

Estudio de la biología de *Vahlkampfia debilis*, Jollos, 1917

Y FENOMENOS DE LISIS BLASTOMICETICA Y BACTERIANA SEMEJANTES A LA BACTERIOFÁGICA

(Con 7 figuras)

Por PABLO NEGRONI e IDA FISCHER

A mediados del mes de febrero del corriente año, uno de nosotros, recogió de la planta una manzana en estado de descomposición que llevó al laboratorio y como el examen microscópico de ese material revelara la existencia de numerosas levaduras, se sembró en tubos de agar-miel, previo tratamiento por una solución de ácido cítrico para eliminar la contaminación bacteriana.

Estos tubos sembrados permanecieron a la temperatura del laboratorio y al cabo de varios días desarrolló una capa húmeda brillante y de consistencia cremosa cuyo examen microscópico nos permitió apreciar, además de la presencia de los elementos brotantes que constituían la masa del cultivo, células más grandes, subglobulosas, de membrana algo más gruesa y sin brotes, que por su aspecto nos hizo pensar en elementos de *Prototheca*. No observamos sin embargo en ellas la formación de autosporos.

Los aislamientos en cajas de PETRI con agar-glucosado para obtener este último organismo al estado de pureza fueron infructuosos; todas las colonias desarrolladas eran de levaduras. Pocos días después notamos que los bordes de muchas colonias se aclaraban y este fenómeno progresaba hacia el centro, hasta aclararlas completamente en pocos días. Estábamos frente a un fenómeno absolutamente comparable al de la bacteriofagia.

Tomamos material de estas colonias lisadas, lo suspendimos en una gotita de solución fisiológica y lo examinamos con el microscopio montándolo entre porta y cubre-objeto y, cuál no sería nuestra sorpresa al comprobar la presencia de células grandes, sin membrana,

con diferenciación nítida de ecto y endoplasma y que emitían pseudopodios, conteniendo algunas de ellas elementos de levaduras en su interior. La lisis de las colonias de levadura era producida por una *Amoeba* que las fagocitaba y digería, reproduciendo el fenómeno de la lisis bacteriana por ultravirus.

Nos apasionó este fenómeno tan interesante que pudimos seguir paso a paso bajo el microscopio y, aunque no somos protozoólogos, nos decidimos a estudiarlo, solamente por suatingencia con los hongos, que es el tema de nuestra especialidad.

Nos convencimos pues que lo que primero habíamos interpretado como células probables de *Prototheca* eran los quistes de nuestra *Amoeba*, cuyo proceso de invasión de las colonias de levaduras vamos a detallar ahora.

El 5 de marzo sembramos cajas de PETRI con agar-glucosado que fueron incubadas a 30° de temperatura. Al cabo de 18 hs. había ya desarrollo de colonias de levadura que eran aún pequeñas y cuyo examen microscópico reveló, además de las células brotantes de las levaduras, la presencia de muy escasos quistes de *Amoeba*.

A las 40 hs. de incubación contamos en una de las cajas de PETRI 111 colonias de la levadura, 6 de las cuales comenzaban a lisarse por sus bordes. La otra caja de PETRI contenía numerosas colonias y muchas de ellas estaban ya en un estado avanzado de lisis, la cual, para comodidad de su estudio, vamos a dividir en tres fases que representan estadios sucesivos de la invasión amebiana.

Las colonias intactas de la levadura miden al cabo de 40 hs. de incubación a 30° unos 3 mm de diámetro, son circulares, blancas, mates, planas y de bordes irregulares.

1ª fase, de invasión: el borde de la colonia está parcial o totalmente formado por un halo más claro cuyo examen microscópico revela la presencia de numerosas formas vegetativas de la *Amoeba* en actividad (con pseudopodios) y llenas de células de la levadura, formas esféricas en reposo y quistes. Existe además abundante detritus de levaduras formado por membranas vacías y células vivas de este microorganismo.

En la preparación con material tomado del centro normal de la colonia sólo observamos, después de recorrer varios campos microscópicos, una forma esférica en reposo de la *Amoeba* conteniendo numerosas células brotantes, unas vivas al parecer y reducidas otras a la membrana, como sombras, por el estado avanzado de la digestión.

2ª fase: Las colonias presentan en este estadio un centro blanco y opaco como de 1 mm de diámetro y un borde claro como de 2 mm

uniforme o formado por dos bandas de diferente opacidad, siendo más clara la interna en contacto con el núcleo central. La zona más clara interna tiene un diámetro uniforme, no así la externa que en algunas colonias se adelgaza, en forma de media luna, en una parte de su contorno. Entre estas dos zonas existe a veces un espacio más claro aún, lacunar. Más allá de las colonias, pero cerca de sus bordes, han crecido pequeñas colonias secundarias de la levadura formando una areola incompleta, generalmente. Creemos que resultan del desarrollo de las células que acarrean las *Amoebas* en su migración.

El examen microscópico revela en esta fase las siguientes particularidades: En la zona o núcleo central: células de la levadura, muchas membranas celulares vacías, numerosas formas vegetativas grandes y diminutas de la *Amoeba* y algunos quistes. Las *Amoebas* vegetativas están repletas de levaduras, y son muy vacuolisadas y activas. En la zona clara que le sigue sólo notamos detritus de levaduras (membranas vacías), numerosos quistes de la *Amoeba*, muchos de los cuales están arrugados como marchitos y raras formas vegetativas.

En la zona externa observamos levaduras sanas, numerosos quistes normales, otros como marchitos y algunas formas vegetativas de la *Amoeba*.

3ª fase o final: El núcleo central opaco de la colonia termina por desaparecer y es reemplazado por un espacio hueco, claro. La zona periférica se ha aclarado nuevamente y es reemplazada por una orla de granulaciones claras, formando uno o varios círculos concéntricos. Más allá del límite de las colonias se extiende una ligera opacidad difusa con el aspecto del vaho condensado, que al examinarla con una lente se presenta formada por lagunas granulosas irregulares y anastomosadas.

Los exámenes microscópicos revelan en la parte central de las colonias sombras de levaduras y *Amoebas* vegetativas. En la zona media se agregan a los elementos precedentes algunos quistes y en la zona periférica de las colonias, abundantes *Amoebas* vegetativas activas, en reposo y quistes (más o menos en igual proporción) y levaduras sanas.

El vaho lacunar que rodea a las colonias está constituido exclusivamente por *Amoebas* vegetativas granulosas y sin inclusiones.

En resumen, el fenómeno de lisis de las colonias de nuestra levadura empieza en los bordes y progresa hacia el centro, y se debe a la fagocitosis y digestión de sus elementos por una *Amoeba*. Al período de actividad y de ingestión de la *Amoeba* sigue otro de re-

poso y de enquistamiento en el cual la levadura vuelve a vegetar y, tal vez por las radiaciones mitogenéticas que éstas emiten o por otros estímulos, los quistes germinan originando nuevas formas vegetativas activas. Así se explica cómo las zonas de las colonias de la levadura, primitivamente claras y lisadas, se tornan más opacas y con levaduras vivas y este fenómeno parece repetirse varias veces antes de que se agoten las substancias nutritivas del medio de cultivo, para las levaduras.

En agar-sangre de conejo al 5 % (en cajas de PETRI): Al cabo de 20 hs. de incubación a 30° hay desarrollo de algunas colonias de levaduras sin infección amebiana.

A las 48 hs. se observan ya colonias parasitadas cuyo examen microscópico revela formas quísticas de la *Amoeba* y otras en reposo, globulosas, grandes y repletas de levaduras, pero sin glóbulos rojos.

Al cabo de una semana el cultivo presenta el mismo aspecto que en el agar-glucosado.

Las siembras en agar-mosto y en agar-miel reprodujeron el mismo aspecto.

En el mosto de cerveza líquido: formación de una película a los dos días de incubación a 30°, cuyo examen microscópico revela células de la levadura y formas vegetativas de la *Amoeba*.

En el medio líquido de Besredka sembrado el 25 de marzo con material de un cultivo en agar-mosto, observamos, al cabo de 11 días, formación de un depósito cuyo examen microscópico nos permitió apreciar la existencia de levaduras y quistes de *Amoeba*. El medio permaneció límpido.

TENTATIVAS PARA OBTENER CULTIVOS PUROS DE LA « AMOEBIA »

Habiendo observado que el halo lacunar que se extiende en una zona de varios milímetros más allá del límite de las colonias parasitadas está constituido únicamente por elementos vegetativos de la *Amoeba*, cortamos a ese nivel trocitos de agar sembrándolos en los medios que a continuación se detallan, tratando de encontrar uno, que fuera desfavorable para el crecimiento de la levadura y permitiera en cambio el de la *Amoeba*.

Medio nº 1: 4 cm³ de agua destilada estéril más 0,25 cm³ de una solución de fosfato dipotásico al 1/20, más 0,50 cm³ de una suspensión en solución fisiológica de la levadura muerta por calentamiento a 60° durante media hora (40.000 células por cm³).

Medio nº 2: Con la misma composición que el anterior, más 0,25 cm³ de suero normal de caballo.

Medio n.º 3: 4 cm³ de agua destilada estéril, más 0,50 cm³ de la suspensión de levadura muerta.

Medio n.º 4: Mosto de cerveza líquido de pH 7, más 0,50 cm³ de la suspensión de levadura muerta por el calor.

