

Nuevas aportaciones al conocimiento de la biología del bacilo de Koch y su ciclo evolutivo

Estudio biocitológico de velos, de cultivos de bacilo humano Ratti en patata glicerinada y de bacilo bovino Vallée en caldo glicerinado

por el Profesor D. JUAN HOMEDES RANQUINI

A pesar de la extensa bibliografía sobre la biología del bacilo tuberculoso y de la coincidencia de los autores en algunos aspectos, es difícil hacer una síntesis objetiva de las fases evolutivas de dicho germen, que aún no tienen un enlace perfecto para interpretar su ciclogenia.

Se da por seguro que el germen de la tuberculosis en la naturaleza, en condiciones de cultivo y en el organismo animal, presenta formas diferentes a los bacilos descubiertos por Koch hace 58 años.

El problema de la ciclogenia del bacilo tuberculoso ha sido estudiado por numerosos investigadores, que han relacionado las variaciones de la ácido-resistencia y las propiedades morfológicas y biológicas en los cultivos para descubrir si su multiplicación se realiza exclusivamente por segmentación transversal de las bacterias ácido-resistentes o si las demás formas encontradas —bacterias no ácido-resistentes, filamentos, gránulos, formas filtrantes y formas en levadura— representan fases de su ciclo evolutivo.

En los cultivos jóvenes se han encontrado formas no ácido-resistentes que pasan por una fase Gram-positiva (Klein, Mormorek, Krylow). Otros investigadores han identificado los gránulos no ácido-resistentes hallados en los cultivos viejos, con los encontrados por Much en el organismo enfermo, que han sido considerados por Vaudremer como esporas en el sentido botánico de la palabra.

Morton, C. Kahn, aislando por medio del micromanipulador de Chambers un solo bacilo ácido-resistente y estudiando su evolución en los cultivos, ha observado que entre el primero y tercer día, el bacilo se disgrega en gránulos que aumentan activamente formando un acúmulo de corpúsculos pequeñísimos que son no ácido-resistentes

y probablemente filtrables. De estas partículas, a menudo agrupadas, nacen delicadísimos filamentos, al principio no ácido-resistentes y Gram-negativos, que solamente en una fase ulterior se transforman en Gram-positivos y después en ácido-resistentes. Dicho ciclo tiene una duración de 8-10 días (en ocasiones 36 días). Los bacilos jóvenes no se dividen nunca por segmentación.

Sanarelli y Alessandrini han demostrado que el ultravirus tuberculoso es la expresión ultramicroscópica de una fase particular del ciclo de desarrollo del bacilo de Koch, señalado por vez primera por Fontes. Dichos autores han visto que el ultravirus tuberculoso es frágil y de un débil poder patógeno, y que de esta forma filtrante derivarían las formas filamentosas iniciales, encontradas por Kahn, y que denominan *protogenes tuberculosos*.

Sweany, piensa que el bacilo ácido-resistente puede multiplicarse por división directa (opinión compartida por Oerskar, Kirchenstein, Nedelkovitch). Si el medio es favorable, pero en condiciones adversas de cultivo, se disgrega en gránulos, de cuya materia nuclear condensada saldrían finos filamentos no ácido-resistentes y Gram-positivos, que en una fase posterior se transformarían en bacilos ácido-resistentes. Si las condiciones de cultivo son muy desfavorables, los gránulos perderían definitivamente la ácido-resistencia y la capacidad de dar bacilos, y sólo se multiplicarían como gránulos dando colonias de cocos y tetradas.

Bezançon y Philibert, estudiando cortes de velos jóvenes procedentes de cultivos en medios líquidos, deducen que el bacilo tuberculoso para multiplicarse pasa por un ciclo complicado. En el interior de los bacilos ácido-resistentes maduros se forman los gránulos Gram-positivos, corpúsculos cromófilos, de los que nacen largos filamentos no ácido-resistentes, cianófilos, que se transforman en bacilos ácido-resistentes en los que vuelven a producirse nuevos corpúsculos cianófilos, que comienzan otra vez el ciclo.

