

Acción antibiótica del veneno de serpiente

I. — Acción "in vitro" (*)

por Ig. Pirosky y F. J. Herrero

En este trabajo se comunican los resultados relativos al estudio de la propiedad del veneno de serpiente de inhibir el desarrollo de algunos microorganismos.

MATERIAL Y MÉTODO

Veneno. — Debido a la reducida cantidad disponible de los diferentes venenos se trabajó en particular con el de *Bothrops alternatus*, realizando sólo experimentos complementarios con los de *B. neuwiedii*, *Crótalus terrificus* y *Naia Naia*. Cada veneno provenía de una sola partida de veneno seco, finamente pulverizado y conservado al vacío. El mismo fué utilizado a la concentración de uno o dos por ciento, disuelto en solución cloruro sódica al 8,5 por mil, en caldo simple o en la mezcla buffer de fosfato de pH 7.— Cada solución era preparada media hora antes del ensayo experimental, empleándose la tal cual, clarificada por centrifugación o filtrada por pequeñas bujías Chamberland L3.

(*) Como antecedente de este trabajo citaremos la observación previa efectuada por una de los autores (F. H.). Durante el estudio realizado el año pasado en la Cátedra de Microbiología General de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Tucumán relativo al efecto de cationes sobre el desarrollo de bacterias y gelatinasas de veneno de serpiente, el comunicante solicitó a su colega Dr. J. J. Vidal Breard unos gránulos de veneno que colocó sobre la superficie del agar sembrado por dilución con *Esch. coli* y estafilococo, observando zonas de inhibición. En base a este fenómeno, Vidal Breard verificó el hecho con otras bacterias utilizando la técnica de los discos de papel. A este único resultado se limitó esta observación sin que se formulara, en ese entonces, tema de trabajo, ni plan alguno para futuras investigaciones. Comunicación verbal del Dr. F. Herrero).

Presentado en la reunión de comunicaciones del 26 de noviembre de 1946.

Antibiosis. — Se procedió del modo siguiente:

a) *Preparación del medio de cultivo:* En el interior de una placa de Petri estéril, se depositó 0,1 ml. de un cultivo en caldo de 18 horas de incubación en estufa a 37°C. de la bacteria en estudio; se añadió 12 ml. de agar al 1,5 por ciento, fundido y mantenido a la temperatura de 50°C., agitando la placa a fin de obtener un cultivo homogéneo. Una vez solidificado el agar y secado en estufa a 37°C., durante 20 minutos, se agregó el veneno.

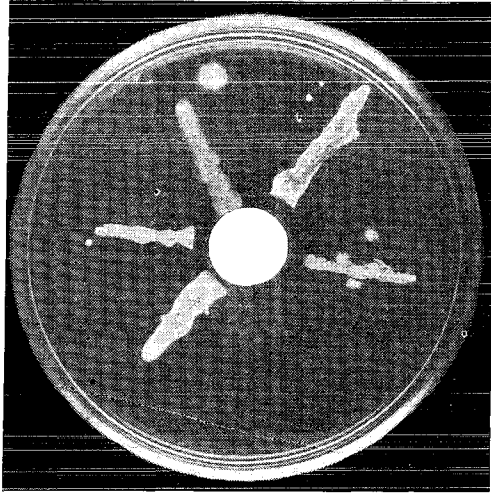
b) *Agregado del veneno:* Para ello se utilizó la técnica de GERSHENFELD e IBSEN (1) o la de los pequeños tubos o cilindros de vidrio empleados en la valoración de la penicilina. En el primer caso se colocó sobre la superficie del agar un disco de papel de filtro de 16 mm. de diámetro, previamente esterilizado, vertiendo sobre el mismo 0,05 ml. de la solución de veneno. En la segunda de las técnicas mencionadas, el cilindro fué colocado sobre el agar a la manera utilizada para valorar la penicilina, depositándose en su interior igual volumen de veneno, esto es 0,05 ml. Incubación en estufa a 37°C. durante 24 horas.