Todos estos tubos fueron sembrados con material de un cultivo en agar-glucosado de 48 hs. de incubación a 30°.

Medio n.º 5: Mosto de cerveza líquido más 0,50 cm³ de la suspensión de levadura muerta, sembrando con material de un cultivo de 11 días en caja de PETRI con agar-glucosado.

En todos estos medios observamos, ya a las 24 hs. de incubación a 30°, presencia de *Amoebas* vegetativas y quísticas; mucho más numerosas en el medio n.º 2, pero en todos desarrolló también la levadura (muy activamente en los medios con mosto de cerveza).

Tampoco obtuvimos resultado sembrando con material rico en *Amoebas* el mosto líquido de cerveza, vacunado por cultivos repetidos de la levadura, filtrando cada vez por papel primero y luego por bujía.

En agua corriente agarizada al 1,5 %: A las 20 hs. de incubación a 30° se observan formas vegetativas enormes unas y otras enanas, muy móviles y pocas levaduras. Ante este resultado promisor, tratamos de purificarla por pasajes sucesivos en el mismo medio. Pero los cultivos se fueron empobreciendo también en *Amoebas* sin conseguir nuestro objeto.

Aislamiento monocelular de los quistes y siembras en mosto y medios glucosados: No desarrollaron.

En resumen, el desarrollo de nuestra *Amoeba* parece condicionado por la existencia de levaduras vivas en activa multiplicación.

CARACTERES MICRO-MORFOLÓGICOS DE LA « AMOEBIA »

Estudiaremos primero su morfología al estado fresco, de las formas vegetativas y de los quistes y luego su citología.

Forma vegetativa: Tomando material con un asa del halo lacunar que rodea a las colonias parasitadas y suspendiéndolo en solución fisiológica, no se observan *Amoebas*. Es necesario cortar un trocito de agar de esa zona y montarlo entre porta y cubre-objeto con una gota de agua, sin ejercer presión, para poder apreciar que es tan grande la cantidad de amebas que éstas adquieren contornos poliédricos por presión recíproca. Además son muy tenues, apenas refringentes y granulosas, sin inclusiones, de una extrema fragilidad, por eso al querer retirarlas con un asa se rompen todas, sin quedar una.

Las dimensiones de la *Amoeba* vegetativa son muy variables, desde $8\ \mu$ de diámetro (formas enanas) hasta $48,96\ \mu \times 30,6\ \mu$ (formas gigantes). No sabemos explicar de qué depende esta diversidad de tamaño puesto que las hemos observado en un mismo cultivo. La mayoría mide alrededor de $15\ \mu$ de diámetro.

Existe separación nítida entre ecto y endoplasma. Este último es granuloso con inclusiones alimenticias (levaduras), una vacuola grande, generalmente, y en ocasiones con una o varias vacuolas pequeñas contráctiles (excreticias).

A veces hemos observado que cada célula de levadura estaba incluida en una vacuola alimenticia.

El ectoplasma es homogéneo y hialino formando pseudopodios poco numerosos, por regla general, anchos como delantales. Cuando la *Amoeba* retrae un pseudopodio emite otro. Por eso se ven generalmente en un polo de la *Amoeba* 1 a 3 pseudopodios anchos y poco profundos. Sin embargo en ocasiones hemos observado formas pequeñas muy activas emitiendo pseudopodios en todo su contorno, en dedo de guante (como digitaciones).

La diferencia entre el endo y el ectoplasma es poco o nada aparente en las amebas vegetativas que forman el halo lacunar alrededor de las colonias de levaduras; pero a los pocos segundos de observación (tal vez por la acción del agua que se le agrega para montar la preparación) parecen salir de su letargo, empiezan a moverse y se torna entonces evidente la separación protoplasmática mencionada.

Con frecuencia se puede asistir a la *división vegetativa de las Amoebas*. Estas se inmovilizan, se ensanchan transversalmente, quedando en cada polo un solo pseudopodio en media luna y muy delgado. El endoplasma contiene numerosas granulaciones animadas de movimientos brownianos y una vacuola grande central en cada mitad. En la parte media comienza pronto a aparecer una estrangulación que avanza hacia el centro. Las granulaciones móviles que están en la zona media sufren el vaivén del movimiento citoplasmático, dirigiéndose alternativamente hacia una mitad y otra, como si no supieran en cual quedarse. Finalmente la estrangulación avanza y, de golpe, la *Amoeba* queda dividida en dos mitades iguales que permanecen sin embargo unidas cierto tiempo por un hilo protoplasmático. Las *Amoebas* hijas entran rápidamente en actividad dirigiéndose en sentido contrario. El hilo protoplasmático que las mantiene unidas se estira cada vez más y termina por romperse en caña verde. Por eso cada *ameba* hija aparece con frecuencia provista de un apéndice filiforme ancho en su base y afilado y desflecado en su extremidad. En una oportunidad que ob-

servamos esta división vegetativa en el material tomado de una colonia de levadura parasitada, pudimos apreciar cómo cada ameba hija se dirigía, apenas terminada la división de la célula madre, a un grupo de levaduras diametralmente opuesto. Como estaban aún unidas por un hilo protoplasmático y cada una tiraba por su lado, para emplear una expresión gráfica, avanzaban poco, hasta que la unión se rompió y las amebas englobaron rápidamente sus presas.

Formas en reposo: Son esféricas sin pseudopodios ni membrana diferenciada y sin ectoplasma. El citoplasma contiene una o dos vacuolas grandes, granulaciones con movimientos brownianos y numerosas células de levaduras fagocitadas.

A veces hemos visto algunas de estas formas con una o varias prolongaciones finas, radialmente dispuestas, en una parte de su contorno (pseudopodios?).

Quistes: Comienzan a aparecer hacia el tercer día en las cajas de PETRI con agar-glucosado incubadas a 30°. Son subglobulosos, ovoides o elípticos, con membrana que debe ser doble porque en los quistes viejos se separa a veces la hoja interna dejando un espacio hueco en un polo y la externa se arruga o emite protuberancias hialinas y homogéneas cuando se los monta en solución fisiológica o lugol, como si se tratara de una substancia mucosa muy sensible a los cambios osmóticos.

Sus dimensiones oscilan desde 6,12 μ hasta 11,47 \times 7,65

En los medios de cultivo sólidos se presentan aislados o en grupos de pocos elementos, pero en los líquidos (medio de BESREDKA por ej.) cuando el material se aspira con pipeta se observan verdaderas colonias de quistes. Muchos presentan un tabique en su parte media indicando una fase de multiplicación quística por división transversa. El tabique se va estrangulando y separa dos quistes hijos iguales. Estos diversos estadios los hemos podido seguir y dibujar con la cámara clara. Finalmente la formación de las colonias de quistes atestiguarían esta curiosa propiedad.

Los quistes tienen un contenido granuloso sin vacuolas ni inclusiones alimenticias y hemos podido asistir a su germinación, la cual se opera como sigue: por un polo del quiste comienza a salir su contenido celular como un brote que va aumentando de volumen hasta que, llegado a cierto tamaño, bruscamente abandona su envoltura que permanece aún por cierto tiempo adherida a esta nueva ameba vegetativa. Los corpúsculos del protoplasma entran rápidamente en movimiento browniano y los pseudopodios anchos no tardan en aparecer.

Parece que la ameba es particularmente frágil en este momento de su ciclo evolutivo porque estallan con facilidad a la menor presión del cubre-objeto, dejando en libertad sus granulaciones que continúan moviéndose y disolviéndose el citoplasma en el líquido de montar. Tal vez obedezca esta fragilidad a que la membrana física (en el sentido de OVERTON), condensación lipoproteica del citoplasma, no ha tenido tiempo de organizarse bien.

Fase flagelada: En varias oportunidades hemos cubierto la superficie de cajas de PETRI con cultivos de la *Amoeba* en agar-glucosado, en agar-miel y en agar-mosto, de diferentes edades (5, 10 y 15 días de incubación a 30°) con agua corriente estéril, solución fisiológica o con la siguiente mezcla: agua destilada 5 cm³, solución de fosfato dipotásico al 1/20, 0,20 cm³. Los exámenes microscópicos practicados cada 15 minutos durante una hora, nunca revelaron la existencia de formas flageladas. En el examen microscópico efectuado al cabo de una hora de la caja de PETRI cubierta con la última de las soluciones nombradas, observamos numerosas formas vegetativas muy activas, con pseudopodios en forma de dedo de guante en casi todo su contorno.

CITOLOGÍA

COLORACIONES VITALES. — *Con rojo neutro:* Las células vegetativas muestran numerosos corpúsculos metacromáticos animados de vivos movimientos brownianos y, en ocasiones, una o dos vacuolas débilmente teñidas «d'emblé». Al cabo de algunos minutos los corpúsculos se agrandan, pierden la intensidad de su coloración y el movimiento, y otras veces parecen fusionarse.

Al cabo de cinco minutos, más o menos, se observan formas en media luna o en calota, lo cual indica que esos corpúsculos estaban dentro de pequeñas vacuolas. A los veinte minutos se observan aún corpúsculos metacromáticos móviles en el interior de las vacuolas y las amebas emiten pseudopodios, conservando pues su vitalidad. Algunas de éstas contienen levaduras vivas que presentan también corpúsculos coloreados móviles en el interior de sus vacuolas y otras que parecen muertas, pues se tiñen intensamente y su protoplasma parece coagulado.

