

## Tesis de Posgrado

# Estudio sistemático de algunas bacterias del azufre

Spainí, Lydia Silvia

1942

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Spainí, Lydia Silvia. (1942). Estudio sistemático de algunas bacterias del azufre. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0297\\_Spaini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0297_Spaini.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Spainí, Lydia Silvia. "Estudio sistemático de algunas bacterias del azufre". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1942.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0297\\_Spaini.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0297_Spaini.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

ESTUDIO SISTEMÁTICO DE ALGUNAS BACTERIAS DEL AZUFRE.

por  
Lydia Silvia Spaini.

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Naturales  
en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
de la Universidad de Buenos Aires.

Año 1942.

---

La autora agradece a su padrino de tesis, Prof. Ing. Agr. Santos Soriano, la dirección de la misma y las valiosas sugerencias proporcionadas para su ejecución.

Este trabajo fue comenzado en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene y concluido en el laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de la Nutrición. Para llevar a cabo el mismo, la autora contó con toda clase de facilidades en los mencionados Institutos, por lo cual se complace en expresar aquí su agradecimiento a los respectivos directores: Prof. Dr. Alfredo Sordelli y Prof. Dr. Pedro Escudero.

---

## Introducción.

Entre los organismos que integran la flora microbiana de las aguas y del suelo, los comprendidos en la denominación de "bacterias del azufre", constituyen uno de los grupos más interesantes, ya sea considerado desde el punto de vista de su morfología, como también atendiendo a su tipo particular de metabolismo.

En este grupo se encuentran formas de gran tamaño, entre las cuales algunas son unicelulares y otras filamentosas; estas últimas pueden a su vez ser libres y dotadas de un movimiento análogo al de las Coscillatoria o bien ser fijas e inmóviles. Existen también representantes de este grupo que no se distinguen en nada por su forma y dimensiones de las bacterias comprendidas en el orden de las Eubacteriales, caracterizado por reunir a todas las formas simples, no diferenciadas.

Fisiológicamente se las incluye entre las bacterias autótrofas, porque muchas de ellas poseen la propiedad de formar la sustancia orgánica de sus células utilizando anhídrido carbónico como fuente de carbono y la energía necesaria para este proceso les es proporcionada por la oxidación del azufre o sus compuestos. En esta forma efectúan quimiosíntesis y por utilizar como fuente de energía la oxidación de sustancias inorgánicas, pertenecen al grupo de organismos que Winogradsky llamó "anorgoxidantes".

Algunas bacterias del azufre presentan la característica interesante de poseer pigmento rojo o verde, gracias a los que

además de efectuar quimiosíntesis, son capaces de llevar a cabo fotosíntesis como sucede en las plantas verdes, teniendo a su cargo los pigmentos el mismo papel que la clorófila en los vegetales superiores.

En el ciclo del azufre en la naturaleza se producen oxidaciones y reducciones en las que las bacterias hacen un papel muy importante. En este ciclo se pueden considerar varias etapas: en una de ellas los compuestos orgánicos con azufre provenientes de restos animales o vegetales, son transformados por los microbios de la putrefacción hasta ácido sulfhídrico; otra etapa consiste en la oxidación del ácido sulfhídrico hasta azufre y de éste hasta ácido sulfúrico, la que es llevada a cabo por las bacterias del azufre. Este ácido es neutralizado por los carbonatos, completándose en esta forma la transformación del hidrógeno sulfurado en sales del ácido sulfúrico, de modo que, un compuesto nocivo para las plantas puede, por su oxidación hasta sulfatos, servir para la alimentación de las mismas.

El ácido sulfhídrico utilizado en las reacciones citadas, puede provenir también de la reducción de sulfatos que se efectúa por otro proceso microbiano llevado a cabo por bacterias específicas para esa transformación. Sólomente son consideradas bacterias del azufre, las que son capaces de producir oxidaciones de este elemento o de alguno de sus compuestos.

En la última edición del libro de Bergey, en 1939, las bacterias del azufre capaces de depositar en sus células el azufre proveniente de la oxidación, se separan de las que no poseen esa propiedad, formando el orden de las Thiobacteriales con las primeras y todas las bacterias que contienen bacteriopurpurina, e incluyendo en la familia Nitrobacteriaceae, dentro del orden

de las Eubacteriales, a las bacterias que poseyendo un metabolismo semejante, no son capaces de depositar azufre en el interior de su protoplasma.

En el presente trabajo se tratan algunas de las bacterias del azufre, considerando como tales a las bacterias capaces de utilizar azufre o sus compuestos. Por lo tanto se describen formas pertenecientes al orden de las Thiobacteriales y también representantes del género Thiobacillus, que están incluidos en la familia Nitrobacteriaceae.

El objeto del trabajo ha sido el de conocer los ejemplares de las bacterias del azufre que pudieran encontrarse en los alrededores de Buenos Aires. Para lograr dicho fin, una vez enriquecidas las diferentes formas, se intentó en lo posible la obtención de cultivos puros, para describir las cepas aisladas y llegar a la determinación de su posición sistemática.

---

## Capítulo I.

### Antecedentes.

Las bacterias del azufre dieron lugar a un gran número de trabajos desde hace muchos años; las observaciones se hicieron en su mayor parte en materiales provenientes de fuentes sulfurosas. Entre las más antiguas se citan las de Beggiato, en 1838 y Sorren, en 1841, quien encontró un organismo rojo denominándolo Monas rosea. Trevigan, en 1848, creó el género Beggiatoa para incluir ciertas bacterias filamentosas del agua. Meneghini, en 1842, mencionó la formación de películas rojo-violetadas sobre el fondo de termas de azufre.

Lothar Meyer, en 1864, estudiando las fuentes sulfurosas de Lansecker, llegó a la conclusión que la cantidad de ácido sulfúrico de las aguas dependía de la proporción de Beggiatoaceae en las mismas.

Se trató de explicar el origen y la composición de los gránulos oscuros, refringentes, que se observaban en el protoplasma celular: Dramer, en 1870, mencionó la existencia de gránulos de azufre en el interior de las Beggiatoa. Cohn, en 1878, describió otras bacterias con gránulos de azufre, los que según él, provenían de la oxidación del ácido sulfúrico de las aguas; creyó, además, que estas bacterias eran capaces de formar el ácido sulfúrico por reducción de sulfatos. Atard y Clivier, en 1882, atribuyeron el mismo origen a los corpúsculos de azufre, basándose en la observación de que las Beggiatoa en líquido sin sulfatos pier-

den el azufre , el que vuelve a aparecer si al líquido se le agrega yeso.

Winogradsky fue el encargado de demostrar, en 1887, que el ácido sulfhídrico es producido por otros organismos: Por fermentación de la celulosa se produce anhídrido carbónico y metano; este último, al estado nascente, reduce al sulfato de calcio dando lugar a la formación de ácido sulfhídrico. Los gránulos de azufre en el interior de las Beggiatoa provienen de la oxidación de dicho ácido, llevada a cabo por las mismas. Winogradsky las consideró bacterias autótrofas y por tener el azufre un papel importante en su metabolismo las llamó "Schwefelbakterien" o "bacterias del azufre".

Las bacterias rojas atrajeron también la atención de los investigadores. En 1888, Engelmann, estudió la influencia de la luz sobre las bacterias poseedoras de pigmento y dedujo que estos organismos eran fotosintéticos.

La oxidación de tiosulfatos hasta azufre, producida por bacterias aisladas de agua de mar, fue observada por Nathanson, en 1902. En 1904,  Beijerinck, aisló y describió estos mismos gérmenes que encontró en agua de canal y propuso denominarlos Thiobacillus thioparasus.

En 1905, Corsini, efectuó diversas reacciones para llegar a demostrar la naturaleza de los corpúsculos que se encontraban en el interior de las células, comprobando que se trataba de azufre al estado fluido, oleoso, lo que ya había sido observado por Winogradsky

Molisch, en 1907, en su trabajo sobre bacterias purpúreas, se refirió principalmente al grupo de gérmenes rojos que no son verdaderas bacterias del azufre, porque este elemento no



tiene a su cargo un papel importante para la vida celular. Este autor concluyó que las bacterias purpúreas, mediante fotosíntesis, asimilan sustancias orgánicas y que los pigmentos bacterioclorina y bacteriopurpurina, tienen la misma función que la clorófila y la carotina en la asimilación del anhídrido carbónico por las plantas verdes.