Selección de cepas sensibles al veneno. — A fin de disponer de un indicador de la mayor sensibilidad para la antibiosis, se examinó el efecto del veneno de *B. alternatus* sobre un gran número de cepas. Fueron aisladas unas trescientas cepas no identificadas, provenientes de la tierra, aire, leche, piel. La selección con respecto a la sensibilidad al veneno fué realizada del modo siguiente: Se distribuyeron 15 ml. de agar al 2 por ciento en placas de Petri estériles. Una vez solidificado y secado en estufa —20 minutos a 37° C.— se colocó sobre el centro de la superficie del agar un disco de papel. De cada cepa, cultivada por separado, a partir de colonias, sobre agar estéril, se hizo una toma con aguja, con la cual se trazó un radio en la superficie del agar, desde la periferia de la placa hacia el centro, hasta casi tocar el borde del disco. Luego de efectuados ocho o diez trazos correspondientes a otras tantas cepas, se vertió sobre el disco de papel 0,05 ml de la solución de veneno. Incubación a 37°C. durante 24 horas, a cuyo término se realizaba la lectura. En cada placa se trazaba una estría con estafilococo hemolítico para control de la acción del veneno. Se observará que el cultivo obtenido en cada trazo se acerca a desigual distancia del borde del disco de papel, según la mayor o menor sensibilidad de la bacteria al veneno. (Fotografía N° 1).

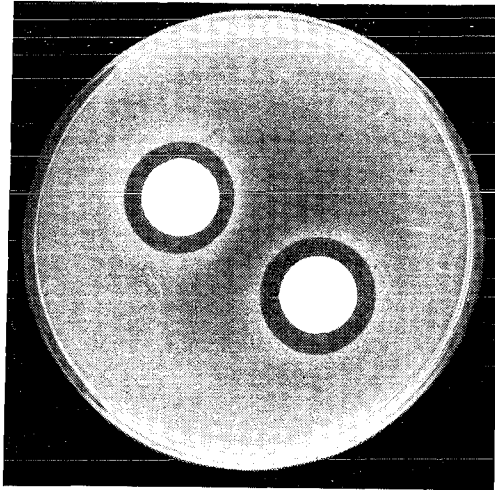
PARTE EXPERIMENTAL

A. Efecto del veneno sobre el desarrollo de bacterias patógenas y saprófitas.

1. Los primeros ensayos fueron efectuados con una cepa de estafilococo hemolítico. La acción de un miligramo de *B. alternatus* y de *Naia Naia* eran similares y del tipo que muestran las fotografías Nos. 2, 3 y 4



Fotografía N° 1. — Selección de cepas sensibles a la acción del veneno de serpiente. Placa de Petri con 12 ml. de agar al 2 por ciento. Discos de papel colocados sobre la superficie del agar. Siembra por trazo de las bacterias en estudio. La solución de veneno se colocó sobre los discos de papel.



Fotografía N° 2. — Acción antibiótica de un milígramo de los venenos de *Naia Naia* y *B. alternatus*. Cultivo en placa de Petri por dilución en agar al 1,5 por ciento del *Micrococcus* N° 25.

PROTOCOLO Nº 2

Siembra por dilución en agar al 1.5 por ciento, en placas de Petri individuales para cada cepa. Discos por duplicado con igual dosis de veneno. Solución al uno por ciento de *B. alternatus*: 0,05 ml. sobre cada disco. Incubación a 37°C., 24 horas.

BACTERIAS	Diámetro del halo de inhibición en milímetros
Estafilococo hemolítico	19
» "209"	17
<i>C. diphtheriae</i> - cepa toxigénica	25
<i>B. anthracis</i> - avirulento - no esporulado	22
<i>Brucella abortus</i>	20 (parcial)
<i>Esch. coli</i>	18
<i>Shigella dysenteriae</i>	23
Flexner	trazas
Sonne	trazas
Eberth "H"	trazas
Eberth "O"	0
Paratífus A	17
» B - "H"	trazas
» B - "O"	17
Estreptococo hemolítico	trazas
» 116	0
» 1070	0
Neumococo	0

Para la cepa de *Brucella abortus* examinada, se observa una zona de inhibición, pero sólo con un 50 % de reducción en el desarrollo. Entre los disentericos, sólo el *B. Shiga* es inhibido. Esta sensibilidad del *B. Shiga* es objeto de un estudio particular.

