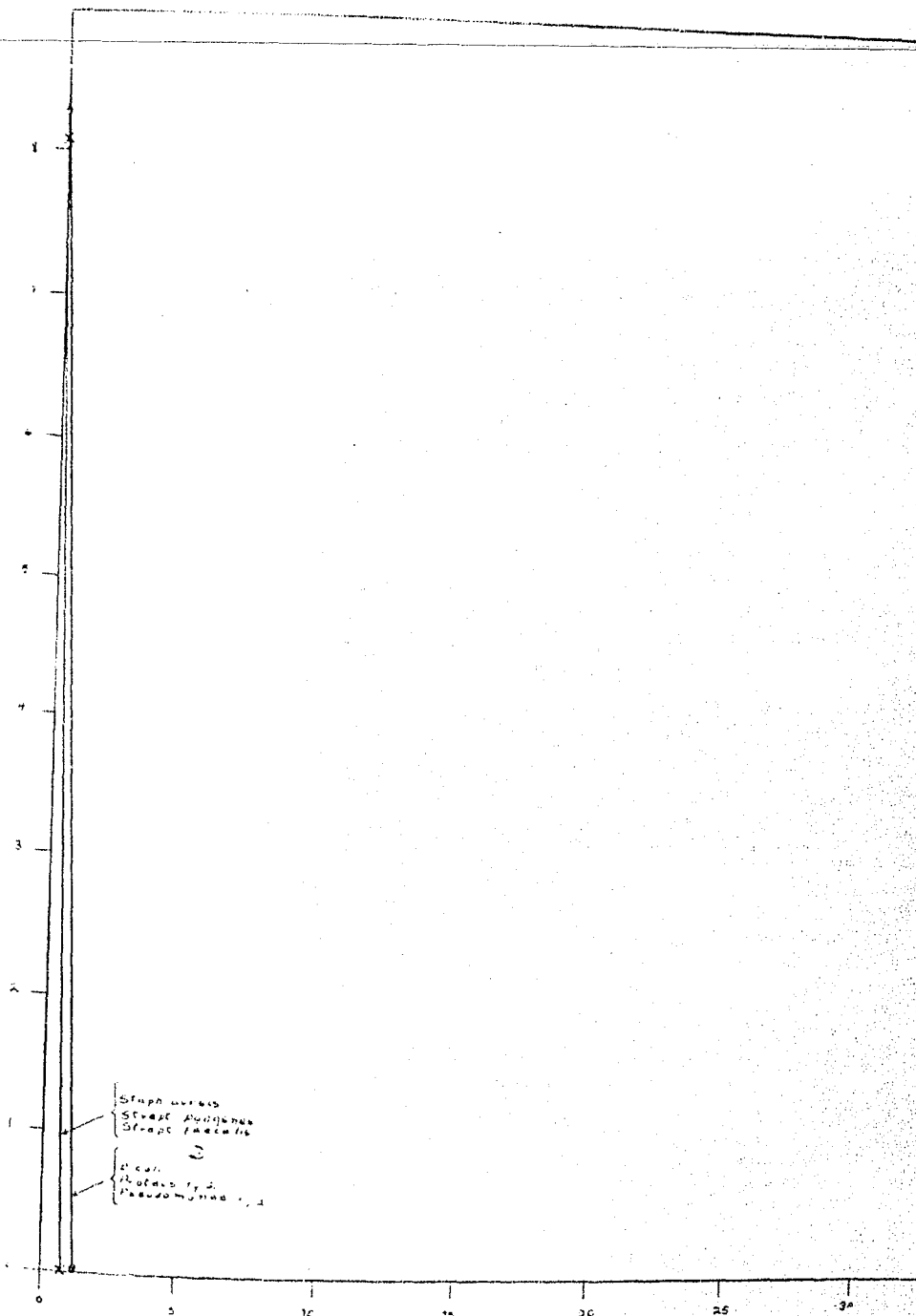
TIEMPO EN MINUTOS

GRAFICA XI ACETONA



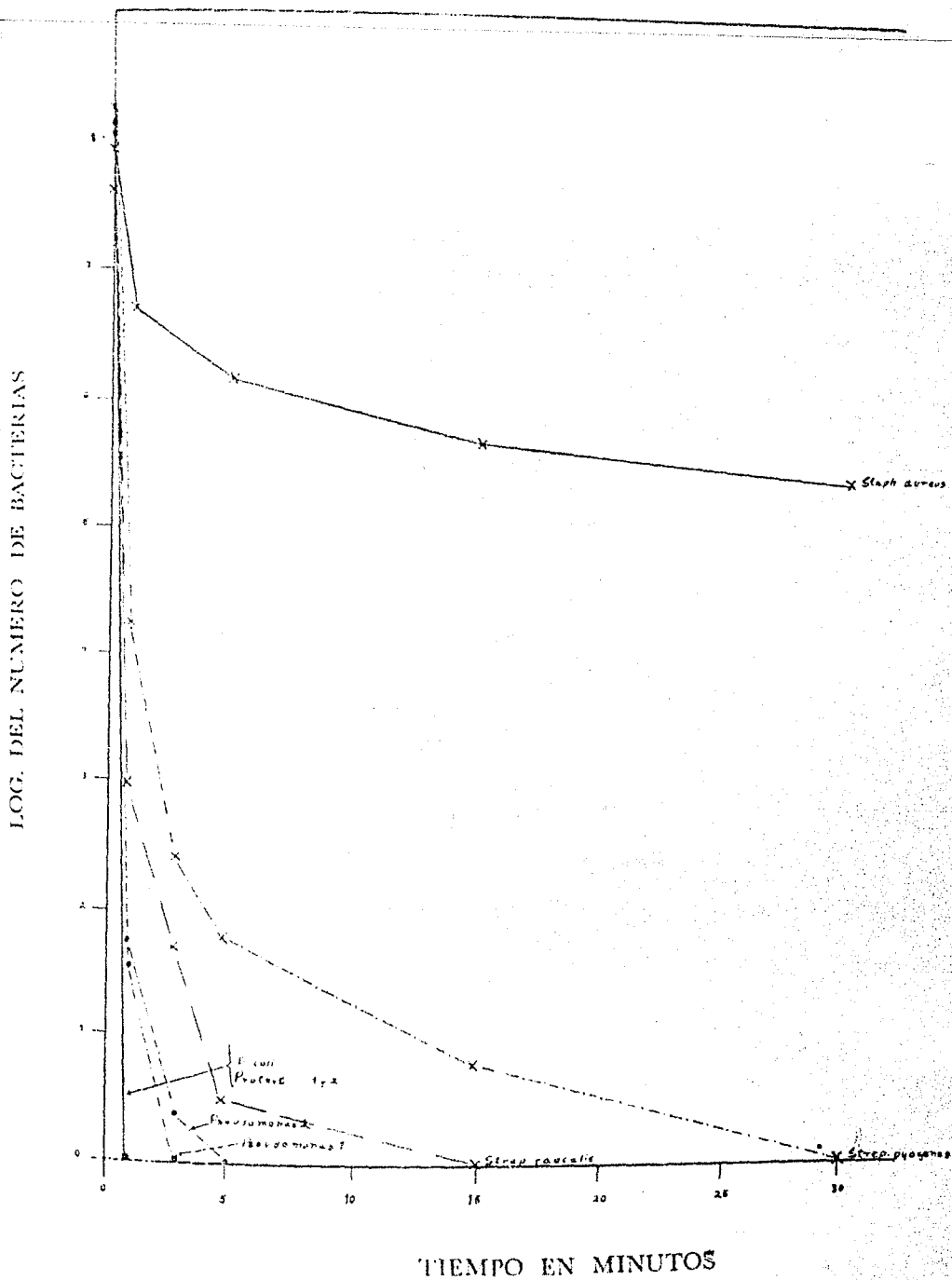
GRAFICA XII CLOROFÓRMO

LOG. DEL NUMERO DE BACTERIAS

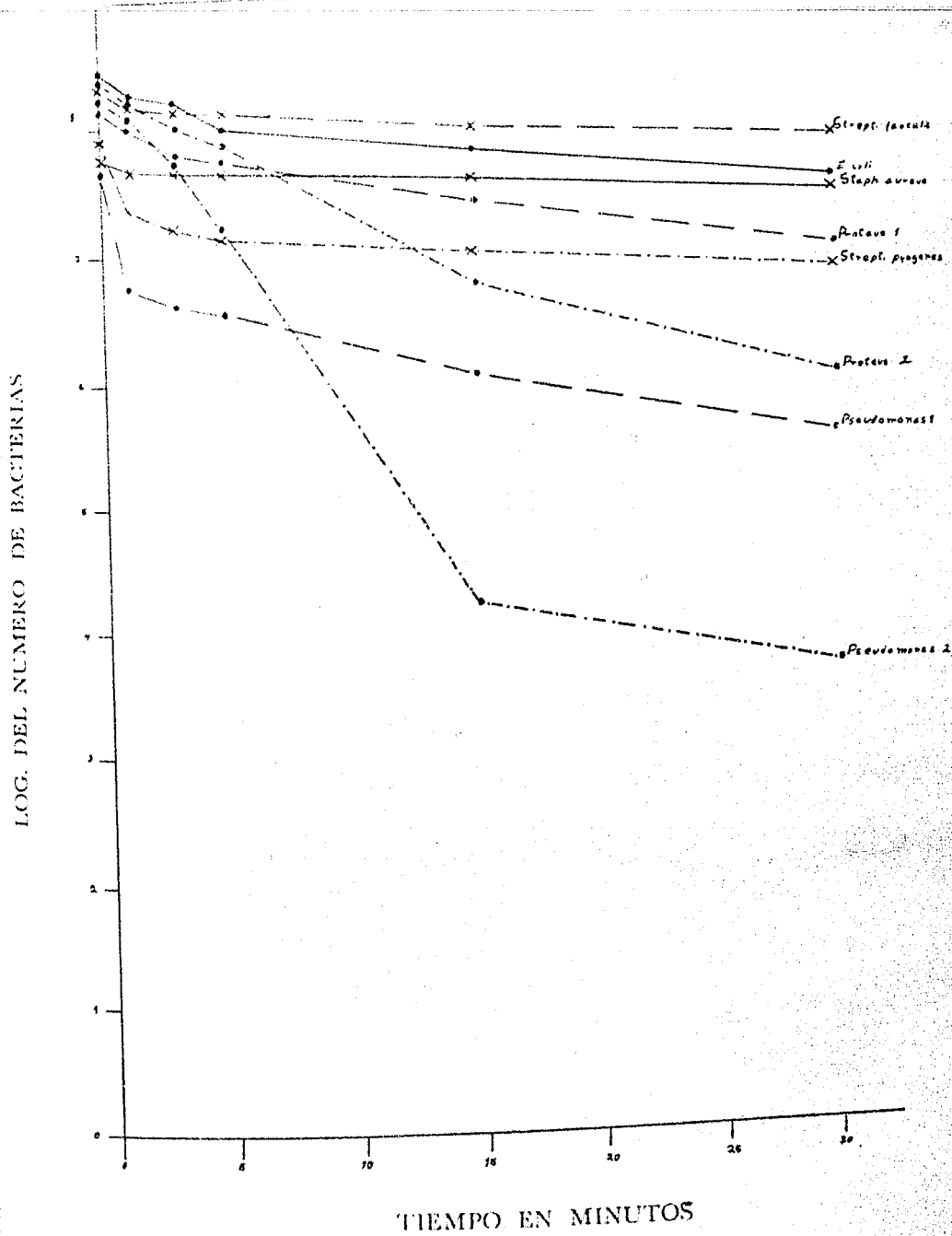