Keil, en 1912, trabajó sobre Seggiatoa y Thiothrix y obtuvo cultivos puros mediante repetidos lavados del material con el agua de la misma fuente sulfurosa estudiada, consiguiendo desarrollo de los filamentos en cajas con el agua de la fuente, colocadas bajo campana con una mezcla determinada de oxígeno, anhídrido carbónico y ácido sulfhídrico.

Nadson, en 1912, describió las bacterias verdes como organismos relacionados con las algas, con clorófila inactiva.

Mc. Lean, en 1918, observó que en una mezcla de suelo, fosfato tricálcico y azufre, este último elemento era rápidamente oxidado hasta ácido sulfúrico. Waksman y Joffe en colaboración con Lipman, en 1921, inoculando la mezcla indicada por Mc. Lean en un medio de cultivo inorgánico adecuado, aislaron una bacteria capaz de oxidar azufre hasta ácido sulfúrico y la denominaron Thiobacillus thiooxidans.

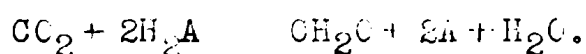
En el año 1924, Lavendard, publicó una monografía sobre las bacterias del azufre incoloras. En la que menciona haber obtenido cultivos puros de algunas formas rojas.

Starkey, en 1925, trató en forma completa y detallada sobre la fisiología de Thiobacillus thiooxidans.

El mejor trabajo sobre las bacterias del azufre rojas y verdes es, indudablemente, el realizado por Van Niel, en 1931. Obtuvo cultivos puros entre los que diferenció, además de las bacte-

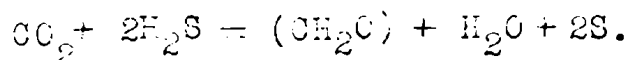
rias verdes, tres tipos morfológicos de bacterias rojas. Estudió el mecanismo de la fotosíntesis, demostrando que el metabolismo de las bacterias coloreadas es un verdadero proceso fotosintético y que, en ausencia de compuestos de azufre oxidables, dichas bacterias pueden desarrollar con compuestos orgánicos, bajo condiciones de completa anaerobiosis y solamente con energía radiante.

Müller, en 1933, corroboró este resultado y representó la fotosíntesis, como lo había hecho Van Niel, mediante la siguiente ecuación general:



donde  $H_2A$  puede representar el agua en la ecuación de la fotosíntesis de las plantas verdes o el ácido sulfhídrico en la de las bacterias rojas y verdes. Müller estableció la hipótesis de que en este último caso, el ácido sulfhídrico podría ser reemplazado por una sustancia orgánica que sirviera como dadora de hidrógeno. Demostró, utilizando diversas sustancias orgánicas, que las bacterias del azufre rojas pueden desarrollar heterotróficamente.

Gaffron, a partir del año 1933, estudió el metabolismo de las bacterias púrpúreas; según este autor, solamente las Athiorhodaceae serían capaces de efectuar fotosíntesis con sustancias orgánicas. En el metabolismo de las Chlororhodaceae existirían dos procesos: Por uno de ellos estas bacterias serían capaces de reducir sulfatos o sustancia orgánica a ácido sulfhídrico, lo que tendría lugar en la oscuridad. A la luz se produciría la reacción:



y esta reacción podría cumplirse en sentido contrario en la oscuridad de manera semejante al proceso que se verifica en las plantas verdes.

En 1936, Czurda, obtuvo cultivos puros de Chromatium uti-

lizando un medio mineral con el agregado de ácido sulfhídrico y llegó a la conclusión de que en la asimilación del anhídrido carbónico las bacterias rojas producen oxígeno, análogamente a lo que sucede en la fotosíntesis realizada por las plantas verdes.

En el mismo año, Van Niel, reafirmó su concepto referente al metabolismo de las bacterias con pigmento. realizó experiencias para comprobar si en el proceso de la fotosíntesis de estas bacterias se produce oxígeno, como había demostrado Uzura, llegando a la conclusión que esto no sucede y que existe gran analogía entre el metabolismo de las Thiorhodaceae y Atiorodaceae, siendo ambas capaces de utilizar hidrógeno molecular y sustancias orgánicas directamente en sus procesos de asimilación.

En 1940, Foster, demostró para las bacterias rojas que no depositan azufre interior, que el papel a cargo de las sustancias orgánicas en el metabolismo de esos organismos se reduce al de dador de hidrógeno para la realización de la fotosíntesis.

Una contribución muy importante al estudio de las bacterias del azufre, es la realizada en 1940, en la Argentina, por Cataldi, quien encontró un método sencillo y práctico para el aislamiento de Beuariatca y consiguió cultivarlo en medios orgánicos, deduciendo que podía fundarse en el poder autotrófico de este organismo.

---

## Capítulo II.

### Sistemática de las bacterias del azufre.

La clasificación de las bacterias del azufre constituye un problema que aún no está resuelto, pues el mismo se presenta al considerar la sistemática general de las bacterias. Sería necesario dejar sentado cuales son los caracteres que se consideran de mayor importancia para la formación de las diferentes agrupaciones, es decir si los caracteres morfológicos deben tenerse en cuenta antes que los fisiológicos para constituir las primeras divisiones.

En el caso de las bacterias del azufre el problema es fundamental por poseer dichas bacterias, en la mayoría de los casos un tipo especial de metabolismo. Además por presentar formas tan diversas que varían que, en el caso de primar el criterio morfológico en la sistemática, las diferentes bacterias del azufre tendrían que incluirse en grupos completamente apartados.

La mayor parte de las clasificaciones y diagnósticos que se harán en el presente trabajo, están tomadas de la sistemática de Duchanan, de la Revista de la Biología, de 1939.

En el presente trabajo se han tratado bacterias pertenecientes al orden Thiotactariales y además, representantes de las Subbacteriales que podrían ser considerados bacterias del azufre si se atendiera a la planta que tiene este elemento o sus compuestos en el metabolismo de dichas bacterias. Estos últimos se incluyen en la familia Litrobacteriaceae, creada por Duchanan,

en 1917, para las bacterias nitrificadoras.

Las verdaderas bacterias del azufre se incluyen actualmente en el orden de las Thiotactariales, creado por Luchanan, en 1917. Algunos de los representantes de este orden fueron incluidos en las clasificaciones más antiguas entre los protozoarios o entre las algas; así, según Bavandam, el género Ronas de la clasificación de Müller, en 1786, incluía algunas formas consideradas hoy entre las bacterias del azufre rojas. La denominación Beugiatoc fue dada por Trevisan, en 1942, a un organismo que ubicaba entre las algas relacionándolo con las Oscillatoria.

En las clasificaciones que se sucedieron, solamente apareció Beugiatoc de los géneros que se consideran actualmente, hasta la clasificación de Schroeter, en 1886, en la que se citan Lamprocypris y Chromatium, este último de Berty.

Winogradsky, en 1888, después de su largo y excelente estudio sobre las bacterias del azufre, da la primera clave para la clasificación de dichas bacterias, creando varios géneros que se conservan en las clasificaciones modernas.

En la clasificación de Míula, en 1894, aparecen solamente dos géneros de los existentes en la clave de Winogradsky: Thiothrix, que está incluido en la familia Chlorobacteriaceae y Beugiatoc, único representante de la familia Beugiatocaceae, creada por este autor. Posteriormente el mismo autor en su clasificación de las bacterias, en 1900, adopta la clasificación de Winogradsky, dividiendo el orden que denomina Thiobacteria, en dos familias: Beugiatocaceae, que comprende las formas incoloras y Chlorobacteriaceae, nombre que nos hace diferenciar a las bacterias que contienen bacterioclorina.

Estas últimas fueron estudiadas por Molisch, en 1907,

quien consideró que todas las bacterias que contienen bacteriopurpurina debían formar un orden: Rhodobacteriales, y creó las familias Thiorhodaceae y Athiorhodaceae para diferenciar las formas purpúreas según que depositen o no azufre en su interior.

En la clave de Buchanan, de 1917, en el orden Thiobacteriales, se incluye además de las familias Reggiatoaceae y Rhodobacteriaceae, ya existentes, la nueva familia Achromatiaceae, que comprende las bacterias incoloras, móviles, unicelulares, con gránulos de azufre en su interior.

Bergey y colaboradores, en 1923, conservan para el orden Thiobacteriales las mismas familias y géneros que existían en la clasificación de Buchanan de 1917.

En 1924, Bavendamm, en su monografía sobre bacterias del azufre, considera como tales a las que oxidan azufre o alguno de sus compuestos, afirmando que deben ser excluidas las bacterias purpúreas libres de azufre y da una clasificación de las bacterias que toman parte en el ciclo del azufre en la naturaleza.