3b. *Patógenos anaerobios.* — El veneno de *B. alternatus* carece de efecto inhibitorio sobre el grupo de los *clostridium* examinados. (*Cl. tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. séptico*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum* y *Cl. sordellii*). Los ensayos fueron realizados en agar el 2 %, distribuido en tubos de hemolisis. Columna de agar de 30 mm. de altura. El medio de cultivo estéril, es sometido a la ebullición durante 15 minutos y luego mantenido a 50°C. de temperatura. Se añade a cada tubo 0,2 ml. de una solución de veneno de *B. alternatus* al 2 %, filtrada por bujía Chamberland L3. Se siembra en profundidad, a partir de un cultivo de 18 horas en Tarozzi. Para cada cepa se sembró también un tubo sin veneno. Incubación en estufa a 37°C. durante cinco días. Como ya se ha dicho, el veneno, en este caso, carece de efecto inhibitorio.

3c. *Bacilo de la tuberculosis.* — En diferentes tubos con el medio de Arena al verde de malaquita se siembran por escurrimiento

bacilos tipo humano, bovino y aviar. El veneno de *B. alternatus* en solución al 2 %, filtrado por bujía Chamberland L3, añadido en la cantidad de 0,05 ml. sobre la superficie del medio previamente sembrado, impide el desarrollo de las cepas tipo humano y bovino y no tiene efecto sobre el aviar. Hacemos notar que el medio de cultivo en presencia del veneno, con o sin siembra previa, experimenta modificaciones en su aspecto físico, a saber: cambio de color hacia un verde más intenso y ligeras fisuras. Con todo, la reacción del medio, como la del agua de condensación con respecto a la del medio original, no varía prácticamente, aun después de 20 días de incubación en estufa a 37°C. (pH = 6,9). Es probable la intervención de un mecanismo óxido-reductor que se tratará de identificar.

En las condiciones anteriores el mismo veneno impide también el desarrollo de los bacilos para tuberculosos. En cambio en el medio líquido de Sauton, carece de efecto. Esta diferente acción del veneno en medio sólido será considerada más adelante.

B. Estudio de algunos aspectos de la acción antibiótica del veneno de serpiente.

1. *Acción bacteriostática y bactericida.* — Para una misma cepa se obtiene efecto bactericida o bacteriostático según que el ensayo con veneno se efectúe en medio sólido o líquido. Este efecto se observa netamente con el *Micrococcus* N° 25.

a. *Efecto del veneno en medio sólido.* — En los numerosos ensayos efectuados con la cepa *Micrococcus* N° 25, no se ha podido recuperar dicha bacteria de la zona de inhibición producida por el veneno. Queda por demostrar si esta acción antibiótica se realiza directamente sobre la bacteria o por intermedio de los elementos del medio de cultivo.

b. *Efecto del veneno en medio líquido.* Veneno de *B. alternatus* disuelto al 2 % en caldo simple, filtrado por bujía Chamberland L3. A partir de la solución original se efectúan una serie de diluciones al medio con caldo simple y se distribuyen 3 ml. de cada solución en tubos de ensayo estériles. Cada tubo es sembrado con 0,05 ml. de un cultivo en caldo de 18 horas de incubación a 37°C. del *Micrococcus* N° 25. Protocolo N° 3.

La acción bacteriostática del veneno de *B. alternatus* es evidente durante las primeras 24 horas de incubación; luego el desarrollo es progresivo a partir de las menores concentraciones, hasta alcanzar a las 72 horas un cultivo positivo aun a la máxima concentración de veneno.