Los quistes no presentan vacuolas visibles sino corpúsculos metacromáticos móviles.

Con verde Janus o violeta Dahlia: Se revela con estos colorantes la existencia de las *Amoebas* vegetativas de un condrioma apenas refringente, constituido por filamentos ondulados o bastoncitos se-

mejantes a bacterias. Como en otras células, el condrioma sufre rápida y fácilmente la alteración vesiculosa.

COLORACIONES POST-VITALES. — *Con lugol*: Nunca pudimos apreciar en las amebas vegetativas o en sus quistes la presencia de reservas de glucógeno. El núcleo se torna particularmente visible con este líquido con el aspecto de un elemento globuloso, mate, centrado por el cariosoma que ocupa casi todo su volumen. El núcleo mide $3,06 \mu$.

Las amebas vegetativas se tiñen débilmente en amarillo y los quistes permanecen incoloros o adquieren una coloración amarillenta difusa. Parece que su membrana deja pasar los colorantes con cierta dificultad.

Con el Sudán III o una solución de ácido ósmico al 2%: Se puede comprobar que tanto las amebas vegetativas como los quistes son ricos en reservas grasas en forma de corpúsculos.

COLORACIONES CON FIJACIÓN PREVIA (núcleo y condrioma).— Hemos empleado los siguientes fijadores: SCHAUDINN, FLEMMING fuerte y débil, BOUIN y MEVES y las coloraciones con hematoxilina férrica de HAIDENHEIN original y la modificada por DOBELL (1914) y la de MANN. Los frotis fueron confeccionados según la técnica preconizada por DOBELL y O'CONNOR sobre cubre-objetos, pero obtuvimos mejores resultados sumergiendo un trozo del cultivo en el baño fijador y haciendo los frotis sobre porta-objetos después de su actuación o aun después de los baños para eliminar el fijador. Naturalmente que es necesario efectuar estas maniobras cuidadosamente, transportando el trozo de cultivo con una espátula para evitar que el desarrollo se desprenda de la superficie del medio.

La coloración de MANN nos ha dado muy buenos resultados para la coloración de los núcleos y tiene la ventaja de ser más rápida y de no exigir la decoloración de las grasas, como cuando se emplea la coloración con hematoxilina férrica y un fijador a base de ácido ósmico.

Las amebas vegetativas tienen un solo núcleo generalmente central o rechazado hacia la periferia cuando existen inclusiones alimenticias.

El núcleo mide alrededor de 3μ y la membrana nuclear solo aparece claramente en las preparaciones fijadas con el líquido de SCHAUDINN, sin cromatina periférica. En las preparaciones efectuadas con material fijado con los otros líquidos mencionados, la membrana nuclear no es claramente visible, se la adivina.

El cariosoma es generalmente esférico, grande y central, sólo en ocasiones lo hemos visto algo excéntrico. Es homogéneo, intensamente teñido y separado de la membrana nuclear por un espacio claro estrecho. En las preparaciones muy diferenciadas el cariosoma puede presentar una estructura reticulada con un punto más intensamente teñido (centriolo ?) o formado por un anillo fuertemente coloreado y una zona central más clara. Su forma no es siempre esférica o globulosa, pues en ocasiones es piriforme, oval, más o menos anguloso o aún alargado o rectangular. Pensamos que estos diversos aspectos de su estructura y forma, sean fases preparatorias de la división nuclear o corresponden a núcleos que acaban de dividirse y no han adquirido aún su estado de reposo completo.

Los quistes tienen también un solo núcleo, generalmente excéntrico y con los mismos caracteres que los de la ameba vegetativa.

División nuclear: Hemos observado las diversas fases de la división nuclear durante la multiplicación de las amebas vegetativas que podemos resumir como sigue: Durante la *profase* el cariosoma se alarga y toma el aspecto de un alterio por una contricción central. En la *metafase* la masa cromática del cariosoma se separa en dos porciones en forma de casquete que permanecen unidas por fibras acromáticas. Durante la *anafase* estas dos mitades del cariosoma se separan más aún y las fibras acromáticas se adosan formando un filamento (centrodesmose) que lleva a veces en cada extremo un corpúsculo más intensamente teñido (cuerpo intermedio) que resalta del resto de los casquetes polares.

En la *telofase* se opera la separación de los núcleos hijos y la reconstrucción de los mismos. El casquete y el cuerpo intermedio se funden y forman el cariosoma. La membrana nuclear se separa por estiramiento en dos mitades iguales que rodean a los cariosomas correspondientes.

Todos estos fenómenos de división ocurren dentro de la membrana nuclear y nunca pudimos observar la formación de cromosomas ni de placa ecuatorial. Participamos de la opinión de los autores que sostienen que el cuerpo intermedio resulta de una condensación de las fibras acromáticas, en contraposición a los que creen que son cromosomas.

CARACTERES BIOLÓGICOS DE LA « AMOEBIA »

Movimiento y migración: Al ocuparnos de los caracteres morfológicos hemos descrito el aspecto de los pseudopodios, generalmente anchos y poco profundos, en ocasiones como dedos de guante, de

bordes lisos. Sin embargo, muy raras veces, los hemos visto de bordes dentados, con el aspecto que adquiere una gota de agua que se deja caer sobre un vidrio desengrasado.

Las amebas vegetativas en actividad se mueven en todas las direcciones, hacia el centro de las colonias parasitadas de levaduras y hacia el exterior, abandonándolas; pero la distancia que recorren depende de la quimiotaxis, es decir de la atracción que sobre ella ejercen los microorganismos que son fácilmente fagocitables.

Estas experiencias se han efectuado simultáneamente con la investigación de la propiedad de atacar y lisar diversas levaduras, hongos filamentosos y bacterias gram positivas y negativas en la siguiente forma:

Preparamos cajas de PETRI con agar-caldo glucosado al 1% y una vez solidificadas y secadas en la estufa a 37°, sembramos en su parte media en una extensión de 1 cm² material de un cultivo fresco de la levadura parasitada con la *Amoeba*. A una distancia de 1 cm de cada uno de los lados de este cuadrado sembrado, hicimos lo mismo con cultivos puros de las levaduras o bacterias que queríamos experimentar, dejando en algunas cajas de PETRI un espacio correspondiente a uno de los lados de la siembra de *Amoeba*, como testigo, sin depositar material alguno.

Pudimos así comprobar que la migración de nuestra ameba comienza a las pocas horas y a las 18 hs. llega a medir hasta 4 mm cuando es atraída por ciertas levaduras o bacterias, como detallaremos más adelante y 1 cm a las 48 hs. En cambio hacia el sector testigo, sin cultivo alguno, la migración es de 4 a 6 mm a las 48 hs.

FACULTAD DE INVADIR Y LISAR OTROS HONGOS LEVADURIFORMES

Candida albicans: No se observa lisis al cabo de una semana.

Candida aldoii: A las 18 hs. de incubación a 30° se observa con el microscopio a pequeño aumento a través del fondo de la caja de PETRI una migración de la *Amoeba* de 3 mm hacia este cultivo. A los tres días comienzan a aclararse los bordes y a los 5, la lisis es completa. Cuando comienza el ataque se observa alrededor del cultivo de *C. aldoii* la formación de una zona lacunar, como aliento condensado.

Candida deformans: A las 17 hs. se observa con el microscopio una migración hacia este cultivo de 2 mm. A los tres días formación de un velo lacunar e invasión de los bordes del cultivo de *C. deformans*. A los 5 días de incubación a 30° la lisis es casi completa.

Candida krusei: Los mismos resultados que en la precedente.

Candida suavolens: La lisis es completa ya a los 3 días de incubación a 30°.

Candida parakrusei: La migración de la *Amoeba* hacia este cultivo es de 1,5 mm al cabo de 17 hs. A los tres días la invasión de los bordes de este cultivo es poco aparente, a los 5 días es manifiesto y a los 7 hay lisis sólo de la mitad del cultivo orientado hacia la siembra de la *Amoeba*.

Candida tanica y *C. zeylanoides*: A las 17 hs., la primera ha provocado una migración de la *Amoeba* de 2,5 mm y la segunda de 3,5 mm. A los 4 días el cultivo de *C. tanica* comienza a lisarse por sus bordes y a los 5, abarca casi todo el cultivo; en cambio en el de *C. zeylanoides* la lisis es completa ya a los 4 días.

Cryptococcus agregatus: A las 17 hs. no ha provocado la migración de la *Amoeba*. A los tres días se ha formado un velo lacunar alrededor de este cultivo, pero macroscópicamente no se observan fenómenos de lisis ni al 10º día de incubación a 30°. Sin embargo las preparaciones microscópicas permiten apreciar la existencia de algunas amebas conteniendo elementos de esta levadura en su interior.

Cryptococcus castellani: A las 17 hs. migración de 3 mm de la *Amoeba* hacia este cultivo. A los tres días formación de un velo lacunar alrededor del cultivo. A los 5 días invasión de los bordes y a los 7 y 10 días lisis de la mitad proximal solamente, del cultivo de *C. castellani*.