Para estos autores, el bacilo ácido-resistente sólo representa una fase en la vida del germen tuberculoso, y las formas jóvenes serían los filamentos no ácido-resistentes de tipo miceliano que se encuentran en los velos de los cultivos en medio líquido. Los bacilos ácido-resistentes solamente aparecen en una segunda fase, de la que se pasa a una tercera en que disminuye su número y abundan los gránulos cromófilos, que serían los elementos resistentes de los cuales derivarían las nuevas generaciones.

Según esto, la substancia cianófila representaría el micelio y los

gránulos, las conidias de un microorganismo perteneciente al grupo de los actinomicetos. Estos puntos de vista han sido aceptados por numerosos autores (Vaudremer, Negre, Boquet, Voltis, Lieske, etc.) y por la Comisión Americana que, al hacer la revisión de la clasificación de las bacterias, ordena al germen de la tuberculosis en el mencionado grupo de los actinomicetos.

Weissfeiler ha estudiado por método histológico cultivos en medio Holm, observando que en algunos cultivos las colonias se fijan muy profundamente en el medio nutritivo, el cual llegan a licuar, demostrándose una acción proteolítica. El examen de la papilla así formada mostraba bacilos y cadenas de bacilos Gram-positivos, gránulos no ácido-resistentes, abundando sin embargo las formas ácido-resistentes. En cultivos de 3-8 semanas, fijados por formol y coloreando los cortes por los métodos de Ziehl y Gram, observó que la substancia cianófila se encontraba entre masas rojas de bacterias, pero en cantidad muy inferior a la indicada por Bezançon y otros, en medios de cultivo líquido. La substancia cianófila es Gram-negativa, mientras que los bacilos no ácido-resistentes son Gram-positivos. En el punto de unión de la capa más inferior del cultivo y la superior del medio nutritivo, las bacterias no ácido-resistentes abundan más, presentando en algún punto una estructura fibrilar.

Reensterne, ha observado en sus cultivos, gérmenes parecidos a las levaduras que coloca en el grupo de los oídios. Estas formas en levaduras han sido encontradas también por Pla Armengol, Vaudremer, Kostyrko y Maher, generalmente en sedimento de cultivos viejos en caldo glicerinado.

Hollande, con pequeñas variantes, participa de los puntos de vista de Bezançon y Philibert; pero supone, además, que las formas vegetativas del bacilo de Koch se transformarían en elementos cocoides, que originarían las formas ramificadas terminadas por unos ensanchamientos en mazas, que Metchnikoff incluyó entre los *Streptothrix*. Admite dicho autor que los elementos mazudos serían aparatos sexuales (gametos) y que la conjugación se produciría por la unión de dos mazas que, a pesar de su parecido morfológico, por tinción evidenciarían su heterogeneidad, por el hecho de ser una de ellas cianófila y la otra eritrófila. El óvulo se formaría en el seno de un esporangio eritrófilo, del que saldría un filamento microbiano que al multiplicarse daría lugar a las formas propias del bacilo tuberculoso.

El que hayamos caído en tentación de investigar este tema se debe al convencimiento de que en los estudios realizados, a pesar de su im-

portancia, no se ha tenido en consideración, que sepamos, la aplicación de técnicas citológicas de uso frecuente en cariología y parasitología, que podían dar alguna luz sobre las formas en levadura y en maza, descritas constantemente por numerosos investigadores.

MATERIAL Y TÉCNICAS

El material estudiado procede de cultivos de bacilo humano Ratti en patata glicerizada y cultivos de bacilo bovino Vallée en caldo glicerizado, de 35 y 40 días respectivamente.

De los cultivos de bacilo humano en medio patata glicerizada se han recogido trozos de patata con su correspondiente velo, y de los de bovino en caldo glicerizado, velos y colonias costrosas, en distintos estados evolutivos, que han sido separados y sumergidos en el líquido fijador con precaución, para evitar su deterioro, dado lo frágil y deleznable del material.