Ahora bien, el veneno no se inactiva durante su permanencia en la estufa a 37°C. En efecto, el cultivo obtenido en el tubo N° 1 del sistema precedente (protocolo N° 3) es centrifugado después de haber permanecido cinco días en la estufa a 37°C. Se obtiene así: a) un sobrenadante y b) un depósito de bacterias. Este último, previo

PROTOCOLO N° 3

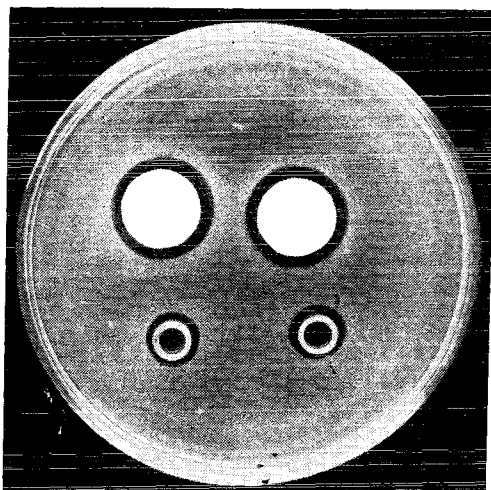
Efecto del veneno de *B. alternatus* sobre *Micrococcus* N° 25. Veneno disuelto en caldo simple. Concentración al 2 por ciento, filtrado por bujía Chamberland L3. Diluciones en caldo simple.

Tubo N.º	Volumen del medio ml.	Dosis de veneno por ml. en gamas	Cultivo Micr. 25 ml.	Resultado horas		
				24	48	72
1	3	20.000	0 05	(—)	(—)	+
2	»	10.000	»	(—)	(—)	++
3	»	5.000	»	(—)	(—)	++
4	»	2.500	»	(—)	(—)	+++
5	»	1.250	»	(—)	(—)	+++
6	»	625	»	(—)	+	++
7	»	312	»	(—)	+	++
8	»	156	»	(—)	+	++
9	»	78	»	±	+	++
10	»	—	»	+++	+++	+++
11	»	20.000	—	(—)	(—)	(—)

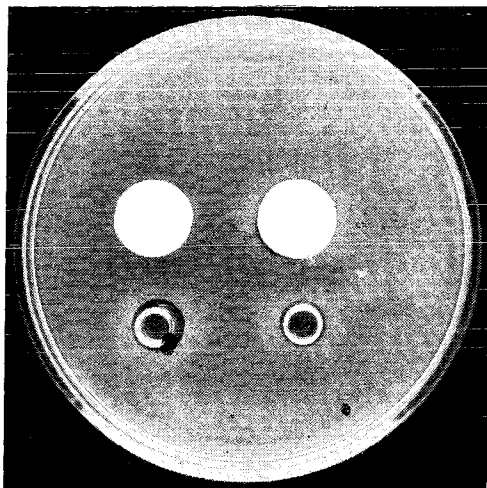
lavado por centrifugación y suspendido en solución fisiológica, es sembrado por dilución en agar en placas de Petri. Sobre la superficie de dicho agar se deposita por intermedio de un disco de papel, 0,05 ml. del sobrenadante a). Después de 24 horas de incubación en estufa a 37°C. se observa en los contornos del disco, una zona de inhibición de 23 mm. de diámetro, tal como lo muestran las placas de control, realizadas con veneno fresco sobre cultivo de 18 horas de incubación.

Es decir, que la misma solución de caldo veneno, que ha permitido un desarrollo microbiano en medio líquido, muestra efecto bactericida cuando, una vez separada la suspensión bacteriana que ha desarrollado en su interior, se la traspasa a un medio sólido. La acción del veneno fresco sobre la suspensión b) o la del líquido sobrenadante a) sobre un cultivo fresco, es del mismo orden que el obtenido en la placa control.