Van Niel, en su trabajo del año 1931 sobre bacterias purpúreas y verdes, llega a la conclusión que, con los estudios realizados hasta el momento, es imposible llegar a la clasificación de las bacterias del azufre poseedoras de pigmento. Según este autor estas bacterias son de un polimorfismo tal, que en un momento dado parecen pertenecer a un género y en otras condiciones a otro género diferente. No llegó a la clasificación de los gérmenes que estudió, utilizando las claves existentes, aconsejando la realización de un estudio detallado y con gran cantidad de cepas; hizo una clasificación sobre la base de caracteres morfológicos.

En 1936, Kluyver y Van Niel, hacen una clasificación general de las bacterias. Al referirse al orden Thiobacteriales, no

encuentran justificado que no se tengan en cuenta los caracteres morfológicos como se hace en los otros órdenes y se le da tanta importancia a la existencia de azufre y bacteriopurpurina. Dicen que tomando ese punto de vista es extraño que no se haya incluido en el orden al género Thiobacillus. En su clasificación utilizan un criterio morfológico para los grupos importantes hasta la categoría de tribu, separando los géneros fisiológicamente; consideran organismos fotoautotróficos, fotoheterotróficos, quimioautotróficos y quimioheterotróficos. Entre los primeros incluye las bacterias con pigmento complejo verde: Chlorobacteria, con el género Chlorobium y las bacterias con pigmento complejo rojo: Thiorhodaceae. En los segundos incluye las bacterias rojas no del azufre: Athiorhodaceae. Con los quimioautotróficos hace una separación según los compuestos que oxidan: así los que oxidan compuestos inorgánicos de azufre los llama Leucothiobacteria; incluye Sulfospirillum y Sulfomonas, este último corresponde al género Thiobacillus.

Recientemente, en 1941, Stanier y Van Niel, proponen un sistema de clasificación en el que se utiliza un criterio morfológico pero además caracteres fisiológicos. Según estos autores, debe tenerse en cuenta cual es el carácter fisiológico importante; así, el orden de las Thiobacteriales de Nicholson está basado en la presencia de bacteriopurpurina y de gránulos de azufre en las células y fundándose en ello se agrupan géneros que difieren en alto grado tanto morfológicamente como fisiológicamente: las bacterias purpúreas fotosintéticas y algunas de las quimioautotróficas, incoloras, que oxidan azufre.

Para la nueva clasificación crean el reino Monera que comprende dos divisiones: Lyxobryta y Schyzozocetae. Los primeros

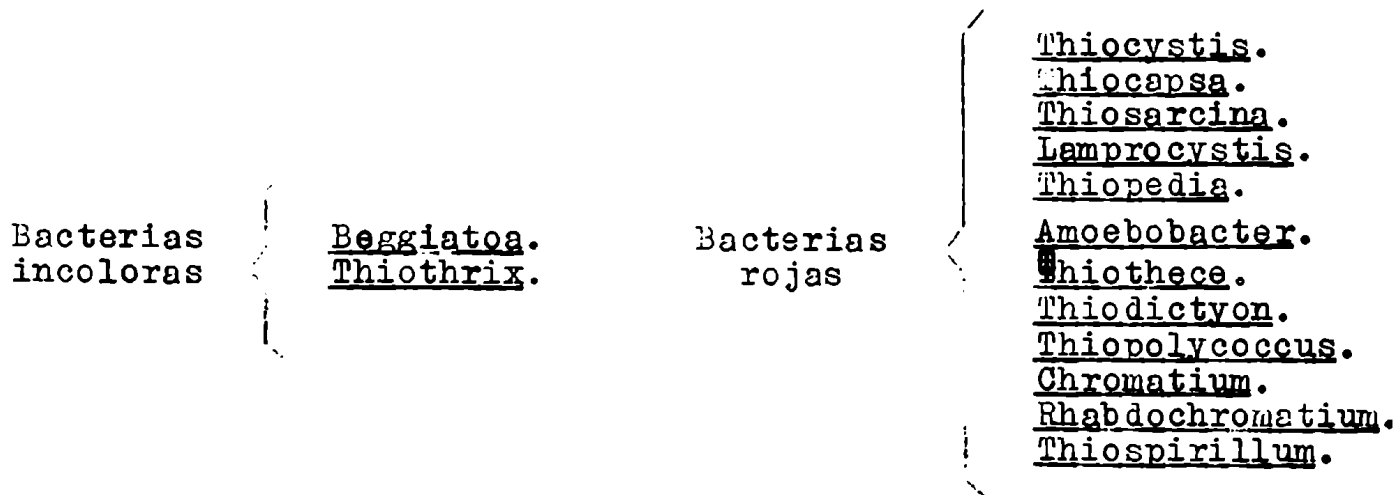
están caracterizados, principalmente, por ser fotosintéticos con producción de oxígeno. poseer el clorófila típica, ficocianina y a veces ficocritina; en esta división se incluyen los organismos incoloros no fotosintéticos muy semejantes por morfología a los anteriores: entre estos están los géneros pertenecientes a las Beggiatoaceae: Beggiatoa, Thiothrix y Thiobloca, no es posible considerar como cianobacterias que han perdido su pigmento.

La división Alphaxocepaciae, comprende las bacterias verdaderas y consta de tres clases: Alphaxocepaciae, Scircocinctae. Consideran que las bacterias fotosintéticas deben formar un orden: Rhodobacteriales, dentro de la primera clase. Los otros órdenes son: Subbacteriales y Actinobacteriales.

La familia Achromatiaceae comprende organismos poco estudiados; el género Chroococcoides es incluido en las Subbacteriales, en la familia Pseudomonadaceae; el género Chromatium es considerado representante de la familia Achromatiaceae, no puede incluirse en la clasificación general debido a ser un género atípico.

A continuación se muestran las principales clasificaciones de las bacterias

Clasificación de Linnaeus (1808).





Clasificación de Wolisch. (1907).

Orden Rhodobacteria.

<u>Familias</u>	<u>Subfamilias</u>	<u>Géneros</u>
<u>Thiorhodaceae.</u>	<u>Thiocapsaceae.</u>	
	<u>Lamprocystaceae.</u>	
	<u>Thiovediaceae.</u>	
	<u>Amoebobacteriaceae.</u>	
	<u>Chromatiaceae.</u>	
	<u>Rhodocapsaceae.</u>	
<u>Athiorhodaceae.</u>	. . . . .	<u>Rhodocystis.</u>
	. . . . .	<u>Rhodonostoc.</u>
	. . . . .	<u>Rhodococcus.</u>
	. . . . .	<u>Rhodobacterium.</u>
	. . . . .	<u>Rhodobacillus.</u>
	. . . . .	<u>Rhodovibrio.</u>
	. . . . .	<u>Rhodospirillum.</u>

---

Clasificación de Bavendamm.  
(1924)

Bacterias del azufre incoloras.  
(Leuco - Thiobacteria.)

<u>Familias.</u>	<u>Géneros.</u>
<u>Beggiatoaceae.</u>	<u>Beggiatoa.</u> <u>Thiothrix.</u> <u>Thioploca.</u>
<u>Achromatiaceae.</u>	<u>Achromatum.</u> <u>Thiophysa.</u> <u>Thiovulum.</u> <u>Thiospira.</u>

Bacterias del azufre rojas.  
(Rhodo - Thiobacteria).

<u>Thiocapsaceae.</u>	<u>Thiocystis.</u> <u>Thiocapsa.</u> <u>Thiosarcina.</u>
<u>Lamprocystaceae.</u>	<u>Lamprocystis.</u>
<u>Thiopediaceae.</u>	<u>Thiopedia.</u>
<u>Amoebobacteriaceae</u>	<u>Amoebobacter.</u> <u>Thiotece.</u> <u>Thiodyction.</u> <u>Thiopolycoccus.</u>
<u>Chromatiaceae.</u>	<u>Chromatium.</u> <u>Rhodochromatium.</u> <u>Thiospirillum.</u>
<u>Rhodocapsaceae</u>	<u>Rhodocapsa.</u> <u>Rhodothece.</u>

Clasificación de Bergey (1939).

Orden Thiobacteriales Buchanan.