La fijación se ha conseguido de un modo perfecto mediante el líquido fijador de Flemming con una permanencia en el mismo no inferior a 24 horas, siguiendo los trámites inherentes a dicha técnica.

Para la coloración se han empleado métodos distintos, según la clase de material. Para el bacilo humano en medio patata glicerizada, la hematoxilina férrica de Heidenhain, y el método de Ziehl-Nelssen y azul de metileno. Para los velos y colonias de bacilo bovino en caldo glicerizado, el método de Benda para diferenciación de cromosomas y mitocondrias, modificado (en su segunda parte) de la manera siguiente: Mordiente alumbre férrico amoniacal al 4 %, 24 horas, y tinción en 1 c. c. de una solución acuosa saturada de sulfalizarinato sódico con 80-100 c. c. de agua destilada, 24 horas; lavar rápidamente en agua destilada. En un segundo tiempo, teñir con solución acuosa a saturación (recién filtrada) de violeta de genciana, lavar con agua y actuar el lugol Nawaschin, durante 25-50 segundos. Lavar rápidamente con alcohol de 95°, deshidratar y diferenciar con esencia de clavos, xilol, y montar.

Por este método, la cromatina se tiñe de rojo muy intenso, mientras que el citoplasma toma un color añil. Los granitos cromófilos, Gram-positivos, se tiñen de violeta intenso; contrariamente a los Gram-negativos que se tiñen lo mismo que el citoplasma.

La obtención de cortes se ha hecho a partir del material incluído en parafina, previa deshidratación pasando al xilol y de éste a la parafina blanda (punto de fusión 41°-42°) donde ha permanecido por espacio

de 24-48 horas a la temperatura de fusión; después de ésta a la parafina dura (punto de fusión 50°-51°) con una permanencia de 24 horas para ser incluido. De los bloques se han hecho series completas de cortes de un espesor de 9 micras.

ESTUDIO DE LOS CULTIVOS DE BACILO TUBERCULOSO HUMANO EN MEDIO DE PATATA GLICERINADA

De este material se han estudiado cortes seriados que fueron teñidos por la hematoxilina férrica y por el Ziehl-Nelssen y azul de metileno.

Los cortes sagitales de los velos en medio de patata glicerizada, a pequeños aumentos, presentan replegamientos circulares o colonias, de bordes festoneados, que se superponen formando estratos sobre el medio de cultivo. En estos replegamientos o colonias se aprecia una zona bacilar muy densa que se proyecta al interior formando entrantes, entre los cuales se observan delicadísimos velos apenas coloreables, que contrastan con la zona bacilar mencionada, que ofrece gran aptitud tintórea por la laca férrica. Los cortes frontales tienen estructura análoga a los sagitales, lo que demuestra que los sucesivos replegamientos del velo, durante el desarrollo del cultivo, dan a las colonias formas más o menos esferoidales y verrugosas (micros n.º 1 y 2). Los velos encontrados en el interior de las colonias los hallamos también entre éstas y el medio de cultivo.

Las preparaciones de cortes teñidos por el Ziehl-Nelssen y azul de metileno demuestran que los bacilos ácido-resistentes se sitúan en la zona más periférica del velo y en las partes profundas de éste en contacto con el medio de cultivo, que se colorean de rojo; mientras que en el interior de las colonias, los finos velos no ácido-resistentes, se tiñen de azul, lo que nos fuerza a admitir que están constituidos por la substancia cianófila descubierta por Bezançon y Philibert; en cambio la parte bacilar inmediata a los velos cianófilos se tiñe de un verde azulado.

Observando estas mismas partes a grandes aumentos (inmersión) puede verse que los velos cianófilos tienen aspecto pulverulento, hallándose en los límites extremos de la visibilidad, cuya nebulosa se resuelve en pequeños bacilos homogéneos, a veces granulosos, aislados o agrupados, delicadísimos e incurvados; ello muy semejante a las formas evolutivas precoces descritas por Kahn y comprobadas por

otros autores (Sanarelli y Alessandrini), como elementos iniciales derivados del ultravirus tuberculoso.