Cryptococcus hominis: A las 17 hs. migración de 3 mm de la *Amoeba*. A los 3 días formación alrededor de este cultivo de un velo lacunar formado por las *Amoebas*, que desaparecen poco a poco sin invadir el cultivo y al 10º ya no se las observa cerca de los bordes del cultivo de *C. hominis*.

Cryptococcus mena: El mismo fenómeno que en el caso precedente, después de haber provocado a las 17 hs. una migración de 4 mm.

Debaryomyces globosus: Lisis casi completa a los 4 días.

Debaryomyces guilliermondi: A los 10 días invade únicamente los bordes.

Debaryomyces klöckeri: Migración de las *Amoebas* de 2 mm a las 17 hs. A los 7 días los bordes de este cultivo están apenas inva-

dados y a los 10 días esta lisis ha sido reemplazada por un crecimiento secundario de la levadura.

Debaryomyces hudeloi: La lisis comienza por los bordes al 4º día y es casi completa a los 7. A los 10 días se ha formado alrededor de este cultivo lisado una franja de colonias secundarias de la levadura.

Debaryomyces tyrokola: La lisis de los bordes de este cultivo comienza ya a los 3 días y se extiende a casi toda su superficie a los 5. A los 10 días se ha formado alrededor del cultivo lisado una franja de 3 mm de diámetro constituida por pequeñas colonias de levadura, allí donde en los días anteriores existía el velo lacunar formado por el desarrollo de la *Amoeba*.

Debaryomyces matruchoti: Lisis casi completa a los 5 días.

Endomyces chodati: Lisis casi completa a los 5 días.

Endomyces fibuliger: Las amebas llegan hasta 1 mm de los bordes de este cultivo pero no lo invaden.

Endomyces hordei, *E. lindneri* y *E. magnusi*: No son atacados.

Endomyces mali: La *Amoeba* forma alrededor de este cultivo un velo lacunar al tercer día de incubación a 30°, pero no lo lisa.

Endomyces margaritae y *trumpfi*: Formación de un velo lacunar al tercer día alrededor de estos cultivos y, al cuarto, lisis parcial de los bordes que no progresa en los días subsiguientes. En el *E. margaritae* se ha formado al 10º una franja de 3-4 mm de diámetro alrededor del cultivo original constituida por pequeñas colonias secundarias de la levadura.

Geotrichum candidum: No es atacado.

Monascus purpureus y *M. ruber*: Las amebas llegan hasta los bordes de estos cultivos al 4º día, pero no lo penetran ni lo lisan.

Mycocandida mortifera y *Mycocandida sp.*: Formación de un velo lacunar al tercer día y lisis parcial de los bordes de estos cultivos, que no progresa en los días subsiguientes.

Pichia farinosa var. *Lodderi*: Solamente a los diez días existe una lisis moderada de todo el cultivo.

Prototheca ciferri (Alga aclórica): Las amebas llegan a las 39 horas de incubación a 30° hasta cerca de los bordes de este cultivo, pero no lo penetran ni lo lisan.

Rhodotorula bronchialis, *R. glutinis*, *R. minuta* y *R. rubra*: El mismo resultado que en el cultivo precedente.

Saccharomyces anulatus: Las amebas han formado un velo lacunar alrededor del cultivo a las 39 hs. y comienza la lisis de los bordes que se extiende a todo el desarrollo del *S. anulatus* a los 5 días. A los 10 días el velo formado por el crecimiento de la ameba en los bordes del cultivo es de 0,50 cm de diámetro, continuo en la zona interna y lacunar en la externa.

Saccharomyces cerevisiae: Las amebas llegan hasta los bordes de este cultivo, pero no lo invaden ni lo lisan.

Saccharomyces blanchardi: Igual resultado que la precedente.

Saccharomyces chevalieri: Al cabo de 22 hs. no se observa migración de las amebas hacia este cultivo. A las 39 hs. han llegado a los bordes que comienzan a lisarse a los 3 días. Esta lisis no avanza en los días subsiguientes.

Saccharomyces chodati: Las amebas llegan hasta cerca de sus bordes, pero no penetran ni lisan el cultivo.

Saccharomyces ellipsoideus: A los tres días, formación de un velo lacunar alrededor de este cultivo. A los 8 días las amebas han penetrado en su interior, sin provocar sin embargo la lisis. A los 10 días: ausencia de lisis.

Saccharomyces heterogenicus: Las amebas llegan hasta los bordes, pero no penetran ni lisan este cultivo.

Saccharomyces lactis: A los 4 días formación de un velo lacunar con lisis de los bordes. A los 8 días lisis casi completa de este cultivo. A los 10 días el velo lacunar es ancho y con dos zonas, la interna continua y la externa lacunar. No se observan colonias satélites.

Saccharomyces lindneri: A las 39 hs. se observa migración de las amebas. A los 3 días velo lacunar alrededor del cultivo y comienzo de lisis en sus bordes. A los 4 días lisis en el centro del cultivo. A los 10 días lisis moderada del cultivo y orla ancha de amebas constituida por dos zonas, la interna continua y la externa lacunar sin colonias satélites.

Saccharomyces ludwigi: A las 22 hs. las amebas han sufrido una migración de 2 mm hacia este cultivo. A las 39 hs. comienzo de lisis en los bordes. 8 y 10 días: lisis parcial del cultivo. Orla lacunar estrecha sin colonias satélites.

Saccharomyces mangini: Las amebas llegan hasta sus bordes sin provocar la lisis.

Saccharomyces müntzii: A las 39 hs. lisis de los bordes. A los 3 días formación de un velo lacunar alrededor del cultivo. A los 10 días lisis moderada de todo el cultivo. La orla de amebas es continua en la zona interna y lacunar en la externa con algunas colonias satélites.

Schizosaccharomyces mellacei y *S. octosporus*: Las amebas llegan hasta cerca de los bordes pero no invaden ni lisan estos cultivos.

Schizosaccharomyces pombe: Migración de 8 mm de las amebas hacia este cultivo a las 22 hs. A los 4 días formación de un velo lacunar y lisis de los bordes. A los 10 días lisis marcada de todo el cultivo, orla de amebas y moderado desarrollo de colonias satélites.

Torulopsis colliculosa: A las 39 hs. lisis de los bordes y de casi todo el cultivo a los 6 días, con formación de un velo lacunar de amebas alrededor.

Torula cremoris: Casi todo el cultivo está lisado ya a los tres días.

Torula Morr: Las amebas llegan hasta los bordes, pero no provocan su lisis.

Torula kefir: A los 4 días formación de un velo lacunar y lisis de los bordes y centro del cultivo. A los 10 días la lisis es casi completa.

Torulopsis minor y *T. minuta*: Las amebas llegan hasta los bordes pero sin provocar su lisis.

Willia anomala: Lisis parcial de los bordes a los 10 días.

Zygosaccharomyces barkeri: A los 10 días formación de un velo lacunar y lisis parcial de los bordes.

Zygosaccharomyces japonicus y *Z. pastori*: Migración de las amebas de 1 cm a las 48 hs. A los 3 días lisis de los bordes y a los 10, lisis casi completa de los cultivos, con formación de una orla de amebas de 2 mm de ancho, sin colonias satélites.

Zygosaccharomyces priorianus: Lisis de los bordes a los 10 días.

Zygosaccharomyces paradoxus: No lo ataca.

ACCIÓN SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Bacilos de Eberth y paratífico B: A los 5 días el cultivo ha sido completamente lisado y reemplazado por un velo semejante al desarrollo de las amebas al estado puro.

Bacilo paratífico A: Lisis completa a los 7 días.

Bacilos Shiga y Stanley: Lisis completa a los 7 días con formación de una ancha zona lacunar y de colonias satélites.

Bacilo Flexner: Lisis completa a los 5 días, formación de orla de amebas y de colonias satélites.

Bacilo coli: La lisis progresa desde los bordes hacia el centro del cultivo a los 5 días de incubación a 30°.

Bacilo piocianico, B. prodigiosus y una bacteria gram positiva (Propionibacterium): No son lisados.

ACCIÓN SOBRE LEVADURAS Y BACTERIAS MUERTAS POR EL CALOR

En diversas oportunidades, disponiendo las experiencias como en los casos anteriores, en lugar de sembrar con gérmenes vivos depositamos abundante material de suspensiones densas de levaduras o bacterias gram negativas fácilmente lisables por la *Amoeba*, muertas por calentamiento a 50° durante media hora en bañomaría, sin observar nunca la fagocitosis de las mismas. Las amebas llegan hasta la zona donde se ha depositado el material, pero no engloban los gérmenes muertos y, al cabo de varios días, sólo se observa en las preparaciones microscópicas de ese material la existencia de formas quísticas.

NUTRICIÓN. — Comprende los siguientes actos: fagocitosis, digestión y excreción que analizaremos separadamente.

Fagocitosis: Nuestra *Amoeba* es capaz de englobar como hemos visto levaduras y bacterias vivas. A veces se cuenta hasta más de 10 células de levaduras en su interior, aisladas o en cadenas. Pero no solamente tiene esta propiedad sino que también es capaz de ingerir los glóbulos rojos y sus propios quistes. En efecto hemos visto en repetidas oportunidades y dibujado con la cámara clara (fig. 7) amebas vegetativas con uno o varios quistes en su interior.