TIEMPO EN MINUTOS

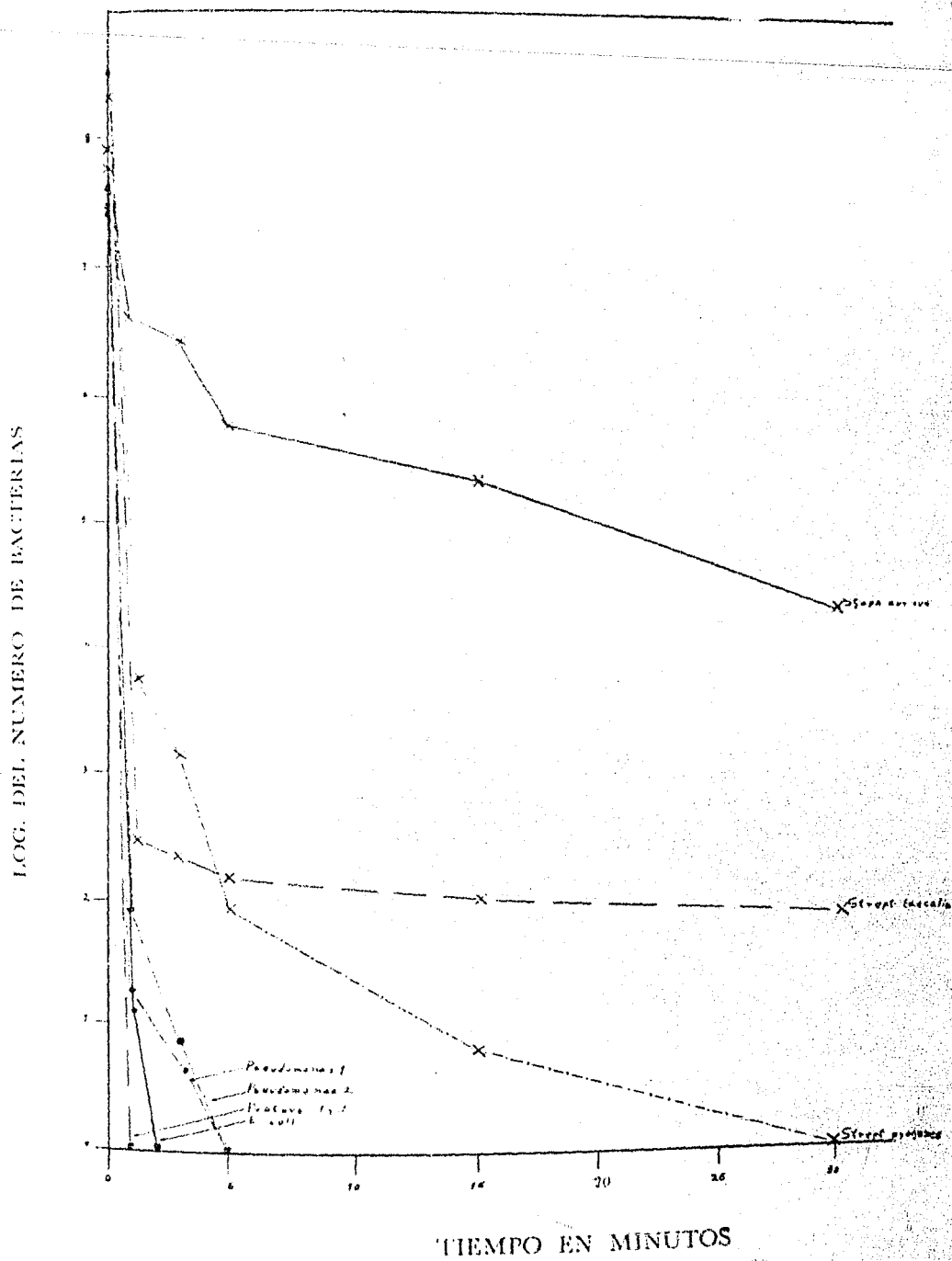
GRAFICA XIII -ETER ETILICO



GRAFICA XIV ETHER DE PETROLEO



# GRAFICA XV - TETRACLORURO DE CARBONO



## DISCUSION

Se puede agrupar el efecto de las sustancias utilizadas en tres grandes grupos: El primero: aquellos reactivos que volvieron no viables a bacterias Gram positivas y Gram negativas en poco tiempo. El segundo, aquellos reactivos que no tuvieron efecto o este fué muy bajo sobre la viabilidad de las bacterias y el tercero aquellos reactivos que inactivaron rápidamente a bacterias Gram negativas y respetaron la viabilidad de las Gram positivas.