Entre estos velos y en el interior del primer estrato celular de la patata hemos hecho un descubrimiento de considerable importancia que permite clasificar el germen de la tuberculosis como un hongo posiblemente perteneciente a la clase de los Mixomicetos, por encontrar todas las formas evolutivas de dicho organismo, en íntima conexión con el bacilo de Koch, que en definitiva sólo representaría su fase esporular. De la espora o corpúsculo de Much, derivarían las zoosporas, las formas de conjugación, los quistes, las mixamibas y los plasmodios que al fructificar formarían los velos. Al describir a continuación el ciclo evolutivo haremos mención de todas estas formas.

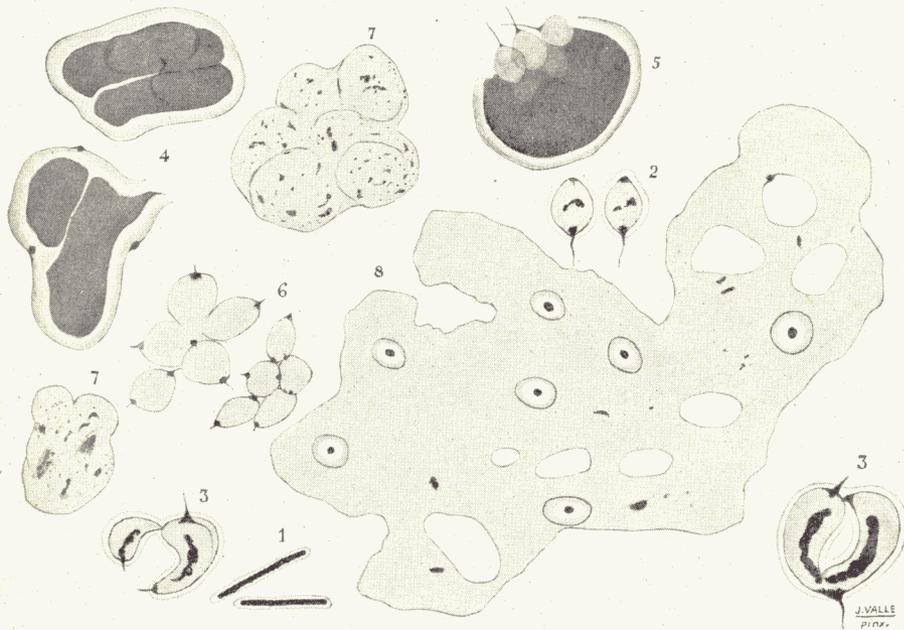
El corpúsculo de Much, masa cromática altamente condensada, está formada por varias esporas; cuando germina, aumenta de volumen y se disgrega eliminando uno tras otro los corpúsculos que le componen, dando la impresión de sucesivas gemaciones. Estos gránulos son muy refringentes y su núcleo toma con dificultad la hematoxilina. Libres en el medio de cultivo, crecen y se transforman en seguida en zoosporas provistas de un fino flagelo: tienen forma ovoidea, núcleo central y un corpúsculo en la base del flagelo y otro en el lado opuesto.

Estas zoosporas, que se encuentran entre los velos cianófilos y muy especialmente en el substratum celular del medio de cultivo, en un momento dado entran en fase multiplicativa, dividiéndose: las células hijas se desprenden del interior de un pequeño quiste que aún conserva el flagelo. Este fenómeno es muy corriente y parece obligado cuando la zoospora ha alcanzado cierto desarrollo, lo que induce a sospechar que dicho proceso se relaciona con la reducción cromática de dichos elementos.

Los procesos de conjugación subsiguientes demuestran que deben de existir dos clases de gametos (+) y (—) provenientes de las divisiones que preceden.