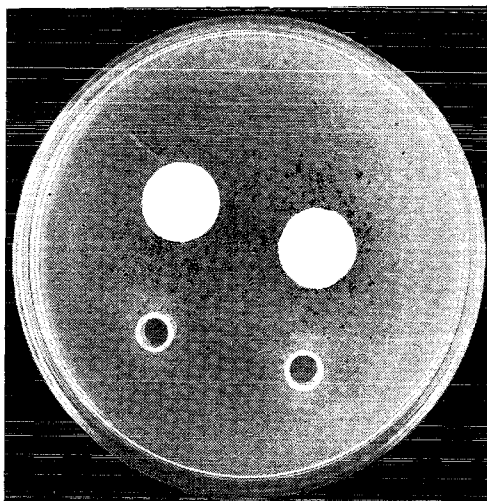
2. *Relación entre concentración de veneno y el diámetro de la zona de inhibición.* — En las condiciones experimentales descritas no hemos encontrado una relación definida entre concentración de veneno y el diámetro del halo de inhibición producido por el mismo. (Ver fotografías Nos. 5, 6 y 7. Protocolo N° 4).



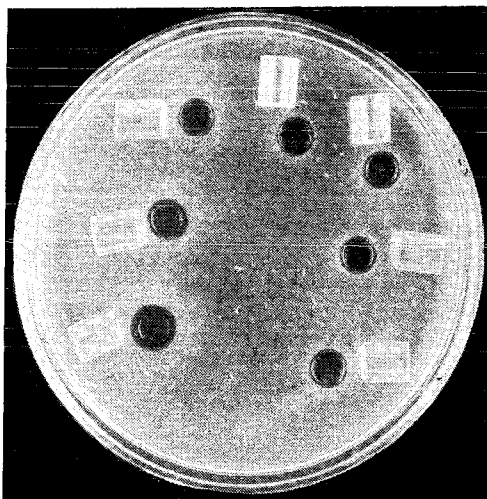
Fotografías Nos. 5, 6 y 7. — Efecto antibiótico de dosis decrecientes de veneno de *B. alternatus*. Valor comparativo de los métodos de discos de papel y cilindro. Fotografía Nº 5: representa la acción de dos y mil gamas de veneno.



Fotografía Nº 6. — El cilindro de la izquierda con 31,5 gamas de veneno muestra una zona de inhibición mayor que su diámetro externo; en cambio el cilindro de la derecha con 15,7 gamas, muestra sólo inhibición dentro del área comprendida por la base del mismo. En los discos de papel, con las dosis de veneno ya indicadas, no se observa efecto alguno.



Fotografía N° 7. — El cilindro de la izquierda con 7,8 gamas de veneno muestra definida inhibición dentro del área del mismo. El de la derecha con 3,9 gamas, ya presenta desarrollo. Los discos de papel no muestran efecto apreciable.



Fotografía N° 8. — Cultivo del *Micrococcus* 25 en dilución en agar al 1,5 % en placas de Petri. Neutralización del efecto antibiótico de una dosis constante de veneno (50 gamas) por dosis crecientes de suero. Se han dispuesto siete cilindros conteniendo cada uno 0,05 ml. de cada mezcla veneno-suero. La menor dosis de suero corresponde al primer cilindro de la izquierda y la mayor al primer cilindro de la derecha. En este último ya se observa desarrollo. (Los cilindros han sido volcados para mostrar con más claridad las diferencias.

PROTOCOLO N° 4

Sobre la superficie de cultivo de una serie de placas de Petri sembradas por dilución en agar al 1,5 por ciento con el *Micrococcus* N° 25, se dispusieron un disco de papel y un cilindro. Veneno de *B. alternatus* al 4 por ciento en solución fisiológica, centrifugado 5 minutos a 1.500 r.p.m. A partir de la solución original se hicieron diluciones al medio en una serie de 11 tubos de ensayo. De cada tubo se agregó 0,05 ml. al disco y al cilindro de una misma placa, correspondiendo así una placa a cada concentración de veneno.