En cuanto a la facultad de englobar los hematíes, hemos investigado esta propiedad agregando a cultivos de 24 hs. en caldo glu-

cosado o en mosto líquido, 0,1 cm³ de sangre lavada humana o de conejo. En las preparaciones microscópicas efectuadas al día siguiente pudimos apreciar la existencia de numerosas formas vegetativas repletas de hematíes, tanto en el tubo con sangre humana como en el que contenía sangre de conejo. Sólo algunas amebas tenían levaduras en su interior, lo cual parece indicar que prefieren los hematíes para su nutrición.

Facultad de englobar granos de almidón: En la misma forma agregamos un poco de almidón soluble en substancia, a cultivos frescos en medios líquidos o sólidos en caja de PETRI, colocándolo en este último caso a 0,5 cm de distancia del desarrollo de la *Amoeba*, sin que hayamos podido comprobar en ninguna circunstancia su englobamiento.

Digestión: Nuestra *Amoeba* posee enzimas proteolíticas y seguramente también lipolíticas que permiten la digestión de las células fagocitadas. No posee en cambio la propiedad de digerir las membranas celulares (hemicelulosas).

Excreción: En algunas formas vegetativas hemos observado la existencia de una o varias (3 a 5) vacuolas contráctiles, excreticias, conteniendo en su interior los productos de desasimilación, especialmente membranas celulares, lo único visible.

Durante la observación microscópica al estado fresco se puede apreciar cómo estas vacuolas contráctiles se dirigen hacia los bordes de la *Amoeba* y bruscamente expulsan su contenido al exterior y desaparecen. Por este mecanismo se explica la existencia en el medio ambiente de los cultivos lisados, de membranas celulares y de células enteras pero vacías (sombras de levaduras).

Las vacuolas excreticias se fusionan a veces entre sí y la expulsión de su contenido ocurre en pocos segundos.

Nuestra *Amoeba* es pues incapaz de nutrirse de células muertas o de substancias disueltas. *Su alimentación es holozoica y se opera por la emisión de pseudopodios que engloban, por circunfluencia, las células.*

Acción de la tensión de oxígeno: La *Amoeba* vegetativa es preferentemente aerobia, pues abunda en los velos que forman ciertas levaduras en la superficie de los medios líquidos; en cambio, son escasas en las preparaciones microscópicas efectuadas con material tomado del fondo de los tubos. De igual modo desarrollan únicamente en la superficie de los tubos con agar blanco glucosado dispuesto en columna.

Acción de la temperatura: Sembramos con el mismo material tubos de agar-glucodo al 1 % inclinado en pico de clarinete, incubándolos a diferentes temperaturas..

Las observaciones macro y microscópicas efectuadas a los 6 y a los 8 días arrojan los siguientes resultados:

A 37°: Buen desarrollo de la levadura, y abundantes formas vegetativas y quísticas de la *Amoeba*.

A la temperatura del laboratorio (18° más o menos): El desarrollo de la *Amoeba* es algo menor que a 30°.

A 5°: Desarrollo de algunas colonias de la levadura. Muy raros quistes de la *Amoeba*.

La temperatura también ejerce su influencia en la *rapidez de la aparición de los quistes*. Nuestras experiencias a este respecto las efectuamos sembrando tubos de papa e incubándolos a las temperaturas arriba mencionadas. Sus resultados fueron los siguientes:

A 37°: A las 24 hs. raras formas vegetativas y algunos quistes. A los 3 y a los 5 días el mismo resultado.

A 30°: A las 24 hs. gran cantidad de formas vegetativas grandes y pequeñas. No se observan quistes. A los 3 y a los 5 días se observa mayor cantidad de quistes que de formas vegetativas.

A la temperatura del laboratorio (18° más o menos): A las 24 hs. se observan formas vegetativas y quísticas. A los 3 y a los 5 días gran cantidad de quistes y pocas formas vegetativas.

A 5°: Formas quísticas y muy raras formas vegetativas. A los 3 días se observa igual proporción, más o menos, de amebas vegetativas y de quistes. A los 5 días predominan los quistes.

TEMPERATURA LETAL. — La *Amoeba* no muere en la heladera a 0°, porque sus quistes resisten esa temperatura.

Por las experiencias que detallamos a continuación hemos comprobado, en cambio, que la *Amoeba* muere al cabo de 3 minutos de calentamiento en bañomaría a 50°.

Experiencia N° 1: Suspensión en solución fisiológica de material de un cultivo de un mes, en papa, muy rico en quistes se distribuye en ampollas, se las cierra y calienta en bañomaría a 40°, 45° y 50°, durante 3, 5, 10, 15 y 20 minutos, al cabo de los cuales se siembra su contenido. En ninguno de los tubos sembrados con material calentado a 50° hubo desarrollo (observación seguida durante una semana), así como tampoco en el tubo sembrado con el contenido de la ampolla calentada a 45° durante 20 minutos.

Experiencia N° 2: Suspensión en solución fisiológica de cultivos de 24 a 48 hs. ricos en formas vegetativas, distribuída en ampollas.

Tiempo	3	5	10	15	20 minutos
Temp. 40°	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+
50°	0	0	0	0	0

Las cruces indican que el cultivo fué positivo.

ACCIÓN DE LOS HIDRATO DE CARBONO

Empleamos medios sólidos con 1 % de los siguientes hidratos de carbono: glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa y comprobamos que al cabo de 48 hs. de incubación a 30° el desarrollo en el tubo con glucosa era muy rico en formas vegetativas; casi no contenía quistes, en cambio observamos gran cantidad de quistes en los exámenes microscópicos de los tubos restantes, salvo el de rafinosa que no presentó desarrollo. Al cabo de 4 días había quistes en todos los tubos.

ACCIÓN DE DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS

Empleamos medios sólidos con las siguientes fuentes nitrogenadas: peptona, asparagina, sulfato de amonio, urea y nitrato de potasio y las lecturas se efectuaron a los 2, 4 y 8 días de incubación a 30° con el mismo resultado en todas ellas (la fuente nitrogenada no influye en el crecimiento y enquistamiento de la *Amoeba*).

SIEMBRAS SOBRE MEDIOS NATURALES ESTERILIZADOS

En estas experiencias depositamos en cajas de PETRI una porción de los siguientes medios: ajo, ají (verde y rojo), batata, berenjena, cebolla, chaucha, porro, papa, repollo, remolacha, rabanito, radicha, tomate y zapallo. El desarrollo de la ameba en papa, rabanito y remolacha fué más exuberante que en los demás medios. En ajo, la *Amoeba* no desarrolló, en cambio la levadura creció bien en todos ellos.

PREPARACIÓN DE UN EXTRACTO DE « AMOEBIA »

Con material de cultivos en papa, ricos en formas vegetativas, preparamos una suspensión en agua destilada que sometimos seis veces a la congelación y descongelación a baja temperatura, metiendo el tubo en un termo con nieve carbónica y alcohol de 96°. Esta

mezcla produce un descenso marcado de la temperatura, de modo que a los pocos minutos la suspensión está congelada. Para descongelarla rápidamente, sumergimos el tubo en un bañomaría a 40°.

Con este extracto efectuamos las siguientes experiencias:

Acción sobre la leche: No la modifica (a un tubo conteniendo 5 cm³ de leche le agregamos 0,50 cm³ de extracto).

Acción sobre el mosto gelatinado al 15 %: No lo licúa.

Poder fibrinolítico: Débil (sobre plasma de conejo).

Acción sobre las grasas: Negativa (grasa de ternera y aceite de olivas).

Resistencia a los ácidos: Nuestra *Amoeba* resiste el contacto con una solución de ácido cítrico al 20 %, durante 24 hs.

Resistencia al alcohol etílico: La *Amoeba* desarrolla en un medio sintético con 3 % de alcohol etílico.

Resistencia a la desecación: Las siembras de material rico en quistes conservado seco y en el vacío (vacío fosfórico), dieron cultivos positivos al cabo de un mes de conservación en la cámara fría.

Vitalidad en los medios de cultivo: Los trasplantes de un cultivo en papa conservado durante dos meses a la temperatura del laboratorio, fueron positivos, en cambio fueron negativos los de un cultivo de 4 meses en agar miel.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL

Estas experiencias fueron efectuadas exclusivamente en gatos inoculando por vía gástrica con una suspensión en solución fisiológica de un cultivo rico en quistes y otros por instilación rectal con material rico en amebas vegetativas.

Gato gris. Peso= 1.220 g. (10 de Abril de 1940): Se le introduce una sonda hasta el estómago y se le inyecta 5 cm³ de una suspensión de un cultivo de 6 días en agar-glucosado, rico en quistes. Este, como los animales siguientes, fueron colocados en jaulas con doble fondo, siendo el primero de alambre tejido fino, para poder apreciar el aspecto de sus deyecciones y recoger material para los exámenes microscópicos.

La observación diaria, así como los exámenes microscópicos de las materias fecales durante 15 días, no acusó nada de anormal. El animal se alimentó normalmente y aumentó de peso. Al cabo de ese tiempo fué sacrificado y el examen de su tubo digestivo no reveló nada de particular.

Gato blanco. Peso=1.050 g. El 10 de Abril de 1940 se le instiló en el recto 3 cm³ de un cultivo en caldo glucosado de 48 hs. rico en formas vegetativas.