La conjugación se realiza por fusión de la masa citoplásmica, en sus extremos, de dos individuos (+ y —), de forma que a pesar de estar muy juntos queda entre ellos una separación que no se cierra del todo, persistiendo en fases sucesivas una escotadura en los extremos libres. Efectuada la conjugación, los núcleos se alargan, curvándose y fusionándose por el extremo en que se unieron los citoplasmas, adoptando forma de herradura. Este elemento, denominado cigote, puede ser bi, tri o tetranuclear, en casos excepcionales, por haberse reunido y conjugado, cuatro, seis y ocho gametos, res-

pectivamente. Mientras tanto crecen considerablemente, transformando su contenido en una masa cromática picnótica que invade casi toda la célula; cuando esto ocurre, el ectoplasma, que era muy refringente, adquiere colorabilidad (¿quitinización?) transformándose en un quiste, que al llegar la madurez expulsa zoosporas en número imposible de precisar, que rápidamente se transforman en mixamibas y



Esquema n.º 1

Formas evolutivas encontradas en velos de bacilo tuberculoso humano en patata glicerizada

Coloración Hematoxilina férrica

1. Bacilos de Koch. — 2. Zoosporas. — 3. Formas conjugadas. — 4. Zigotes. — 5. Quiste. — 6. Mixamibas fusionándose. — 7. Formas iniciales de plasmodios. — 8. Plasmodio.

éstas, agrupándose y fusionándose, en plasmodios (esquema n.º 1). Mientras se desarrollan todos estos procesos en la capa celular superficial del medio de cultivo, las formas evolutivas y vegetativas del mixomiceto van destruyendo y consumiendo el contenido de las células (micros n.º 3 y 4). Los quistes, las mixamibas y los plasmodios abundan también mucho en el inferior de las colonias (micro n.º 5).

Los plasmodios, si no se hace un detenido examen pueden fácilmente confundirse con restos celulares de la patata; estas dificultades

desaparecen cuando se examinan en el interior de las colonias. Los plasmodios son relativamente pequeños, lobulados, constituyendo masas citoplásmicas notablemente vacuolizadas con numerosos núcleos (micro n.º 6 y esquema n.º 1).

La evolución de los plasmodios guarda íntima relación con la formación de los velos cianófilos, porque cuando aquéllos llegan al momento de la fructificación, sin formación de órganos especiales, se convierte todo el plasmodio, previa disgregación y dispersión cromática, en una masa esponjosa que forma como una nébula de la que surgen los velos cianófilos con su cortejo de formas bacilares jóvenes, no ácido-resistentes y Gram-negativas, que en fase posterior se transforman en Gram-positivas y después en ácido resistentes (micro n.º 6).

ESTUDIO DE LOS CULTIVOS DEL BACILO TUBERCULOSO BOVINO EN EL MEDIO CALDO GLICERINADO

Como en el caso anterior, se han estudiado cortes seriados de velos que han sido teñidos exclusivamente por el método de Benda, modificado según se indica en la técnica.

Las colonias en la superficie del medio son costrosas y se organizan por reunión de acúmulos bacilares separados por areolas y delimitados en sus contornos y superficie por apretados haces de bacilos que se disponen adoptando formas abovedadas (micro n.º 7).