Los representantes típicos del primer grupo serían los dos alcoholes butílicos y los amílicos, los cuales volvieron no viables a grandes poblaciones Gram positivas y negativas en el término de un minuto a la concentración usada. El efecto del cloroformo fué prácticamente idéntico al de los alcoholes ya citados. Un efecto bastante parecido fué el del hexanol, aunque no inactiva tan rápidamente a *Staphylococcus aureus*; sin embargo, la viabilidad de éste va siendo menor a medida que pasa el tiempo no quedando sobrevivientes en el término de 30 minutos. Vemos pues que los alcoholes de cuatro, cinco y seis carbonos afectaron la viabilidad bacteriana sin discriminación alguna de la diferencia de contenido lipoidal en las bacterias usadas y probablemente su efecto letal tan potente no tenga que ver con su capacidad para disolver lípidos; es sumamente interesante citar que Mitchell y Moile (24) han usado n-butanol para desintegrar la membrana citoplasmática de *Staphylococcus* sin afectar aparentemente la pared celular, probablemente los amílicos y el hexílico actúen de la misma manera desorganizando la integridad de la membrana citoplasmática. El cloroformo que es bien sabido que es un excelente solvente de lípidos aunque también un buen agente desnaturizador de proteínas y que podría esperarse tuviera alguna acción discriminatoria sobre gérmenes Gram positivos y Gram negativos, afecta por igual a ambos.

Por otro lado hubo reactivos que poco efecto tuvieron sobre la viabilidad bacteriana. Los más representativos de este segundo grupo fueron el alcohol metílico y el éter de petróleo. Es bien conocido el efecto coagulante de proteínas que tienen los alcoholes de bajo peso molecular, sin embargo a la concentración usada que es aproximadamente de un 20% este agente no afecta en forma seria la viabilidad bacteriana en el término de treinta minutos de contacto excepto en el caso de *Pseudomonas* cuya viabilidad descendía unas cuatro unidades logarítmicas.

El éter de petróleo que es uno de los mejores liposolventes utilizados, no afectó casi la viabilidad bacteriana. Es muy interesante el efecto de este par de reactivos ya que mientras que el alcohol metílico es un pobre solvente lipóideo, el éter de petróleo por el contrario es uno de los mejores agentes solventes de lípidos que se tienen a mano, sin embargo, su acción sobre la viabilidad bacteriana es casi nula. Estos hallazgos se oponen fuertemente a la idea originalmente planteada de que la extracción de lípidos de pared celular por disolventes adecuados afectaría la viabilidad de una manera proporcional al contenido de lípidos de aquella. Los resultados obtenidos con el grupo de alcoholes de cuatro, cinco y seis carbonos y el cloroformo con gran poder letal no discriminatorio son también evidencia positiva en contra de la hipótesis original.

En el grupo tercero o sea aquellas sustancias que sí ejercieron efecto discriminatorio respetando la viabilidad de los Gram positivos por tiempo más o menos prolongado y matando rápidamente a las bacterias Gram negativas podría dividirse en dos subgrupos. -El primero aquellos reactivos que inactivaron rápidamente a todas las cepas de las especies Gram negativas usadas y tuvieron poco efecto sobre las especies Gram positivas utilizadas, en este subgrupo consideraríamos al alcohol isopropílico, éter etílico y tetracloruro de carbono. En segundo subgrupo se colocarían aquellos reactivos que respetando la vida de todas las bacterias Gram positivas por períodos prolongados, inactivaron rápidamente a algunas de las especies Gram negativas pero no fueron letales para alguna de ellas. Entre éstas cabría mencionar a los alcoholes caprílico e isoecilico, al alcohol etílico y a la acetona.