Placa N.º	Dosis de veneno en gamas	Diámetro del halo de inhibición en mm.	
		disco	cilindro
1	2000	24	15
2	1000	23	12,5
3	500	23	12
4	250	23	12
5	125	23	11
6	62,5	22	11
7	31,5	0	10,5
8	15,7	0	I. d.
9	7,8	0	I. d.
10	3,9	0	0
11	2,0	0	0
12	Soluc. fisiológica	0	0

0: no hay inhibición; I. d.: inhibición total pero solo dentro del área del cilindro.

3. *Dosis mínima antibiótica.* — La difusión del veneno en el agar no se opera de modo regular, probablemente por la naturaleza misma del producto. Ello se observa con mayor intensidad, cuando se examinan, en este sentido, mezclas de veneno y suero. Por ello hemos considerado posible expresar la actividad del veneno en su límite, aceptando para ello la menor dosis que provoca inhibición definida en la zona de agar, comprendida por el círculo interior de la base del cilindro. Utilizando cinco cilindros por dosis para una misma placa, se obtienen resultados concordantes. De este modo la dosis mínima antibiótica es de 7,8 gamas para *Micrococcus* N° 25, de 4 gamas para la cepa N° 4 y de 15 gamas para el estafilococo hemolítico.

4. *Sensibilidad térmica de los factores antibiótico y letal.* — Los factores antibiótico y letal del veneno de *B. alternatus* pueden diferenciarse en función de la temperatura. En efecto, a 65°C., 30 minutos, quedan inalterados ambos factores; a 75°C., 3 minutos, se destruyen los dos; en cambio a 68°C., 3 minutos, el ratón blanco soporta 20 dosis mortales y en cambio el efecto antibiótico, aunque disminuido se conserva aun después de permanecer 20 minutos a dicha temperatura. (Ver protocolo N° 5).

PROTOCOLO Nº 5

Veneno de *B. alternatus*, 80 mgrs., disuelto en 20 ml. de solución fisiológica. Centrifugado 5 minutos a 1.500 r.p.m. Se distribuyen en 2 ml., en tantos tubos como temperaturas y tiempos se consideraran. Se calentó en baño de agua, enfriándose cada tubo bajo agua corriente. De cada muestra se dispuso 0,05 ml. para la prueba de antibiosis (método del cilindro, cepa microc. 25, cultivo por dilución en agar al 1,5 por ciento en placas de Petri) y 0,05 ml. contenido en un volumen de 0,5 ml. de fisiológica para ser inoculados al ratón blanco de 20 gramos por vía venosa. 0,05 ml. de la solución original de veneno = 20₀ gamas = 20 dosis mínimas mortales para el ratón.

Temperatura	Tiempo en minutos	Acción anti-biótica - diámetro en mm.	Número de ratones muertos
			Total de inyectados
65.° C	60	12	3/3
68	3	10	1/3
	5	9	0/3
	10	7,5	0/3
	15	7,0	0/3
	20	7,0	0/3
	30	0,0	0/3
71	3	9,0	1/3
	5	8,0	0/3
	10	0,0	0/3
	15	0,0	0/3
75	3	0,0	0/3
	5	0,0	0/3
	—	12,0	3/3

5. *Neutralización de la acción antibiótica del veneno por el suero antiofídico.* — Al examinar la neutralización del poder antibiótico del veneno de serpiente por el suero antiofídico se verifican los dos hechos siguientes:

- a) Ausencia de especificidad entre diferentes venenos de serpientes.
- b) Neutralización específica por el suero antiofídico.

a. El efecto antibiótico es una propiedad común, no específica, de los diferentes venenos que hemos tenido ocasión de examinar (*Naia Naia*, *B. alternatus*). Un suero antiofídico monovalente, que con respecto la factor letal protege al ratón blanco contra el veneno homólogo, neutraliza el efecto antibiótico de dos venenos heterólogos. Así, el suero polivalente del Instituto Malbrán (anti *Crótalus terrificus*, anti *B. alternatus* y anti *B. newwedii*) que no protege al ratón blanco contra una dosis mínima mortal de veneno de cobra, neutraliza prácticamente por igual el efecto antibiótico de los venenos de *B. alternatus* y *Naia Naia*.

b. La acción antibiótica de los diferentes venenos estudiados es neutralizada sólo por el suero antiofídico. Ninguno de los otros sueros o antitoxinas ensayadas (normal, antipestoso, anticarbuncloso, antitoxinas diftérica, tetánica, etc.) modifican dicha actividad.