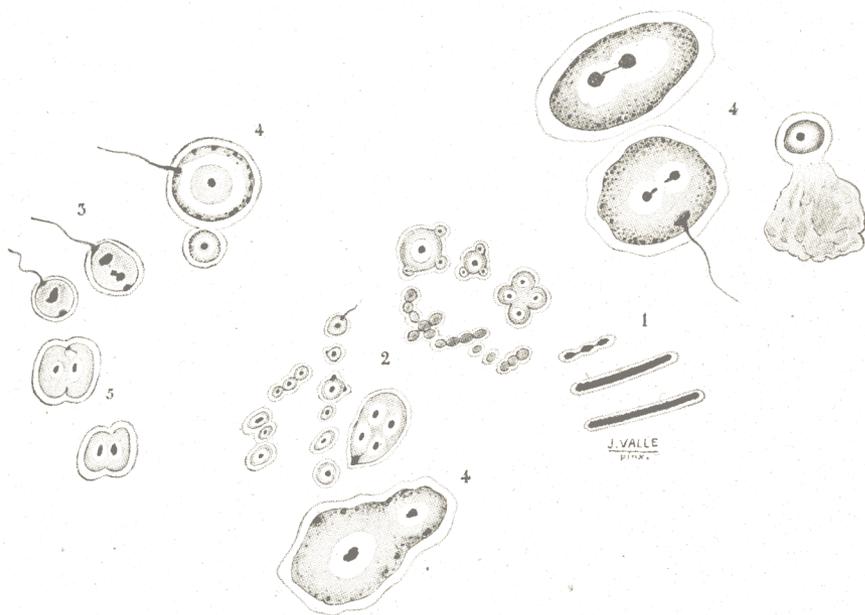
Los velos presentan distintas fases evolutivas que se distinguen por su variable comportamiento frente a los colorantes. En la zona areolar próxima a las colonias, los bacilos y sus granulaciones son Gram-positivos; en otras zonas colindantes, velos jóvenes, bacilos y granulaciones son Gram-negativos.

Entre el tipo de colonias descritas e insertándose en ellas, hemos sorprendido tenues velos de forma laminar constituyendo largos cordones ramificados, que ha sido fácil identificarlos como plasmodios ramificados (micros n.º 8 y 9). A grandes aumentos se han estudiado las mallas de este plasmodio, compuesto de una substancia fundamental apenas coloreable, sobre la que se observan unos abultamientos, cromáticos por su tinción, piriformes, los cuales con pequeñas variantes (filamentos retorcidos, masas lobuladas) representan los órganos fructíferos o esporangios (micro n.º 10).

Estos órganos experimentan una serie de procesos evolutivos, relacionados con la fructificación, que interpretamos de la siguiente forma: por efecto de una progresiva vacuolización se hinchan extra-

ordinariamente y se deshacen en finas granulaciones cromáticas, embebidas de una substancia especial (cianófila), como si del líquido vacuolar se separara la substancia que más tarde adquiere plasticidad filamentosa. Al estallar los esporangios con su contenido cromidial, surge una nebulosa filamentosa que muestra perfecta continuidad con los velos Gram-negativos. Estos fenómenos se suceden con relativa simultaneidad y a lo que parece, con bastante rapidez, desembocando a la formación de velos areolares, jóvenes, Gram-negativos, que posteriormente, como ya se ha dicho, se transforman en Gram-positivos. Todo ello ha podido apreciarse con notable claridad, como demuestran las microfotografías n.º 11, 12; 13 y 14.

Entre las colonias y las mallas de los velos han sido vistas las mismas formas evolutivas del supuesto mixomiceto, ya observadas en los velos de cultivos de patata glicerizada. En este caso las observaciones han sido todavía más precisas, en cuanto a su germinación,



Esquema n.º 2

Formas evolutivas encontradas en velos de bacilo tuberculozo bovino en caldo glicerizado

Coloración Benda modificado

1. Bacilos de Koch. — 2. Formas evolutivas a partir del corpúsculo de Much.
3. Zoosporas. — 4. Fases de enquistamiento y división de las zoosporas.
5. Fases sospechosas de conjugación.

paso del corpúsculo de Much a las formas granulares, que posteriormente se transforman en zoosporas, porque las esporas y zoosporas se tiñen bastante bien: los núcleos, de rojo intenso; el citoplasma granuloso y condensado sobre el ectoplasma, de añil claro; igualmente se tiñen de rojo los corpúsculos polares. Los procesos de multiplicación de las zoosporas se aprecian con bastante claridad, lo mismo que la expulsión de las células hijas. En este caso los pequeños quistes se vacían, comprobándose el arrugamiento del ectoplasma que aún presenta el flagelo erecto. (Esquema n.º 2.)