Considerando al primer subgrupo que contiene aquellos reactivos que lograron una mejor reacción discriminadora vemos que el mejor de todos fue evidentemente el alcohol isopropílico siguiéndole en actividad el éter etílico y el tetracloruro de carbono, estas sustancias aunque bajan algo el recuento de las Gram positivas durante los primeros cinco minutos de contacto no se compara al fulminante efecto letal que tienen sobre las Gram negativas. Aquí de nuevo encontramos gran evidencia en contra de la hipótesis original, en el caso del alcohol isopropílico que siendo un pobre liposolvente en frío logra inactivar en un minuto a poblaciones bacterianas Gram negativas tan altas como  $1 \times 10^8$  por mililitro, lo que demuestra que el mecanismo de acción letal selectiva posiblemente sea distinta al originalmente supuesto. Por otro lado, los casos del éter etílico y tetracloruro de carbono que siendo buenos agentes liposolventes podría vincularse su excelente acción letal selectiva con la concentración diferente de lípidos en la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero la evidencia acumulada con los distintos alcoholes y algunos de los otros reactivos liposolventes indica que probablemente este no es el mecanismo de acción.

Del segundo subgrupo se podría ver la buena acción selectiva de el alcohol etílico excepto su imposibilidad a inactivar a *Escherichia coli* en la concentración usada. Los dos alcoholes de ocho carbonos, caprílico y su isómero el iso-octílico a pesar de inactivar fácilmente a *Proteus* y *Escherichia coli* sin afectar a los Gram positivas no son capaces de reducir considerablemente a *Pseudomonas aeruginosa*. Obsérvese el efecto en el caso de los alcoholes de cuatro, cinco y ocho carbonos es muy similar entre isómeros. Sólo queda por considerar el efecto de la acetona cuya acción discriminadora es muy discreta pues si bien respeta la viabilidad de las Gram positivas su efecto sobre las Gram negativas es realmente pobre requiriendo hasta 30 minutos para inactivar a algunas de ellas y en el caso de *Escherichia coli* todavía en este tiempo permanecen viables hasta cuatro unidades logarítmicas por mililitro.

Estudiando por separado la serie de alcoholes ensayados se puede observar que el alcohol metílico tiene poco efecto sobre la viabilidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas al pasar al alcohol etílico se observa que mientras que

ios Gram positivos permanecen prácticamente con la misma viabilidad que con el alcohol metílico, los Gram negativos descienden rápidamente en número excepto en el caso de *E. coli*. Al pasar al alcohol isopropílico confirmamos un efecto más decisivo sobre los Gram negativos que se vuelven no viables en el término de un minuto, simultáneamente se ve que aquí ya los Gram positivos son más afectados que en los otros dos alcoholes anteriores descendiendo su número de dos a cinco unidades logarítmicas durante los 5 primeros minutos. Tan pronto se pasa a los alcoholes de 4 y 5 carbonos se observa el mismo efecto fulminante sobre los Gram negativos, se puede observar que el efecto sobre los Gram positivos es también fuertemente letal en el mismo tiempo comparada con su relativa letalidad en el caso del isopropílico y de su negligible efecto en el caso del metílico y etílico. El efecto continúa muy semejante en el hexanol excepto para *Staph. aureus* el cual resiste su acción aunque descendiendo rápidamente en número hasta los 30 minutos. Al pasar a los alcoholes de ocho carbonos vemos que mientras el efecto letal rápido sobre *Proteus* y *E. coli* persiste *Pseudomonas* es muy poco afectada mientras que el efecto letal sobre los Gram positivos es de nuevo muy bajo. Desafortunadamente no se ensayaron alcoholes de 7 carbonos y no sería extraño al ensayarlos, que el comportamiento de viabilidad fuera muy semejante al que se obtiene con el alcohol isopropílico es decir un profundo efecto letal sobre los Gram negativos y la recuperación de la viabilidad de los Gram positivos que aunque seriamente afectados permanecen viables en regulares números durante todo el tiempo del experimento.

La comparación de efectos en el grupo de solventes orgánicos usados es imposible debido a que no hay ninguna relación química o de otro tipo cuando fueron escogidos para este estudio.