<u>Familias</u>	<u>Subfamilias</u>	<u>Tribus</u>	<u>Géneros.</u>
<u>Rhodobacteriaceae</u>	<u>Chromatioideae</u>	<u>Thiocapseeae</u>	<u>Thiocystis.</u> <u>Thiosphaera.</u> <u>Thiosphaerion.</u> <u>Thiocapsa.</u> <u>Thiosarcina.</u>
		<u>Lamprocysteae</u>	<u>Lamprocystis.</u>
		<u>Thiopédieae</u>	<u>Thiopedia.</u> <u>Thioderma.</u> <u>Lampropedia.</u>
		<u>Amoebobacterieae</u>	<u>Amoebobacter.</u> <u>Thiodyction.</u> <u>Thiothece.</u> <u>Thiopolyceccus.</u>
		<u>Chromatieae</u>	<u>Chromatium.</u> <u>Rhabdomonas.</u> <u>Thiospirillum.</u> <u>Rhodocapsa.</u> <u>Rhodothece.</u>
		<u>Rhodobacterioideae</u>	<u>Rhodocystis.</u> <u>Rhodonostoc.</u> <u>Rhodorhagus.</u> <u>Rhodobacterium.</u> <u>Rhodobacillus.</u> <u>Rhodovibrio.</u> <u>Rhodospirillum.</u>
		<u>Beggiatoceae</u>	<u>Thiothrix.</u> <u>Beggiatoa.</u> <u>Thioploca.</u>
		<u>Achromatiaceae</u>	<u>Achromatium.</u> <u>Thiophysa.</u> <u>Thiospira.</u> <u>Hillhousia.</u>

### Ca.ítulo III.

#### Material de estudio y métodos de investigación.

1).- Material: Los autores que se ocuparon del estudio de estas bacterias realizaron sus trabajos especialmente con material procedente de fuentes sulfurosas naturales, donde las bacterias del azufre forman masas que se distinguen a simple vista. En estas aguas y barro sulfurosos suelen encontrarse las bacterias filamentosas Beggiatoa y Thiothrix dando lugar a verdaderos tapices blancos y también nubes rojas en las aguas o las mismas completamente enrojecidas por la presencia de bacterias del azufre rojas.

Estos organismos existen además, aunque en cantidad mucho menor y sin constituir agrupaciones visibles, en las aguas en que se produce ácido sulfhídrico por la descomposición de sustancias orgánicas. En el presente trabajo se ha reducido el estudio al material de aguas y barro provenientes de arroyos, zarzales y lagunas y algunas tierras de jardín. Las muestras fueron tomadas en frascos grandes de boca ancha y se procuró obtenerlas, en lo posible, de los lugares en que el barro estuviera ennegrecido debido a la acción del ácido sulfhídrico, secando juntamente con el agua y barro, restos vegetales, ya sea tallos, hojas o algas en descomposición.

2).- Métodos de investigación: El examen microscópico de las muestras no reveló, generalmente, la existencia de formas pertenecientes a este grupo de bacterias, excepto en algunos casos en que se observaron filamentos aislados de Beggiatoa. En todos

los casos fue necesario producir cultivos de enriquecimiento, para intentar posteriormente el aislamiento de las bacterias que pudieran desarrollarse en los mismos. El material fue sembrado en los medios de cultivo apropiados para el desarrollo de los diferentes representantes de estas bacterias.

Para el estudio de las bacterias consideradas en este trabajo no se usaron, en general, los métodos comunes de la bacteriología, especialmente en lo que se refiere a las características fisiológicas, puesto que estos organismos no desarrollan los medios utilizados corrientemente para el estudio de la generalidad de las bacterias.

En los ensayos de enriquecimiento se utilizaron medios líquidos, constituidos generalmente por soluciones de sales inorgánicas, teniendo en cuenta que en este medio se encuentran sus compuestos ácido sulfúrico, sulfuro de sodio, tiosulfato de sodio. Para los aislamientos se emplearon, cuando era posible, estos mismos medios agarizados al 2%. Las siembras se efectuaron en superficie, en el caso de los organismos aerobios, o en dilución en tubos de agar con tálamo de vaselina-parafina en el caso de los anaerobios.

Los métodos de enriquecimiento y aislamiento varían en los diferentes grupos bacterianos, tanto al tratar cada uno de ellos como al detallar los medios y reactivos que se utilizaron en el estudio de los organismos encontrados.

La morfología se hizo por preparados directos, con microscopio electrónico. Los caracteres de cultivo se estudiaron para cada grupo en los medios especiales en que los respectivos organismos son capaces de desarrollarse, que se detallan al hacer el estudio de los mismos por separado. En la fisiología se atendió

, /

de

f

,

de

,

-

de

de

,

de

de

de

,

s

Capítulo III.

Estudio de las bacterias de aguas  
consideradas en el presente trabajo.

Se continuó describiendo las características  
de las bacterias de aguas dulces, agrupándolas  
de acuerdo a las consideraciones de la parte anterior.

1).- Bacterias del azufre: las solimas  
de las aguas dulces de la zona de las cédulas.

Las bacterias de este grupo tienen formas simples, de  
forma esférica, bacilares, coccobacilares, etc.  
Se caracterizan por su capacidad de formar  
cuerpos azufrados, y estar dotadas de flagelos.  
Se cultivan en medios con un pH de 7.5 a 8.5.  
Se caracterizan por su capacidad de reducir el  
sulfato de sodio a sulfuro de sodio, y por su capacidad  
de reducir el azufre de sus compuestos, como el  
sulfato de sodio, al sulfuro de sodio.  
Se caracterizan por su capacidad de reducir el  
sulfato de sodio, de la familia Thiospirillaceae.  
Se caracterizan por su capacidad de reducir el  
sulfato de sodio en dos grupos de acuerdo con sus  
exigencias en lo que respecta a la reacción del medio, en la for-  
ma que sigue:

- 1).- Reacción óptima para el desarrollo: alcalina.
- 2).- Reacción óptima para el desarrollo: ácida.

1er. grupo: reacción óptima para el desarrollo: alcalina.

1).- Cultivos de Thiospirilla: Se utilizó el  
Thiospirilla, caracterizada por su capacidad de  
reducir el sulfato de sodio a sulfuro de sodio.

1.3  
1.4  
1.5  
1.6  
1.7

1.8  
1.9  
1.10  
1.11  
1.12

el. 1. 101 11  
1. 102 12

1. 103 13  
1. 104 14  
1. 105 15

1. 106 16  
1. 107 17

1. 108

1. 109 18  
1. 110 19  
1. 111 20

1. 112 21  
1. 113 22

1. 114 23  
1. 115 24

1. 116 25  
1. 117 26  
1. 118 27

1. 119



3).- Morfología: Los gérmenes cultivados en el medio Beijerinck, observado al microscopio directo presentan las siguientes características: Se trata de bastoncitos muy pequeños,  $(1,5 \times 0,5 \mu)$ , de extremos redondeados, que se presentan generalmente en pares, raramente formando cadenas cortas; son muy móviles, y cuando cruzan el campo rápidamente, como espirilos, atraen y desvían al microscopista un extremo hacia el alrededor del otro.

No tienen tinte con las coloraciones comunes. Son gram negativos.

4).- Caracteres de cultivo: El medio líquido de Beijerinck desarrollado en la superficie formando una película blanda, constituida por el azufre elemental y los bastoncitos y que observado al microscopio se presenta como una masa de gránulos. El cultivo

crece lentamente; en algunas ocasiones se observan también algunos filamentos que no se puede afirmar debido al tamaño pequeño de los mismos; podría tratarse de gránulos adheridos exteriormente a las células.

En agar de Beijerinck forman a las 48 horas, colonias pequeñas circulares, opacas, de color amarillo pálido. Observadas al microscopio se ven completamente negras, granuladas, cubiertas por entero por gránulos de azufre y con gran aumento pueden verse los gérmenes como bastoncitos muy pequeños, únicamente en el borde de la colonia, por estar el resto de la misma cubierto por el azufre formado. Después de un tiempo el azufre de las colonias se presenta cristalizado.

La temperatura óptima para el desarrollo es de 28-30°C. Son francamente aerobios.