Hay sin embargo que destacar como dato interesante, que en este medio de cultivo líquido no hemos visto las formas de conjugación, tan claramente observadas en el cultivo de bacilo humano en medio sólido. No obstante, de vez en cuando, han sido observados algunos elementos aproximarse como si se tratara en efecto de una conjugación; pero el hecho de no haber encontrado ningún cigote, ni quiste, hace sospechar que las imágenes de referencia, más que formas conjugadas, son células hijas que no se han separado por completo después de la partición. Además, debe de ser esto así, porque de existir la conjugación, dado el número de preparaciones revisadas y la frecuencia de estas formas cuando existen, no hubieran pasado inadvertidas. Abona este supuesto el hecho de que puede percibirse la transformación de las zoosporas en mixamibas que se reúnen formando conglomerados que ha sido posible microfotografiar (micro n.º 15).

De cuanto acabamos de decir se deduce que los núcleos de los plasmodios deben ser haploides (aceptando el hecho de una reducción cromática durante las divisiones multiplicativas de las zoosporas) y que deben copularse una vez constituídos aquéllos, como ocurre frecuentemente en algunas especies de mixomicetos (*Didymium difforme*) para formar los cigotes de los que derivarán los esporangios.

CONSIDERACIONES FINALES

Se puede argüir que los cultivos objeto de estudio, podían hallarse contaminados por el supuesto mixomiceto, dado que estos organismos viven corrientemente en simbiosis con bacterias y hongos. A esto, puede contestarse, que no deja de ser una coincidencia muy significativa que en todos los medios de cultivo se haya encontrado el mixomiceto de referencia.

Por otro lado, la concordancia perfecta entre las formas evolutivas del supuesto mixomiceto, con las que describen numerosos investiga-

dores del germen de la tuberculosis, hace pensar con fundamento que dicho germen sea un hongo mixomiceto, cuya vida vegetativa no ha sido descubierta.

Como nuestras investigaciones prosiguen, adelantaremos solamente que el supuesto *mixomiceto de la tuberculosis* guarda indudables analogías con el orden de las Plasmodioforáceas (que contiene algunas especies *hipertrofiantes*), cuya sistemática es todavía dudosa porque en algunos caracteres citológicos presenta semejanzas con el orden de los Arquimicetos (quitridiáceas), situados entre los Ficomicetos inferiores. Dentro del orden de los Arquimicetos, el parásito descubierto, presentaría analogía con *Olpidium Viciae*.

CONCLUSIONES

1.^a El germen de la tuberculosis debería identificarse con el supuesto mixomiceto encontrado en los velos de cultivos de bacilos tuberculosos, humano (Ratti) y bovino (Vallée), que presenta notables analogías con el orden de las Plasmodioforáceas hipertrofiantes, que se relacionan citológicamente con el orden de los Arquimicetos.

La fase miceloide del bacilo de Koch representaría solamente un aparato esporífero.

2.^a El corpúsculo de Much tendría significación de spora pluricorpuscular; él produciría numerosas zoosporas que al completar su desarrollo, mediante divisiones multiplicativas, por reducción cromática se transformarían en gametos.

3.^a En los medios sólidos (patata glicerinada), velos de bacilo humano, el mixomiceto presenta una fase de conjugación con formación de zigotes que se transforman en quistes, de los cuales derivan las mixamibas que constituyen los plasmodios. Estos no presentan esporangios apreciables, y en el momento de su fructificación se disgregan vacualizándose previa dispersión cromidial, constituyendo velos cianófilos, Gram-negativos.

4.^a En medios líquidos (caldo glicerinado), velos de bacilo bovino, el mixomiceto, a lo que parece, no presenta la fase conjugada, por lo que hay que suponer deben formarse *plasmodios haploides* en los que previa copulación de los núcleos se constituyen los esporangios, que al fructificar, se vacuolizan intensamente previa disgregación y dispersión cromidial surgiendo madejas de bacilos que forman los jóvenes velos cianófilos, Gram-negativos.