Los datos presentados hasta este momento hacen que la hipótesis antes de empezar el estudio se haga insostenible ya que se ha demostrado claramente que substancias que son buenos liposolventes como el éter de petróleo no afectan la viabilidad bacteriana ni de Gram positivos ni de Gram negativos o por el contrario la anulan sin discriminación del contenido lipoidal como en el caso del cloroformo; mientras que otros reactivos de los cuales se sabe son solventes de lípidos

muy pobres en frío tales como los alcoholes etílico e isopropílico inactivan fácilmente poblaciones Gram negativas y respetan la viabilidad de las Gram positivas. Alcoholes de 4, 5 y 6 carbonos que se supone tienen más afinidad lipoidal, destruyen la viabilidad bacteriana sin ninguna discriminación. Toda esta evidencia parece indicar que los lípidos de la pared celular no juegan un papel preponderante en la sobrevivencia discriminatoria que se obtuvo con algunos de los reactivos, tales como los alcoholes isopropílico, caprílico y iso-octílico así como con el éter etílico y el tetracloruro de carbono. Más bien deba buscarse su acción sobre la membrana citoplasmática, la cual como es sabido, está formada por quizá 2 a 4 mono-capas de lipoproteína en el cual el contenido de lípidos es de un 20 a 30% dependiendo del microorganismo un 50 a 60% de proteína. En vista de la labilidad de esta membrana, de su fragilidad a diferentes sustancias, alterando notablemente su permeabilidad y causando lesiones en su estructura lo cual permitiría el escape de sustancias importantes del citoplasma así como el ingreso a él de sustancias no selectivamente permeables que conduciría a un profundo intercambio líquido y a una gran alteración del equilibrio coloidal citoplasmático, no es extraño que la bacteria muriera durante esta explosión osmótica.

Las sustancias usadas son de suficiente escaso volumen molecular como para poder penetrar a través de los poros de la pared celular y llegar fácilmente a la altura de la membrana citoplasmática, sin embargo por qué unas sustancias no tienen efecto sobre la viabilidad y otras sí lo tienen, es un enigma. Una interesante correlación ha sido encontrada en el caso de los alcoholes, pero es difícil imaginar en el caso de los solventes. El estudio del poder desnaturalizador de proteínas de estas sustancias, el efecto sobre la permeabilidad de la membrana citoplasmática por estos reactivos condicionando la fuga de metabolitos importantes, la extracción cuantitativa de lípidos de bacterias íntegras y de protoplastos de las mismas, probablemente den alguna luz que permita conocer más a fondo el mecanismo de acción de estas sustancias sobre la viabilidad bacteriana.

A pesar de no tener una imagen clara del mecanismo de acción discriminatoria de la viabilidad bacteriana de estos reactivos y a pesar de que la hipótesis propuesta originalmente que se suponía podría ocurrir no se pudo demostrar, quedó en pie el fenómeno mismo; es decir, se logró encontrar reactivos que respetando

la viabilidad de las bacterias Gram positivas por un tiempo suficientemente largo, mientras que inactivan en cuestión de segundos a grandes poblaciones bacterianas Gram negativas. La evidencia encontrada y su evaluación demostraron que este fenómeno no ocurre por el mecanismo hipotéticamente propuesto sino que la acción discriminatoria está localizada en otras estructuras y la letalidad se debe quizá a otros mecanismos.

Sea cual fuere las implicaciones de lo anteriormente propuesto el efecto discriminatorio de estos solventes permite de una manera fácil separar bacterias Gram positivas de mezclas con Gram negativas inactivando a estas últimas. Las posibilidades de estos reactivos como agentes separatorios de sistemas bacterianos puede ser muy grande con muchas aplicaciones en la Bacteriología Médica, veterinaria, en la Bacteriología de suelos y en la Microbiología aplicada a la industria y en términos generales en cualquier caso que se desee separar bacterias Gram positivas de mezclas con Gram negativas. Es imperioso entonces, que se realice un trabajo de investigación encaminado a demostrar experimentalmente que algunos de los reactivos encontrados como discriminatorios para la viabilidad bacteriana en este estudio sean aplicados para resolver mezclas de bacterias Gram positivas y Gram negativas en distintas proporciones y sobre todo en proporciones desfavorables para el componente Gram positivo con el objeto de tener evidencia de laboratorio de que es posible que estos reactivos puedan separar tales mezclas.