Hemos tratado de investigar para el caso de un sistema antígeno-anticuerpo homólogo, la naturaleza de la combinación factor antibiótico y suero antiofídico, así como la posibilidad de establecer una relación vivo|vitro entre la neutralización de la acción letal y del factor antibiótico. El problema queda aun por resolver y publicamos a título de ilustración uno de los protocolos realizados. Protocolo N° 6.

El modus operandi sería el siguiente:

Determinar el valor de protección "vivo" en base al método de Banic y Ljubatic modificado por Ipsen. (2).

Determinar para una misma solución, el límite de neutralización del factor antibiótico y de la actividad letal, mediante mezclas de veneno y suero, a veneno constante.

PROTOCOLO N° 6

Veneno de *B. alternatus* al 2 por ciento en solución fisiológica, centrifugado 5 minutos a 1.500 r.p.m. Dosis de veneno por cilindro o por ratón = 0,0025 ml. = 50 gamas de veneno. Dosis mínima mortal 50 = 12 gamas.

DOSIS			VOLUMEN x 20 dosis (*)			RESULTADOS		
Veneno ml.	Suero ml.	Fisiológica	Veneno	Suero	Fisiológica	Cilindros (**)		Ratón (:)
						1-2-3-4	Promedio	
0,0025	0,039		0,05	0,78	0,17	0-0-0-0	0	0/5
»	0,033		»	0,66	0,29	0-0-0-0	0	0/5
»	0,028		»	0,56	0,39	0-0-0-0	0	0/5
»	0,024		»	0,48	0,47	0 0 0-0	0	0/5
»	0,020		»	0,40	0,55	0-0-0-0	0	1/5
»	0,016		»	0,32	0,63	0-0-0-0	0	5/5
»	0,013		»	0,26	0,69	0-0-0-0	0	5/5
»	0,0105		»	0,21	0,74	I-I-I-I	I	5/5
»	0,008		»	0,16	0,79	I-I-I-I	I	5/5
»	0,0064		»	0,128	0,82	I-I-I-I	I	5/5
»	—		»	—	0,95	I-I-I-I	I	5/5
—	0,025		—	0,50	0,50	0-0-0-0	0	

(**) 0,05 ml. de cada mezcla por cilindro; cuatro cilindros por dosis y por placa de Petri; siembra por dilución en agar al 1,5 % del micrococus N.º 25; 0; no hay inhibición; I: inhibición.

(:) 0,5 ml. por ratón vía intravenosa; obtenida con 0,4 ml. de la solución (*) = ocho dosis y completada a 4 ml.; (+/T) = muerte sobre total de ratones inyectados.

En estas condiciones se observa que el valor de protección estaría comprendido entre 0,016 y 0,020 ml. de suero y el valor de neutralización de la antibiosis estaría entre 0,013 y 0,0105 del mismo suero. El sistema tiene el inconveniente de contener por unidad ración pocas dosis mínimas mortales, pero ello queda subsanado si se tiene en cuenta sólo el valor "vivo" obtenido por el método de Banic.

6. *Antibiosis y bacteriolisis*. — NOC (3) ha demostrado que si se pone en contacto veneno de cobra disuelto al uno por ciento en solución cloruro sódica al 8,5 por mil, filtrado por bujía, en partes iguales con una suspensión de bacterias sensibles, se provoca la lisis de las mismas. Este fenómeno era manifiesto con el estafilococo aureo, con la bacteridia carbunclosa no esporulada, el bacilo diftérico; era menso neto con la bacteria coli y tífica y nulo con el bacilo tuberculoso.