La observación diaria durante 15 días de sus materias fecales (macro y microscópica), así como de su estado general, no reveló nada de anormal. Al cabo de ese tiempo fué sacrificado y el examen de su tubo gastro-intestinal no acusó nada de particular.

Gato blanco y negro. Peso=550 g. El 29 de Abril se le instiló en el recto 3 cm³ de un cultivo de 48 hs. en caldo glucosado.

La observación diaria durante 20 días, no permitió apreciar nada de anormal. El animalito aumentó de peso.

Gato gris. Peso=600 g. Inoculado en la misma forma que el anterior, con el mismo resultado.

Gato negro. Peso=500 g. El 29 de Abril se le introdujo una sonda hasta el estómago y se le instiló una suspensión de un cultivo rico en quistes (5 cm³).

La observación diaria durante 20 días, no reveló nada de anormal. El animalito aumentó peso.

Gato gris y blanco. Peso=650 g. Inoculado en la misma forma que el anterior y con el mismo resultado.

PREPARACIÓN DE ANTISUEROS

Los conejos N^o 389 de 1.620 g. de peso y 360 de 1.730 g., fueron inoculados, por vía venosa, durante dos meses, tres días consecutivos de cada semana dejándolos descansar los restantes, con una suspensión de un cultivo fresco de *Amoeba*, muerto por calentamiento a 50° durante media hora. Se comenzó por inyectarles 0,50 cm³ de una dilución al 1/10.000 de la suspensión, aumentando progresivamente la dosis hasta llegar a la inoculación de la suspensión madre, de una opacidad que apenas permitía ver un trazo de lápiz graso en un tubo de ensayo de 180 × 18 mm.

La sangría experimental fué efectuada doce días después de la última inyección.

PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN

Suspendiendo material de un cultivo de la *Amoeba* en una gotita de los sueros 389 y 360 sobre porta-objetos, cubriendo y observando, no nos permitió apreciar aglutinación de los quistes o de las formas vegetativas.

Obtuvimos el mismo resultado efectuando la reacción en tubos de ensayo con diluciones de los sueros al 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200. calentándolos durante 1 hora a 50° en bañomaría y dejándolo una noche en la heladera. La lectura de los resultados se hizo con preparaciones microscópicas, para no interpretar los grumos de la levadura aglutinada como aglutinación positiva de la *Amoeba*.

En vista de estos resultados y pensando que la aglutinación de las levaduras falseara los resultados, empleamos en las reacciones un cultivo de *Amoeba* con flora bacteriana (con bacilo de EBERTH). Con esta técnica la aglutinación microscópica de las Amoebas fué inmediata con ambos sueros, tanto puros como diluidos al 1/50 y al 1/100. El suero normal de conejo carece de esta propiedad aglutinante.

Reacciones de fijación del complemento: Utilizamos en estas reacciones un extracto de cultivo de *Amoeba* con flora bacteriana (preparado por congelación y descongelación como se ha dicho anteriormente), convenientemente diluido y previamente titulado, los sueros de los conejos inmunizados por inyecciones de *Amoeba* con flora de levaduras y un suero de conejo normal como testigo. Las reacciones con los antisueros fueron francamente positivas.

Reacción alérgica cutánea en los conejos inmunizados: La inoculación intradérmica del antígeno (extracto de un cultivo de *Amoeba* con flora bacteriana), en la piel del flanco previamente depilada de los conejos inmunizados, dió lugar a las 24 hs. a la formación de una pápula roja rodeada de una zona ulticariana como de dos cm de diámetro que persistió varios días.

Acción lítica e impidiendo de los antisueros sobre la « Amoeba »: Mezclando partes iguales en volumen de una suspensión de un cultivo fresco de la *Amoeba* con flora bacteriana (EBERTH) y de suero de conejo inmune N° 360 y 389 y llevando la mezcla a la estufa a 30° durante 22 horas, comprobamos al cabo de este tiempo la presencia de amebas vegetativas aglutinadas y de quistes, sin que su número hubiera aparentemente disminuído. Las siembras de este material así tratado en agar-glucosado dió lugar al desarrollo abundante de la *Amoeba*.

Los sueros N° 360 y 389 de los conejos inmunizados adicionados en la proporción de 1/10 a los medios de cultivo sólidos o líquidos no impiden el crecimiento de la *Amoeba*, éstas desarrollan con la misma intensidad que en los medios adicionados de suero normal de conejo. Queremos hacer resaltar que los sueros fueron obtenidos por inyecciones de Amoebas con flora de levaduras y las pruebas del poder impidiendo, sembrando amoebas con flora bacteriana.

Acción lítica de la bilis fresca de bovino: Esta fué obtenida asépticamente por punción de la vesícula biliar y mezclada con un volumen igual de cultivo de la Amoeba en medio líquido o una suspensión de un cultivo en medio sólido. Las preparaciones microscópicas revelaron la inmediata desaparición de las formas vegetativas.

Estudio micológico de la levadura que acompañaba a la Amoeba en el cultivo original.

CARACTERES MACRO-MORFOLÓGICOS. — *Colonia gigante* en mosto gelatinado (un mes a temperatura ambiente): Mide 1cm de diámetro, es plana, circular, de bordes lisos de color blanco griseo y de superficie seca y mate.

En mosto líquido: Formación de un velo blanco griseo, seco, de aspecto graso que trepa por las paredes del tubo y de un depósito. El medio está también turbio.

CARACTERES MICRO-MORFOLÓGICOS. — No forma pseudomicelio en el agua de papas al 25 por mil.

Células alargadas que se multiplican vegetativamente por brotación, aisladas, en cadenas o en rosetas. En el mosto sólido las células miden de $3,7 \times 1,0 \mu$ hasta $9,3 \mu \times 4 \mu$. En el mosto líquido al cabo de 48 hs.: de $5,6 \times 3,7 \mu$ hasta $14 \times 3,7 \mu$ y al cabo de 45 días de $3,7 \times 2,8 \mu$ a $7,4 \times 3,7 \mu$.

Esporulación: En el medio de GORODKOWA no formó esporos al cabo de un mes.

En zanahoria: Se observan muy pocas células que contienen 4 endosporos en forma de sombrero de $1,8 \times 0,9 \mu$.

CARACTERES FISIOLÓGICOS

Zimograma: Positivo para la glucosa únicamente (se emplearon los siguientes hidratos de carbono: glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa).

Auxanograma de los azúcares no fermentados: Negativo.

Auxanograma del nitrógeno: Positivo para la peptona, negativo para la asparagina, urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio.

Licuação de la gelatina: Negativa.

Leche: no la modifica.

Almidón: no lo hidroliza. *Alcohol etílico al 3 %*: Regular desarrollo consistente en la formación de un anillo y de un velo apenas marcado.

Desdoblamiento de la *esculina*: Negativo.

Celulosa: No ataca. *Indol*: No produce. *Hidrógeno sulfurado*: No desprende.

Clasificación: *Pichia belgica*.

CONSIDERACIONES

Según la bibliografía que ha llegado a nuestras manos, es ésta la primera vez que se describe en nuestro país, un caso de parasitismo de una levadura por la *Amoeba*. Este fenómeno tuvo lugar espontáneamente en la naturaleza (en una manzana en descomposición unida todavía al árbol), habiendo sido tal vez ambos gérmenes acaareados por pájaros o insectos.

Nuestra observación es comparable a la efectuada por CASTELLANI en 1930 con las siguientes diferencias: Nuestra *Amoeba* pertenece a otro género, es parásita, puesto que no se nutre de levaduras o bacterias muertas y la lisis de las colonias parasitadas comienza por los bordes. Si VAN ROOYEN comparó la lisis por *Hartmannella Castellani* a la bacteriofágica, la lisis sacaromictica o bacteriana por *Vahlkampfia debilis* tiene, con esa, una similitud aún mayor por los caracteres apuntados más arriba.

Macroscópicamente en los cultivos tiene lugar una lisis de las colonias de levaduras o bacterias, comparable a la que producen los ultravirus bacteriófagos, pero la *Ameba* no llega a destruirla completamente, pues se establece una especie de equilibrio biológico. Cuando la *Amoeba* ha satisfecho sus necesidades alimenticias entra en reposo y se enquista. Sobre el cultivo casi completamente lisado tiene lugar entonces un desarrollo secundario de la levadura, cuyas células, al entrar en activa multiplicación, originan estímulos (tal vez radiaciones mitogenéticas, u otras), que hacen germinar los quistes o dividir las formas vegetativas de la *Amoeba*. Una nueva camada de amebas entra en actividad y se repite así el fenómeno hasta que el medio de cultivo se agota de sustancias nutritivas o se carga de productos metabólicos nocivos para la levadura y el fenómeno de lisis queda estacionado. Esta lisis es transmitible y se reproduce siempre en los trasplantes sucesivos con los mismos caracteres, indefinidamente.

Existe toda una gama de lisis según la sensibilidad de las especies de levaduras estudiadas. La aislada del material original, fué clasificada con *Pichia belgica* y es tan fácilmente fagocitable y lisible como la *Candida aldoi*, *C. deformans* o *C. zeylanoides*. En cambio la *Candida albicans*, ciertos *Endomyces* y los hongos filamentosos (*Actinomyces*, *Mucedinaceae* o *Dematiaceae*), así como las bacterias gram positivas no son atacadas. Ciertas especies de *Mycocandida* presentan lisis únicamente en los bordes de las colonias y finalmente en ciertas levaduras (*Cryptococcus agregatus* por ej.), las amebas llegan a penetrar sus colonias y a englobar algunas células, pero sin provocar fenómenos macroscópicos de lisis.