5).- Fisiología: Se investigó la influencia del pH en el

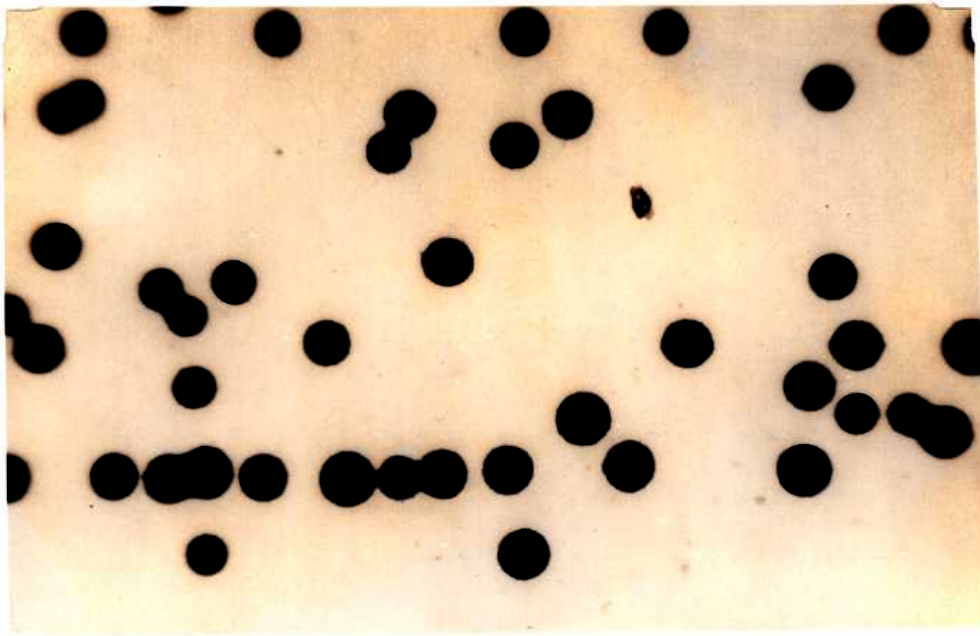


Fig.1.-Colonias de Thiobacillus thioparus.(x90)



Fig.2.-Colonias de Thiobacillus thioparus.(x400)

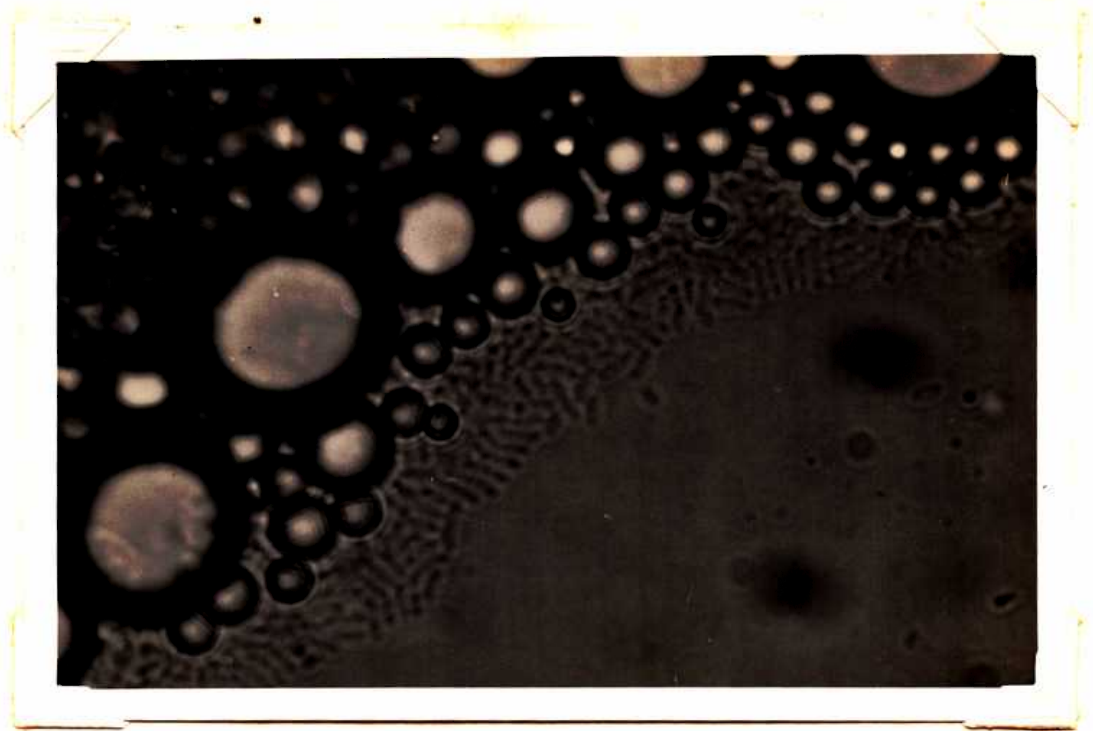


Fig.3.-Borde de colonia de Thiobacillus thioparus.(x2500)



Fig.4.-Thiobacillus thioparus.(x2500)

desarrollo utilizando el medio de Beijerinck líquido, llevado a diferentes pH desde 6 hasta 9. En todos los frascos con pH hubo igual desarrollo; a pH 6,8 hubo poco desarrollo.

Estas bacterias oxidan el tiosulfato hasta azufre y luego éste hasta ácido sulfúrico llevando al medio a pH 6; una vez que se ha llegado a este pH cesa el desarrollo. Esto puede evitarse agregando al medio carbonato de calcio en exceso, lo que aumenta la duración de los cultivos. Además, como este germen consume rápidamente el tiosulfato es necesario reponer esta sustancia; puede agregarse al cultivo periódicamente unas gotas del medio concentrado conservado en ampollas.

En el medio de Jacobsen, que tiene azufre en lugar de tiosulfato, el desarrollo es muy lento. Si dicho medio tiene creta los cultivos pueden durar hasta tres meses. La composición del medio es la siguiente:

Fosfato dipotásico . . . . .	0,5gr.
Cloruro de amonio . . . . .	0,5gr.
Cloruro de magnesio . . . . .	0,2gr.
Carbonato de calcio ó carbonato de magnesio . . . . .	20,0gr.
Azufre precipitado . . . . .	10,0gr.
Cloruro férrico . . . . .	trazas.
Agua destilada . . . . .	100Cc.c.

Se ensayaron diversas concentraciones de tiosulfato de sodio, desde 0 hasta 1%. El mejor desarrollo se tuvo con 0,5 y 1%; con menos de 0,5% hubo escaso desarrollo.

No se consiguió desarrollo utilizando como fuente de azufre sulfuro de sodio o ácido sulfhídrico.

6).- Fuentes de carbono: Se utilizaron carbonato y bicarbonato de sodio en las proporciones: 0 - 0,1 - 0,3 - 1%; en el caso de no agregar ninguna de las dos sales, se trató de ver si se producía desarrollo con el anhídrido carbónico de la atmósfera; en esas condiciones estos gérmenes desarrollaron muy poco; el me-

mejor desarrollo se obtuvo con 0,1% de bicarbonato de sodio; también hubo buen desarrollo con la misma concentración de carbonato.

7).- Fuentes de nitrógeno: Se ensayaron: cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de sodio, nitrato de potasio y nitrito de potasio, en las concentraciones: 0,01 - 0,1 - 1%. En general hubo buen desarrollo con cualquiera de estas sustancias. El mejor desarrollo se obtuvo con cloruro de amonio 0,01 y 0,1%. Concentraciones de 1% dan lugar a escaso desarrollo con cualquiera de las fuentes de nitrógeno.

8).- Influencia de las sustancias orgánicas: Para estudiar si este organismo es capaz de utilizar sustancias orgánicas para su desarrollo, se utilizó el medio de Beijerinck, sin tiosulfato de sodio, al que se agregó diferentes sustancias: extracto de carne, peptona, extracto de levadura, glucosa, acetato de sodio, lactato de sodio, en las concentraciones: 0 - 0,001 - 0,003 0,01 - 0,03 - 0,1 - 0,3%. No hubo desarrollo; no son capaces de utilizar sustancias orgánicas como fuente de carbono: son autótrofos absolutos.

También se investigó si esas mismas sustancias orgánicas podían influir en el desarrollo agregadas al medio de Beijerinck con tiosulfato de sodio. Se obtuvieron los siguientes resultados: toleran extracto de carne, peptona y extracto de levadura hasta la concentración de 0,1%; con 0,3% no hay desarrollo. La glucosa permite el desarrollo solamente a una concentración de 0,001%; el acetato y lactato de sodio hasta la concentración de 0,03%. Luego algunas sustancias orgánicas no influyen en el desarrollo aún a altas concentraciones.

9).- Influencia del cloruro de sodio: Según Baas-Becking, el Thiobacillus thioparus, que separa azufre en el exterior de las

células, es capaz de formar gránulos de este elemento en el interior al desarrollarse en medios con alta concentración de cloruro de sodio; para comprobar si el germen estudiado poseía esa propiedad se agregaron diferentes concentraciones de cloruro de sodio al medio de Beijerinck: 0 - 0,5 - 1 - 3 - 5 - 10 - 15 - 20%. Con concentraciones mayores de 5% no se obtuvo desarrollo; no se observaron gránulos de azufre en el interior de las células.