Por nuestra parte estudiamos paralelamente la acción antibiótica y bacteriolítica de los venenos de *Naia Naia* y *B. alternatus*. Protocolo N° 7.

PROTOCOLO N° 7

Soluciones de veneno de *Naia Naia* y *B. alternatus* al 2 por ciento en solución fisiológica.

Antibiosis: Siembra por dilución en agar al 1,5 por ciento en placa de Petri de un cultivo de 18 horas en caldo simple. Discos de papel por duplicado en cada placa. Una cepa por placa. Un volumen de 0,05 ml. de la solución de cada veneno sobre cada disco de la misma placa.

Lisis: Un volumen de 0,25 ml. de la solución de veneno + 0,25 del cultivo utilizado para la antibiosis.

Control: Un volumen de 0,25 ml. de solución fisiológica + 0,25 ml. del mismo cultivo.

Lectura: Después de 24 horas a 37°C. en estufa.

BACTERIAS	Antibiosis diámetro - mm.		Lisis		Control
	<i>Naia Naia</i>	<i>B. aller.</i>	<i>Naia Naia</i>	<i>B. aller.</i>	
<i>Micrococcus</i> 25	19	20	0	0 (*)	0
Cepa 14	27	28	0	0	0
<i>C. diphtheriae</i>	25	25	0	0	0
Estafilococo aureo	19	19	0	0	0
<i>Shiglela disenteriae</i>	20	19	0	0 (*)	0
Flexner	trazas	0	1/2 lisis	0 (*)	0
Sonne	trazas	trazas	0	0	0
Paratífus A	trazas	17	0	0	0
» B "H"	trazas	trazas	0	0	0
» B "O"	17	17	0	0	0
Eberth "O"	trazas	trazas	0	0 (*)	0
» "H"	trazas	trazas	0	0	0

O: Ausencia de lisis; (*) se observa aglutinación.

Como se desprende del protocolo anterior y circunscribiéndonos a las condiciones experimentales y de material de este trabajo, no

existiría paralelismo entre las acciones antibióticas y bacteriolíticas de estos venenos.

Addendum. — No se ha observado efecto antibiótico con el veneno de *Latrodectus mactans* (araña del lino).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El veneno de algunas serpientes (*Naia Naia*, *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedii* y *Cróталus terrificus*) ejerce efecto inhibidor sobre el desarrollo de ciertas bacterias saprófitas o patógenas aerobias. En cambio no inhibe el desarrollo de los *clostridium*.

2. El veneno de *B. alternatus* tiene, para una misma cepa, efecto bactericida en medio sólido y bacteriostático en medio líquido.

3. No se ha encontrado relación entre concentración de veneno y el diámetro de la zona de inhibición. Es posible expresar la actividad del veneno por la dosis mínima antibiótica. Esta es, en general del orden de 10 gamas.

4. La actividad letal y el factor antibiótico del veneno de *B. alternatus* se diferencian por una relativa desigual sensibilidad térmica.

5. El factor antibiótico es común a los diferentes venenos estudiados y es neutralizado por un suero antiofídico heterólogo.

6. El factor antibiótico del veneno de *B. alternatus* es neutralizado específicamente por el suero antiofídico.

7. En las condiciones experimentales descritas no se ha encontrado paralelismo entre antibiosis y bacteriolisis.

—0—

Agradecemos al Doctor Andrés R. Arena, Director del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán", el habernos facilitado los medios de cultivo y los diversos tipos de bacilos tuberculosos, al Dr. Cetrángolo por la ayuda prestada y a los Dres. H. Sosa, R. Quiroga y N. D'Alessandro por las cepas que nos han facilitado.

BIBLIOGRAFÍA

1. GERSHENFELD L. e IBSEN M. — Am. J. Pharm., **114**, 281, 1942.
2. BANIC M. y LJUBATIC T. — Zeitschr. f. Hyg., **120**, 390, 1938 y Bull. Org. Hyg., **7**, 848, 1938.
3. Noc J. — Ann. Inst. Pasteur., **19**, 209, 1905.