En la levadura parasitada, la lisis comienza en los bordes de las colonias, progresa hacia el centro y al cabo de varios días, cuando la lisis está muy avanzada, se forma alrededor de esas colonias un halo lacunar formado por la enorme multiplicación de la *Amoeba vegetativa*. En las infecciones experimentales de otras especies de levaduras o de bacterias, la orla lacunar de amebas se forma primero, luego comienza la lisis de los bordes de las colonias y finalmente éstas se aclaran completamente.

El fenómeno de lisis en las bacterias parasitadas por esta *Amoeba* tiene lugar en forma análoga a la lisis de las levaduras.

OEHLE R., en 1917, describió la facultad que tienen *Vahlkampfia magna* y *Hartmanella aquarum* de englobar levaduras y también se ha citado la presencia de levaduras en el interior de otras amebas saprófitas o *Entamoebas* parásitas, pero no se ha estudiado ni descrito este fenómeno de parasitismo in vitro, en nuestros medios artificiales de cultivo.

El estudio micro-morfológico, citológico y biológico de nuestra *Amoeba* nos ha permitido clasificarla como *Vahlkampfia debilis*, aun cuando posee algunas particularidades que no se mencionan en la bibliografía que hemos consultado.

Sus caracteres morfológicos más salientes son los siguientes: *Amoebas* vegetativas medianamente móviles, con diferencia neta en endo y ectoplasma, emitiendo pseudopodios anchos y poco profundos como en las del tipo LIMAX. Sus dimensiones oscilan de 8 a 49 μ en el diámetro mayor, siendo la mayoría de unas 15 μ de diámetro. Carece de reserva de glucógeno y de fase flagelada. Tiene reservas grasas, corpúsculos metacromáticos, una o dos vacuolas grandes y una o varias más pequeñas contráctiles (excreticias). El núcleo es central o excéntrico, vesiculoso, de unos 3 μ de diámetro, con un cariosoma grande(globuloso, generalmente central y una membrana nuclear poco visible y sin cromatina periférica. Su división tiene lugar dentro de la membrana nuclear con formación de casquetes polares, co-

mo es característico en las especies del género *Vahlkampfia* creado por CHATTON y LALUNG-BONNAIRE en 1912.

Los quistes son ovoides o elípticos y más raramente globulosos, con un solo núcleo con los mismos caracteres que en las amebas vegetativas. Su membrana es lisa y más bien delgada y sus dimensiones oscilan de 6,12 μ a 11,47 \times 7,65 μ .

Por estos caracteres y dimensiones corresponde pues a la *Vahlk. debilis* JOLLOS, 1917.

Esta *Amoeba* tiene la facultad de englobar únicamente organismos vivos (levaduras o bacterias gram negativas) o glóbulos rojos. Esos mismos microorganismos fácilmente fagocitables ya no lo son cuando se los mata por el calor. Carece de la facultad de englobar los granos de almidón, pero *fagocita sus propios quistes*. Como no se nutre de substancias disueltas, no hemos podido obtener hasta el presente su cultivo puro, libre de microorganismos.

Resiste la temperatura de la heladera a 0° y las de 45° durante 20 minutos, así como la acción de una solución de ácido cítrico al 20 %.

Los caracteres particulares de nuestra *Vahlkampfia* son los de englobar sus propios quistes y sobre todo la muy curiosa multiplicación de los quistes, por tabicamiento. Como no confiamos en nuestros conocimientos sobre protozoología y en haber consultado completamente la bibliografía mundial sobre este tópico, dejamos a los especialistas la tarea de decidir si realmente corresponde o no, nuestra *Amoeba*, a la *Vahlk. debilis*.

Agradecemos a los señores Profesores Dr. R. DIOS y J. BACIGALUPPO, por haber alentado nuestro trabajo y suministrado gran parte de la bibliografía y al Sr. M. RIESEL por su asistencia en las inoculaciones experimentales a los gatos.

SUMMARY

We describe the saccharomycetic and bacterial lysis produced by *Vahlkampfia debilis* JOLLOS, 1917. The characteristics of this lysis are comparable to those produced by bacteriophage.

This curious phenomenon took place spontaneously in nature in an apple, still attached to the tree, invaded by a yeast and *Amoeba*. We believe that the yeast developed first and then the *Amoeba* which might have been carried by birds or insects.

The morphological and biological characteristics of this *Amoeba* are those of the genera *Vahlkampfia* with the following characte-

istics: vegetative cells are from 8 to 49 μ in diameter with an average of more or less 15 μ endoplasm and ectoplasm well differentiated. Each *Amoeba* has only one nucleus of about 3 μ in diameter. Glycogenic reserves and flagellate stage are lacking.

Cysts: oval, elliptical or less frequently globose, from 6,12 μ to 11,47 \times 7,65 μ in diameter with a smooth, thin membrane.

Biological characteristics: This *Amoeba* grows abundantly in our liquid or solid culture media provided living yeasts or bacteria are present. We have tested the lytic power on more than 60 different species of yeasts, on filamentous fungi and on bacteria. We succeeded in modifying at will the internal flora (feeding inclusions) of the *Amoeba*.

The different species of yeasts offer a gradation of sensibility to the lytic action of *Vahlkampfia debilis*. The yeast isolated from the original material was classified as *Pichia belgica* and it is as well phagocytosed as *Candida aldoii*, *C. deformans* or *C. zeylanoides*. On the contrary *Candida albicans*, the filamentous fungi (*Actinomyces*, *Mucedinaceae* and *Dematiaceae*) and gram positive bacteria are not attacked. The gram negative bacteria of the typhoid-dysenteric group are easily phagocytosed. The lytic action begins at the edges of the colonies and advances towards the center. At the end of 3 or 4 days a lacunar halo is formed around each colony, consisting of a pure growth of vegetative amoebae. Nevertheless the yeasts or bacteria do not disappear completely and a biological equilibrium is established between the amoeba and its host. A lytic period is followed by a period of secondary development, especially in the yeast cells, and this in turn by another lytic period, this phenomenon is repeated several times.

The *Amoeba* is unable to digest the membrane of yeast cells or to inclose starch grains but it is able to phagocytose human or rabbit red blood corpuscles.

Optimum temperature for growth is 30°C. The cysts begin to appear after 2 or 3 days. The *Amoeba* keeps its vitality for 2 or 3 months at room temperature in culture media and still longer if dried in phosphoric vacuum and kept in the ice-chest. This *Amoeba* withstands a temperature of 0°, a water-bath at 45° for 20 minutes, or the action of a 20 % citric acid solution.

It develops in synthetic media with 3 % of ethylic alcohol.

Vegetative cells are quickly destroyed by fresh calf bile.

Pathogenicity for young cats is negative.

Agglutination and complement fixation-tests with sera of immunized rabbits are positive.

Intracutaneous inoculation of an aqueous extract of the *Amoeba*

in immunized rabbits produces a red papula of about one inch in diameter (allergy).

We want to call the attention of protozoologists on the peculiar characteristic of the vegetative *Amoeba* of ingesting its own cysts and especially on the curious multiplication by transverse septation of the cysts which occurs chiefly in liquid media.

RESUMÉ

Nous décrivons un phénomène de lyse des levures et des bactéries transmissible en série produite par *Vahlkampfia debilis* JOLLOS, 1917. La lyse s'opère avec des caractères comparables à celle produite par les ultravirus bactériophages.

Ce curieux phénomène s'est produit spontanément dans la nature dans une pomme encore attachée à l'arbre. Très probablement la levure s'est développée la première et ensuite l'amibe, apportée par des oiseaux ou des insectes.

Les caractères de l'amibe sont les suivants: Amibes végétatives de 8 à 49 μ de diamètre, mesurant plus fréquemment 15 μ environ de diamètre. Les autres caractères micro-morphologiques et cytologiques sont ceux des amibes du genre *Vahlkampfia*. Chaque amibe possède un seul noyau dont la membrane est à peine visible. Absence de réserves de glycogène et de phase flagellée.

Kystes: ovales, elliptiques ou plus rarement ronds de 6,12 μ à 11,47 \times 7,65 μ à membrane mince et lisse et avec un seul noyau.

Caractères biologiques: Cette amibe se développe très bien dans nos milieux de culture liquides ou solides, mais elle a besoin de se nourrir de levures ou de bactéries vivantes. Nous avons essayé son pouvoir lytique sur plus de 60 espèces différentes de levures, sur des champignons filamenteux et sur diverses bactéries et nous avons réussi à modifier à volonté la flore intérieure de cette amibe (inclusions alimentaires).

Il existe parmi les levures toute une gamme de sensibilité à la lyse. La levure isolée du matériel original a été classée comme *Pichia belgica* et est aussi facilement phagocytable que *Candida aldoii*, *C. deformans* ou *C. zeylanoides*. Par contre *Candida albicans*, les champignons filamenteux (*Actinomyces*, *Mucedinaceae*, et *Dematiaceae*) et les bactéries Gram positives ne sont pas lysables.

Les bactéries gram négatives du groupe typho-dysentérique sont au contraire rapidement lysées.