10).- Conservación de los cultivos: Estas bacterias mueren en las placas de agar de Beijerinck en 9 ó 10 días. Para su conservación se utiliza el medio líquido de Beijerinck con creta; cada 7 u 8 días se agrega a los tubos unas gotas del mismo medio concentrado conservado en ampollas.

11).- Posición sistemática de las cepas estudiadas: Se aislaron 6 cepas de material proveniente de aguas. Todas ellas presentan las características correspondientes al género Thiobacillus de acuerdo con la diagnosis que sigue:

#### Género Thiobacillus.

Nombre genérico usado por Beijerinck, en 1904, para organismos que oxidan azufre, pero no contienen gránulos de azufre ni bacteriopurina. La primera especie fue Thiobacillus thio-parus, y es la especie tipo. Oxida tiosulfato de sodio, ácido sulfhídrico y otros compuestos de azufre para obtener energía y es oligocarbófilo, utilizando carbonatos. Otra especie es Th. denitrificans; una tercera especie fue descrita por Maksman y Joffe, en 1922 y denominada Thiobacillus thiooxidans.

Bergey y colaboradores, en 1939 incluyen este género como séptimo de la familia Nitrobacteriaceae dentro de la tribu Protobacterieae y dan la siguiente descripción:

Organismos en forma de bastoncitos, que derivan su ener-

gía de la oxidación de sulfuros, tiosulfatos o azufre elemental, formando azufre, persulfatos y sulfatos bajo condiciones ácidas o alcalinas, derivando su carbono del anhídrido carbónico o de bicarbonatos y carbonatos en solución; algunos son autótrofos obligados y otros facultativos. Una especie es anaerobia. Del griego theion (azufre), y del latín bacillum (bastoncito).

Los caracteres que presentan las formas estudiadas aquí pueden hacer que se las considere como Thiobacillus thioparus. Las características principales de dicha especie pueden resumirse así:

Thiobacillus thioparus Beijerinck: (Cent. f. Bakt., II Abt., 11, 1904, 593; Nathanson, Mitt. Zool. Station Neapel, 15, 1902, 655; Duggeli, Die Schwefelbakterien. Neujahresblatt Naturf. Gesell., Zurich, 1919; Sulfomonas thioparus Orla-Jensen, Cent. f. Bakt., II Abt., 22, 1909, 326.) Del griego theion, azufre y para, derivado de.

Bastoncitos cortos 0,5 - 3 μ, móviles. En medio líquido forman película de azufre libre. En medio sólido colonias amarillas circulares, pequeñas. Reacción óptima: alcalina. Autótrofos, derivan su energía de la oxidación de tiosulfato, sulfuros y SH<sub>2</sub>, y también de azufre elemental. Aerobios.

Habitat: Agua de mar, agua de río y suelo.

---

2do. grupo: Reacción óptima para el desarrollo: ácida.

1).- Cultivos de enriquecimiento: En un frasco con cultivo de enriquecimiento con medio de Beijerinck, de donde se aisló una de las cepas pertenecientes al grupo 1., se observó después de cierto tiempo, que la mayor parte del azufre formado en la su-

perficie, había desaparecido, el medio estaba turbio y el pH había bajado hasta 2,4 - 2,6. El examen microscópico reveló la presencia de gran cantidad de bastoncitos y filamentos de hongos. No desarrollando Thiobacillus thioparus a un pH menor que 6, y habiendo llegado el medio a un pH tan bajo, se pensó que los bastoncitos podrían ser Thiobacillus thiooxidans, caracterizado precisamente por oxidar azufre hasta ácido sulfúrico, llevando al medio a un pH muy bajo.

Se hicieron pasajes al medio mineral dado por Waksman para la bacteria citada y se obtuvo abundante desarrollo del bastoncito, con fuerte enturbiamiento del líquido. El medio tiene la siguiente composición:

Sulfato de amonio . . . . .	2,0	gr.
Fosfato bipotásico . . . . .	1,0	gr.
Sulfato de magnesio . . . . .	0,5	gr.
Cloruro de potasio . . . . .	0,5	gr.
Sulfato ferroso . . . . .	0,01	gr.
Azufre . . . . .	10,0	gr.
Fosfato tricálcico. . . . .	2,5	gr.
Agua destilada. . . . .	1000	c.c.

El medio es llevado a pH 3 - 4, con ácido fosfórico.

2).- Aislamiento: Se utilizó el medio dado por Waksman, cuya composición es la siguiente:

Tiosulfato de sodio . . . . .	5,0	gr.
Fosfato monopotásico. . . . .	3,0	gr.
Cloruro de amonio . . . . .	0,1	gr.
Cloruro de magnesio . . . . .	0,1	gr.
Cloruro de calcio . . . . .	0,25	gr.
(o fosfato tricálcico). . . . .	(10,0	gr.)
Agar . . . . .	20,0	gr.
Agua destilada . . . . .	1000	c.c.

Se hicieron estrías en superficie con una gota del material del cultivo de enriquecimiento; las cajas se incubaron a 30°; se obtuvieron a los 4 e 5 días colonias muy pequeñas, traslúcidas, brillantes. Estas colonias se picaron por micromanipulación y se sembraron en tubos con el medio líquido con azufre.

3).- Morfología: En preparado directo del cultivo en me-



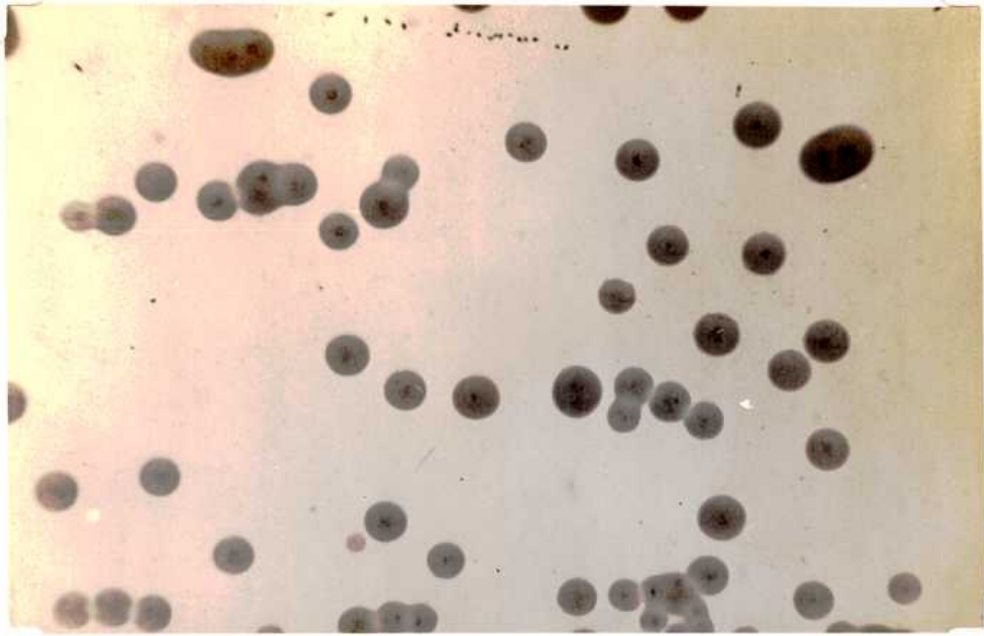


Fig.5.-Colonias de Thiobacillus thiooxidans.(x90)

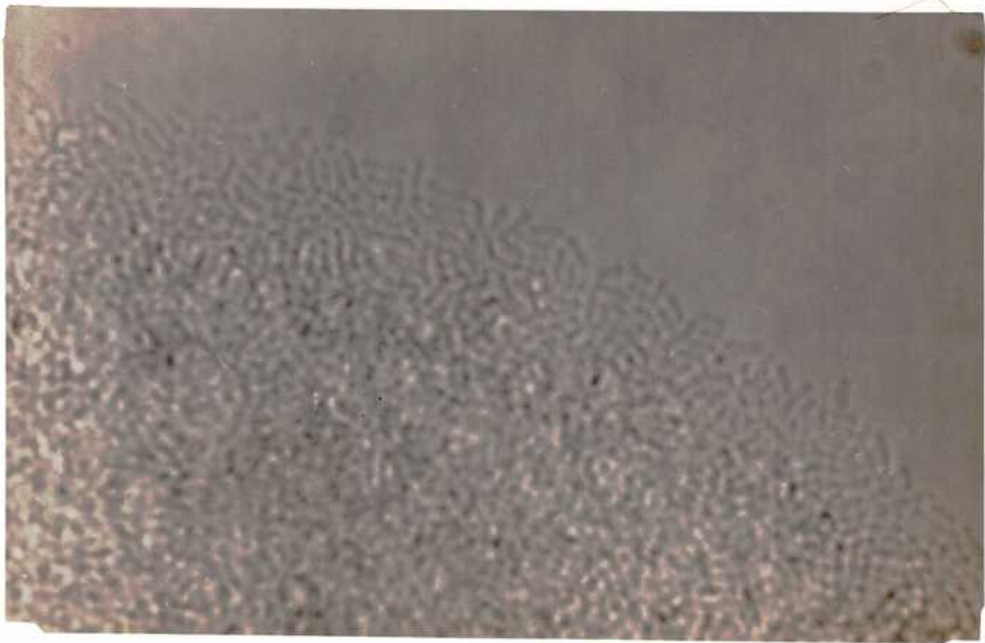


Fig.6.-Borde de colonia de Thiobacillus thiooxidans.(x2500)



Fig.7.-Thiobacillus thiooxidans.(x2500)

dio líquido con azufre, se observan bastoncitos muy pequeños, (  $1 - 1,8 \times 0,4 - 0,5 \mu$  ), aislados o en pares; son móviles en cultivo joven; se tiñen bien con los colorantes comunes; son Gram positivo.