5.^a Las formas evolutivas del supuesto Mixomiceto están de

acuerdo con las formas evolutivas del bacilo de Koch, encontradas y descritas por numerosos investigadores.

Las zoosporas y sus fases multiplicativas y de conjugación han sido interpretadas como grandes cocos, diplococos y aun tetradas; los zigotes y quistes, como grandes formas en levadura; los esporangios, como formas mazudas; la disgregación y dispersión cromidial de plasmidios y esporangios, como ultravirus tuberculoso; las fases subsiguientes a la fructificación de los plasmidios ramificados (medio líquido), como velos jóvenes cianófilos, Gram-negativos.

BIBLIOGRAFIA

- BEZANÇON y PHILIBERT.—*La Presse Médicale*, n.º 3, p. 33, 1926.
- FONTES, A.—*L'ultravirus tuberculeux*.—Masson et Cie., París, 1932.
- GONZÁLEZ, P. y PIRONTI, L.—*Notes sobre la biología i la bacteriología del bacil tuberculós*.—*Arxius*, v. II, f. 1, p. 3, 1936.
- KAHN, M. C.—*Cycle de développement du bacille tuberculeux, d'après l'étude des germes vivants isolés*.—*Annales de l'Institut Pasteur*, T. XXIV, p. 259, 1930.
- KARWACKI, L.—*Variaciones biológicas del virus tuberculoso*.—IX Conferencia de la Unión Internacional contra la Tuberculosis, Varsovia, 1935.
- LÉGER, L.—*Un nouveau Myxomycète, endoparasite des Insectes*.—*Comp. Rend. Acad. Scienc.*, T. 145, p. 837, 1907.
- MICHALSKI, A. y SKUPIENSKI, F. X.—*Recherches écologiques sur «Physarum didermoides» Rast. Myxomycète endosporé*.—*Comp. Rend. Acad. Scienc.*, T. 208, p. 225, 1939.
- NEDELKOVITCH, J.—*Contribution à l'étude du mode de multiplication du bacille de Koch*.—*Annales de l'Institut Pasteur*, T. 57, p. 171, 1936.
- PLA y ARMENGOL, R.—*Sobre una nueva bacteriología de la tuberculosis*.—Conferencia pronunciada en la Academia Nacional de Medicina de Río de Janeiro, 1935.—Publicaciones del Instituto Ravetllat-Pla, julio, 1936.
- PLA y ARMENGOL, R.—*Sobre el polimorfismo del germen de la tuberculosis*.—*La Clínica*, año XIII, n.º 5, 1936.
- SANARELLI, G. y ALESSANDRINI, A.—*Etudes sur l'ultravirus tuberculeux (2º mémoire). Les protogènes du virus tuberculeux*.—*Annales de l'Institut Pasteur*, T. L., p. 167, 1933.
- SKUPIENSKI, F. X.—*Sur le cycle évolutif chez une espèce de Myxomycète Endosporée, «Didymium difforme» Duby*.—*Comp. Rend. Acad. Scienc.*, T. 182, p. 150, 1926.
- SKUPIENSKI, F. X.—*Etude bio-cytologique du Didymium difforme (Primera parte)*.—*Acta Societatis Botanicorum Polonial*, vol. V, n.º 3, 1928.
- STRASBURGER, E.—*Tratado de Botánica*.—2.ª edición española, Barcelona.
- SWEANY, H.—*American Rev. Tube.*, 17, núms. 53, 76, 1928.
- VAUDREMER.—*Le bacille tuberculeux*.—París, Les Presses Universitaires de France, 1927.
- WEISSFEILER, J.—*La cuestión de las formas no ácido-resistentes del germen de la tuberculosis*.—*Zentralblatt für die gesamte Tuberkuloseforschung*. Bd. 38, Heft 7/8, 1933.