La lyse débute par les bords des colonies et progresse vers le centre. Au bout de 3 ou 4 jours il se forme autour des colonies parasitées, une auréole lacunaire constituée par le développement de

l'amibe végétative à l'état pur. Les levures ou les bactéries ne disparaissent pas complètement sous l'action de l'amibe, s'établissant alors une espèce d'équilibre biologique dont à la période de lyse suit une autre de végétation de la levure ou de la bactérie.

Cette amibe est capable de phagocyter les hématies humains ou de lapin mais il lui manque la propriété d'englober les grains d'amidon et de digérer les membranes des cellules des levures.

Température optima pour le développement: 30°C. Elle résiste la température de la glacière à 0° et celle du bain-marie à 45° pendant 20 minutes.

Cette amibe est très aérophyle et ses kystes comencent à se former vers le deuxième ou troisième jour. Elle demeure vivante pendant 2 ou 3 mois dans nos milieux de culture et à la température du laboratoire. Desséchée dans le vide phosphorique et conservée dans la glacière elle peut résister davantage.

Elle n'est pas pathogène pour les jeunes chats.

Les formes végétatives sont rapidement lysées par la bile fraîche de boeuf.

Les sérums de lapin immunisés agglutinent rapidement les formes végétatives et fixent le complément avec un extrait de l'amibe. L'inoculation intra-dermique du même extrait produit chez les lapins immunisés une réaction allergique franchement positive.

Nous voulons attirer l'attention des protozoologistes sur la faculté des amibes végétatives de phagocyter ses propres kystes et spécialement sur la curieuse multiplication des kystes par cloisonnement transversal.

BIBLIOGRAFIA

- HAMBURGER, C. 1905. Zur Kenntnis der *Dunaliella salina* und einer Amöba aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch. f. Protistenkunde*, Bd. 6, 1905, pp. III-130.
- NERESHEIMER, E. 1905. Ueber vegetative Kernveränderungen bei *Amoeba dofleini* nov. sp. *Arch. F. Prot.*, Bd. 6, 1905, pp. 147-165.
- PENARD, E. Observation sur les amibes à pellicule. *Id.*, pp. 175-206.
- SCHUBOTZ, H. Beiträge zur Kenntnis der *Amoeba proteus* (Pall.). *Id.*, pp. 1-46.
- BEAUREPAIRE ARAGAO, H. DE. Sobre a *Amoeba diplomitotica* n. sp. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, vol. 1, 1909, pp. 33-43.
- HARTMANN, M. Nova Ameba intestinal, *Entamoeba testudinis* n. sp. *Id.*, vol. II, 1910, pp. 3-10.
- HARTMANN, M. e CHAGAS, C. Sobre a divisão nuclear da *Amoeba hyalina* Dang. *id.*, pp. 159-167.
- GRUBER, K. Ueber eigenartige Körperformen von *Amoeba proteus*. *Arch. f. Protistenkunde*, Bd. 23, 1911, pp. 253-261.

- WHITMORE, E. R. Parasitäre und freilebende Amöben aus Manila und Saigon und ihre Beziehungen zur Dysenterie. *Arch. f. Prot.*, Bd. 23, 1911, pp. 71-79.
- WHITMORE, E. R. Studien ueber Kulturamöhen aus Manila. *Id.*, pp. 81-95.
- CHATTON, E. et LALUNG-BONNAIRE. Amibe limax (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interpretation des amibes de cultures. *Bull. Soc. Path. Exot.*, t. V, 1912, pp. 135-143.
- CHATTON E. *Entambide* (Loeschia sp.) et Myxomycète (*Dyctiostelium mucoroides* Brefeld) d'un singe. *Id.*, pp. 180-184.
- HARTMANN, M. Untersuchungen ueber parasitische Amöben. *Arch. F. Protistenkunde*, Bd. 24, 1912, pp. 163-181.
- HARTMANN u. WHITMORE, E. *Id.*, pp. 182-194.
- NOLLER, W. *Entamoeba anastomi* nov. sp. *Id.*, pp. 195-199.
- PROWAZEK, S. VON. Handbuch der pathogenen protozoen. Leipzig, 1912.
- ARND, A. Ueber generative Vorgänge bei *Amoeba chondrophora* n. sp. *Arch. f. Protist.*, Bd. 34, 1914, pp. 39-59.
- BOETJER, W. A. and SELLARDS, A. W. Continuous propagation of amoebic dysentery in animals. *Bull. of the J. Hopkins Hosp.*, vol. XXV, 1914, n° 280, pp. 165-173.
- BOETJER, W. A. The behavior of amoebic dysentery in lower animals and its bearing upon the interpretation of the clinical symptoms of the disease in man. *Id.*, pp. 237-241.
- SELLARDS, A. W. e BOETJER, W. A. The experimental production of amoebic dysentery by direct inoculation into the caecum. *Id.*, n° 285, pp. 323-328.
- BENREND, K. Kurze Angaben über eine nichtpathogene Amöbe aus dem Darm von *Macaccus rhesus*. *Arch. f. Protist.*, Bd. 34, 1914, pp. 35-38.
- HARTMANN, M. u. SCHILLING, C. Die pathogenen protozoen, Berlin, 1917.
- SCHAEFFER, A. A. Notes on the specific and other characters of *Amoeba proteus* Pallas (Leidy), *A. discoides* spec. nov. and *A. dubia* sp. nov. *Arch. f. Protist.*, Bd. 37, 1917, pp. 204-228.
- OCHLER, R. Amöbenzucht anf reinem Boden. *Arch. J. Prot.*, Bd. 27, 1917, pp. 175-190.
- DOBELL, CL. and JEPPE, M. W. A study of the diverse races of *E. histolytica*, etc. *Parasitology*, vol. X, 1917-1918, pp. 320-351.
- DOBELL, CL. *Dientamoeba fragilis*. n. g., n. sp., a new intestinal Amoeba from man. *Parasitology*, vol. X, 1917-18, pp. 352-367.
- DOBELL, CL. Experiments on the therapeutics of Amoebic dysentery. *The J. of Pharmac. & Experim. Therap.*, vol. X, 1917-18, n° 6, pp. 399-458.
- JOLLOS, V. Untersuchungen zur morphologie der Amebenteilung. *Arch. of Prot.*, Bd. 37, 1917, pp. 229-275.
- DOBELL, CL. Cytological studies of three species of *Amoeba*. *A. lacertae*, Hart., *A. glebae* n. sp., *A. fluviales* n. sp. *Arch. F. Protist.*, Bd. 34, 1914, pp. 139.
- DOBELL, CL. Are *Entamoeba histolytica* and *E. ranarum* the same species?. An inquiry. *Parasitology*, vol. X, 1918, pp. 294-310.
- DOBELL, CL. The *Amoeba* living in man. London, 1919.
- DOBELL, CL. a. O'CONNOR, F. W. The intestinal Protozoa of man. London, 1921.
- MINCHIN, E. A. An introduction to the study of the protozoa. London, 1922.
- CALKINS, G. N. The biology of the Protozoa. Philadelphia, 1926.
- WENYON, C. M. *Protozoology*. London, 1926.
- KNOWLES, R. An introduction to the medical protozoology. Calcuta, 1928.

- GORDON THOMSON, J. ROBERTSON, A. *Protozoology*. A manual for medical men. London, 1929.
- CASTELLANI, A. An Amoeba found in cultures of a yeast. Preliminary note. *The J. of Trop. Med. a Hyg.*, vol. 33, 1930, p. 160.
- CASTELLANI, A. An Amoeba growing in cultures of a yeast. *Id.*, p. 183, 221 y 237.
- CASTELLANI, A. An Amoeba-test as a possible additional test in the differentiation of certain bacteria. I., vol. 34, 1931, p. 83.
- VAN ROOYEN, C. E. The effect of Amoeba (*H. Castellani*) on bacterial cultures: a phenomenon simulating bacteriophagy. *The J. Trop. Med. a Hyg.*, vol. 34, 1931, p. 259.
- SIMIC, T. La resistance des amibes pathogénés á l'action du froid, de la chaleur et de la lumière solaire. *Ann. Parasit.*, t. VII, 1930, n° 3-4, pp. 225-230.
- TAGLIAFERRO, C. Pedilospora dactilopaga n. sp. a fungus capturing and consuming testaceous rhizopods. *J. Wáshington Ac. Sc.*, vol. XXIV, 1934, n° 9, pp. 395-402.
- BRUMPT, E. et LAVIER, G. Sur un genre nouveau d'amibe parasite *Hyalolimax* n. g. *Ann. Parasit.*, t. XIII, 1935, n° 6, pp. 551-558.
- DRECHSLER, C. A new mucedinaceous fungus capturing and consuming *Amoeba verrucosa*. *Mycologia*, vol. XXVII, 1935, n° 2, pp. 216-223.
- BRUMPT, E. Précis de parasitology. Paris, Masson Ed., 1936.
- CRAIG, C. F. and FAUST, E. C. Clinical parasitology. Philadelphia, 1937.
- DRECHSLER, C. New zoopagaceae capturing and consuming soil *Amoeba*. *Mycologia*, vol. XXX, 1938, n° 2, pp. 137-157.
- SCOTT, H. E. A history of tropical medicine. Baltimore, 1939.