4).- Caracteres de cultivo: En medio líquido con azufre, el desarrollo es lento, 4 ó 5 días. No forman película en la superficie, van desarrollando de manera uniforme en el líquido, llegando a producir fuerte enturbiamiento del mismo. Por la observación microscópica, se nota el desarrollo de las bacterias preferentemente adosadas a las partículas de azufre de la superficie, alrededor de las cuales forman masas de organismos densamente apretados. Pendientes del azufre y en el fondo del tubo, se puede ver gran cantidad de cristales aciculares, brillantes, que llegan a formar un fieltro debajo del azufre de la superficie; estos cristales están constituidos por sulfato de calcio, formado a raíz de la neutralización del ácido sulfúrico producido por la oxidación del azufre. El azufre de la superficie cae rápidamente al fondo; es necesario reponerlo agregando azufre estéril; para la esterilización se lo suspende en agua destilada y se tinaliza.

Este organismo es capaz de llevar el medio hasta un pH de 1,3 - 1,4. En un frasco que contenía un cultivo muy viejo llegó a producirse un pH de 0,5.

En el medio sólido de Waksman, desarrolla formando colonias visibles recién al cuarto o quinto día; las colonias son muy pequeñas, circulares, traslúcidas, brillantes, no presentan el color blanco amarillento característico de los gérmenes que separan azufre; observadas al microscopio presentan borde liso, estructura homogénea granulada fino; no se observan gránulos de azufre. Si al medio agarizado se le agrega fosfato tricálcico en lugar de

cloruro de calcio, el primero es disuelto por el ácido formado y se nota alrededor de las partes sembradas una zona completamente transparente.

5).- Fisiología: Para estudiar la influencia del pH en el desarrollo, se llevó el medio líquido con azufre a diferentes pH, desde 2 hasta 8. El desarrollo es más rápido (3 días), a pH 2 y 3; a los 6 días hay también desarrollo a pH 4, 5, y 6; más tarde a pH 7; a pH 8 no se obtiene desarrollo.

Es más favorable el medio de Waksman con fosfato tricálcico, que el mismo sin esta sal.

Para estudiar si son capaces de utilizar tiosulfato, se usó el medio mineral y en lugar de azufre se le agregó diferentes proporciones de tiosulfato de sodio: 0 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2%. Desarrolla solamente con concentraciones superiores a 0,5%; el mejor desarrollo se obtiene con 2% de tiosulfato.

No se obtuvo desarrollo con sulfuro de sodio ni con ácido sulfhídrico.

6).- Fuente de carbono: Se utilizaron carbonato y bicarbonato de sodio en las concentraciones: 0 - 0,1 - 0,3 - 1%. No se obtiene desarrollo con carbonato ni con bicarbonato; desarrolla solamente con el anhídrido carbónico de la atmósfera.

7).- Fuentes de nitrógeno: Se ensayaron: cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de sodio, nitrato de potasio y nitrito de potasio, en concentraciones: 0,01 - 0,1 - 1%. Hay desarrollo con cloruro de amonio, sulfato de amonio y nitrato de sodio, en las concentraciones: 0,01 y 0,1% y con 0,1% de nitrato de potasio. No desarrolla con nitrito de potasio.

8).- Influencia de las sustancias orgánicas: Se investigó la acción de diferentes sustancias orgánicas en el medio mineral, con y sin azufre. Se utilizaron las siguientes sustancias: extrac-

to de levadura, peptona, lactato de sodio, acetato de sódio, citrato de sodio y glucosa en las concentraciones: 0 - 0,01 - 0,03 0,1 - 0,3%. Se obtuvieron los siguientes resultados: sin azufre no hubo desarrollo en ninguno de los tubos; con azufre hay desarrollo con extracto de levadura, peptona y glucosa a cualquier concentración; no hay desarrollo con las otras sustancias; la peptona parece favorecer el desarrollo utilizada a una concentración de 0,1 y 0,3%. Luego, se trata de un organismo autótrofo absoluto, incapaz de desarrollar sin azufre o tiosulfato, sustancias que le proporcionan, por medio de su oxidación, la energía necesaria para efectuar la síntesis de la materia orgánica, a partir del anhídrido carbónico del aire.

9).-Posición sistemática de la bacteria estudiada: Se aisló solamente una cepa, de material proveniente de aguas; no tuvieron éxito las tentativas hechas para obtenerlo a partir de cultivos de enriquecimiento con tierras de jardín.

Por las características estudiadas esta bacteria pertenece también al género Thiobacillus. De acuerdo con la clasificación dada en la clave de Bergey, se puede identificar este germen como Th. thiooxidans Waksman y Joffe, siendo la descripción de la especie la que sigue:

Thiobacillus thiooxidans Waksman y Joffe. (Jour. of Bact., 7, 1922, 239; Sulfomonas thiooxidans Waksman, Jour. Bact., 1922, 616; Thiobacterium thiooxydans Lehmann and Neumann Bakt. Diag., 7th. Aufl., 2, 1927, 517.) Del griego theion azufre y la palabra latinizada oxidantes.

Bastones cortos,  $0,5 \times 1 \mu$ , aislados o en pares, de extremos redondeados. No móviles, pero pocas células móviles en cultivo joven. Gram positivo. No desarrollan en medio sólido; en líquido

turbidez fuerte y uniforme. No sedimento. No desarrollo superficial. Estrictamente autótrofos, derivan su energía de la oxidación de azufre elemental y tiosulfato, oxidándolos a ácido sulfúrico. Utilizan anhídrido carbónico de la atmósfera como fuente de carbono. Estrictamente aerobios. Produce más ácido de la oxidación de azufre y continúa viviendo en un medio más ácido que cualquier otro organismo viviente llegando la concentración de iones hidrógeno del medio a pH 0,6 y menos.

Origen: Aislado de compuesto~~a~~ de suelo, azufre y fosfato tricálcico.

Habitat: Causa oxidación de azufre en el suelo.

---

II).- Bacterias del azufre incoloras  
que depositan azufre en el interior de sus células.

Existen diferentes formas de bacterias del azufre que presentan esta característica, siendo algunas filamentosas y otras unicelulares. Las formas encontradas y que se describirán a continuación son ambas filamentosas, siendo una de ellas móvil y la otra fija. En cuanto a las formas unicelulares, móviles, incoloras con azufre en su interior, ha resultado imposible obtenerlas aún en cultivos de enriquecimiento.

1).- Cultivos de enriquecimiento: Para la obtención de estos cultivos resultaron de gran utilidad las indicaciones contenidas en los trabajos de Winogradsky y Bavendamm. El método se basa en la obtención de desarrollo de estas bacterias del azufre gracias al ácido sulfhídrico que pueda formarse en el medio, proveniente de la descomposición de sustancias orgánicas, o de la reducción de sulfatos; esta última puede ser llevada a cabo por microorganismos específicos, o producirse por la acción del metano proveniente de la fermentación de la celulosa, fermentación que también tiene lugar gracias a la acción de ciertas bacterias.