# BIBLIOGRAFIA

- 1.—Chapman, G. B. and Hillier, J.: Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. *J. Bact.* 66: 363-372, 1953.
- 2.—Tomesik, J.: Bacterial capsules and their relation to the cell wall. *Bacterial Anatomy, The Sixth Symposium of the Society for General Microbiology.* 41-63, 1956. Cambridge University Press.
- 3.—Weibull, C.: The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozime, *J. Bact.* 66: 688-695, 1953.
- 4.—Salton, M. B. J.: Bacterial cell walls *Bacterial Anatomy, The Sixth Symposium of the Society for General Microbiology.* 81-107, 1956. Cambridge University Press.
- 5.—Mitchell, P. and Moyle, J.: The glycerophospho-protein complex envelope of *Micrococcus pyogenes*. *J. gen. Microbiol.* 5: 981, 1951.
- 6.—Mudd, S., Polevitzky, K., Anderson, T. F. and Chambers, L. A.: Bacterial morphology as shown by the electron microscope. II. The bacterial cell-wall in the Genus *Bacillus*. *J. Bact.* 42: 251, 1941.
- 7.—Newton, B. A.: The Polymyxins: their properties and mode of action. *Bact.* 20: 14-25, 1956.
- 8.—Robinow, C. F. and Murray, R. G. E.: The differentiation of cell wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of Gram-positive bacteria by selective staining. *Exp. Cell Res.* 4: 390, 1953.
- 9.—Salton, M. R. J.: The nature of the cell walls of some Gram-positive and Gram negative bacteria. *Biochim. biophys. Acta.* 9: 334, 1952.

- 10.—Mitchell, P.: Biochemical Cytology of Microorganisms Annual Review of Microbiology. 13: 407-434, 1959.
- 11.—Mudd, S.: Cytology of bacterial. Part I: The bacterial cell. Annual Review of Microbiology 8: 1-17, 1954.
- 12.—Knaysi, G.: Cytology of bacteria. Annual Review of Microbiology. 10: 253-270, 1956.
- 13.—Weibull, C.: Bacterial protoplasts. Annual Review of Microbiology 12: 1-21, 1958.
- 14.—Cummins, C. S.: Some observation on the nature of the antigens in the cell wall of *Corynebacterium diptheriae*. Brit. J. exp. Path. 35: 166, 1954.
- 15.—Cummins, C. S. and Harris, H.: Differences in cell-wall composition among Gram-positive cocci and bacilli. J. Gen. Microbiol. 13, 1955.
- 16.—Park, J. T. and Strominger, J. L. Mode of action of penicillin. Science. 125: 99-101, 1957.
- 17.—Houwink, A. L.: Biochim. et Biophys. Acta 10, 360 1953. Citado en 10. Mitchell, P.: Biochemical Cytology of Microorganisms. Annual Review of Microbiology. 13: 407-434, 1959.
- 18.—Vennes, J. W. and Gerhardt, P.: A serological analysis of isolated cellular structures in *Bacillus megaterium*. Science. 124: 535, 1957.
- 19.—Kornberg, H. L.: Aspects of terminal respiration in microorganisms. Annual Review of Microbiology 13: 49-72, 1959.
- 20.—Weibull, C.: Bacterial Protoplasts; their formation and characteristics Bacterial Anatomy. The Sixth Symposium of the Society for General Microbiology. 111-125, 1956.
- 21.—Robinow, C. F.: The chromatin bodies of bacteria. Bacterial Anatomy. The Sixth Symposium of the Society for General Microbiology. 181-201, 1956.
- 22.—De Lamater, E.: Cytology of Bacteria. Part II: The bacterial nucleus. Annual Review of Microbiology 8: 23-42, 1954.
- 23.—De Lamater, E. D.: Bacterial cromosomes and their mechanism of division. Bacterial Anatomy. The Sixth Symposium of the Society for General Microbiology. 215-255, 1956.
- 24.—Mitchell, P. and Moyle, J., J. Gen. Microbiol, 5: 981, 1951. Citado por Mitchell, P.: Biochemical Cytology. 13: 407-473, 1959.