El material se colocó en diferentes condiciones; se utilizaron frascos de boca ancha de una capacidad de 100c.c. hasta 3 ó 4 litros y cristalizadores o cajas de Petri, en el caso de querer disponer el material en una superficie más amplia. Se variaron las proporciones del barro, restos orgánicos y agua y en las ocasiones en que el material estaba muy putrefacto, se agregó agua de canilla. Como compuesto de azufre se utilizó sulfato

de calcio o sulfato de magnesio o una mezcla de ambos; la cantidad usada fue de alrededor de 5 por mil. También se ensayó el agregado de creta, aconsejado para la neutralización del ácido que pudiera formarse. Como sustancias orgánicas, además de los restos que existían en las muestras, se utilizó heno hervido según el procedimiento de Winogradsky y agregado en diferentes proporciones. Los recipientes tapados se dejaron a temperatura ambiente y en la oscuridad, para evitar el desarrollo de algas.

En los primeros días se produjo un abundante desarrollo de bacterias, generalmente zoogreas, vibriones y Cladotrix. En los cristalizadores en que se había puesto gran cantidad de barro y poca agua, se formó a los 10 ó 12 días, una película blanca, que cubría la superficie del barro. Ese tapiz blanco estaba formado por filamentos muy largos, entrecruzados, dotados de un movimiento particular y completamente llenos de gránulos negros, refringentes. Se trataba, posiblemente, de una bacteria del azufre perteneciente al género Beggiatoa. La misma bacteria desarrolló también en los frascos en que la proporción de agua era mayor que la de heno, formando redes y ovillos adheridos a las paredes, con un desarrollo más abundante en una región situada muy poco por debajo de la superficie del agua.

El mejor resultado se obtuvo con los cristalizadores o frascos con sulfato de calcio, creta y heno; en general el sulfato de magnesio no fue eficaz. Se adoptó en definitiva el uso de frasquitos de boca ancha, de 120c.c. de capacidad, prefiriéndose a los cristalizadores que exigían una gran cantidad de barro y agua.

a).- Cultivo de enriquecimiento de Beggiatoa: Se trató de hallar las condiciones óptimas para los cultivos de enriqueci-



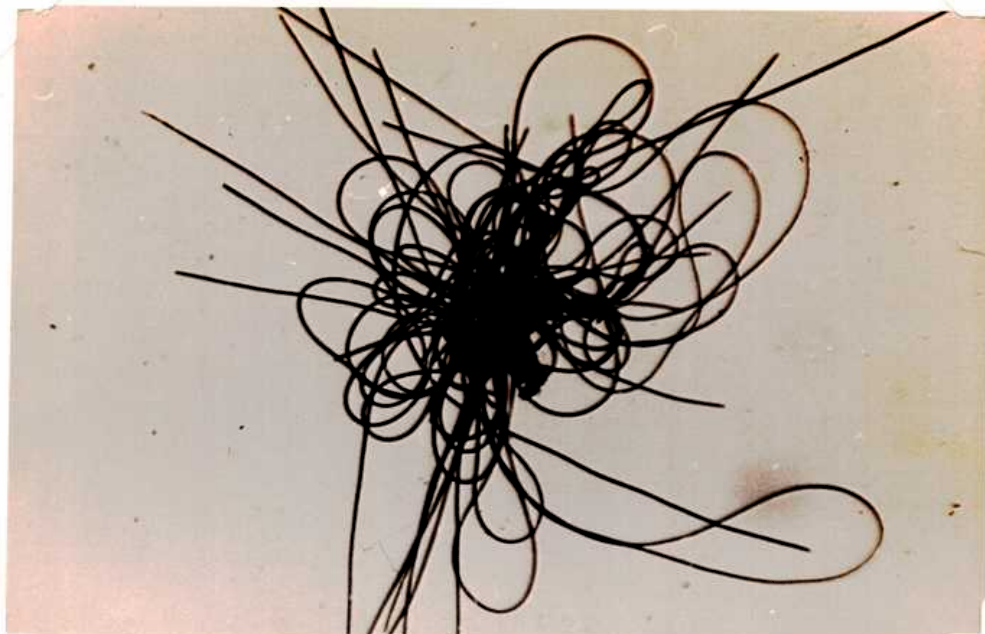


Fig.8.-Copo de Beggiatoa alba de un cultivo de enriquecimiento.(x120)



Fig.9.-Filamentos de Beggiatoa alba de un cultivo de enriquecimiento.(x500)

miento de Beggiatoa, utilizando heno, sulfato de calcio y creta; se sembró con copos de filamentos una serie de frasquitos de 120c.c. de capacidad con agua de canilla, diferentes proporciones de heno, con o sin tierra y con o sin agregado de sulfato de calcio; a todos se les agregó creta. A los 12 días el mejor desarrollo se obtuvo con heno al 4 y 6% con sulfato de calcio y también con heno al 4% sin sulfato de calcio. En los cultivos observados después de un mes el mejor desarrollo correspondió a los frascos con 2 y 4% de heno, con sulfato de calcio. Para los sucesivos enriquecimientos de Beggiatoa, se adoptó la utilización de heno 2 a 4% en agua de canilla con el agregado de sulfato de calcio o yeso y creta.

b).- Cultivos de enriquecimiento de Thiothrix: En algunos cultivos de enriquecimiento con poco barro, heno, sulfato de calcio y creta, se observó el desarrollo de otra bacteria filamentososa, formando copos blancos, muy tenues en la superficie del líquido y en el seno del mismo y que caían fácilmente al fondo al mover el recipiente que lo contenía.

Al observar esos copos al microscopio, se notó que estaban constituidos por filamentos rígidos, inmóviles, fijos por uno de los extremos; la observación con gran aumento reveló la existencia de gránulos negros, refringentes, en el interior de los filamentos. Se trataba, al parecer, de otro representante filamentososo de las bacterias del azufre, perteneciente en este caso al género Thiothrix.

En la primera muestra en que se obtuvo este germen, el desarrollo se produjo en frascos con poco barro y sulfato de calcio, con o sin heno, en los que también había desarrollado anteriormente Beggiatoa. Además se observaron copos de Thiothrix, en



Fig.14.-Copo de Thiothrix tenuis de un cultivo de enriquecimiento.(x400)



Fig.15.-Copo de Thiothrix tenuis de un cultivo de enriquecimiento.(x500)

uno de los cristalizadores con mucho barro y agregado de sulfato de calcio, creta y heno . Con una segunda muestra se obtuvo Thiothrix y no Beggiatoa, con el procedimiento general de enriquecimiento adoptado para esta última. Dos muestras de agua estancada presentaron la particularidad de dar cultivos de enriquecimiento de Beggiatoa, por el método general indicado y de Thiothrix, al reemplazar el heno hervido según el método de Winogradsky, por heno sin hervir.

Para obtener buenos cultivos de enriquecimiento de Thiothrix se realizaron los siguientes ensayos: Se hicieron los cultivos en tubos de ensayo, una vez que se comprobó la posibilidad de obtener buen desarrollo de Thiothrix sin utilizar frascos, lo que facilitó el estudio de los cultivos.

Se observó la acción del heno hervido o sin hervir en diferentes proporciones: 0,1 - 0,3 - 1 - 3%, con agua de canilla y agregado de sulfato de calcio, sulfato de magnesio o la mezcla de ambos en la proporción de 0,5%. También se estudió el comportamiento sin estas sales y con o sin agregado de creta al 0,5%. El mejor desarrollo se obtuvo con heno sin hervir 0,3 - 1%, con sulfato de calcio y sin creta.

Se estudió el comportamiento de Thiothrix, al utilizar compuestos de azufre en el medio; para ello se hizo una serie de tubos con agua de canilla, heno hervido o sin hervir, 0,1 - 0,3 1% y agregando sulfuro de sodio o tiosulfato de sodio en las concentraciones: 0 - 0,001 - 0,003 - 0,01 - 0,03 - 0,1 - 0,3 - 1% - 3%. El mejor desarrollo se obtuvo a los 5 días con heno hervido 0,1% y tiosulfato de sodio 0,1 y 0,03%; también con heno 0,3% y tiosulfato 0,01 y 0,03%, pero con mayor cantidad de infecciones.

Como se obtuvo buen desarrollo con heno hervido, en los

ensayos posteriores se utilizó únicamente en esas condiciones.

Se hizo otra serie análoga a la anterior con el agregado de extracto de carne: 0 - 0,01 - 0,03 - 0,1%. La mejor proporción fue 0,3% de heno, con 0,01% de extracto de carne, sin compuestos de azufre o con 0,03% de tiosulfato. En general en todos los tubos el desarrollo mejor se obtuvo con 0,3% de heno y 0,01 de extracto de carne. Con 0,1% de extracto de carne no hubo desarrollo; tampoco sin heno.

Se compararon los cultivos obtenidos usando en lugar de heno, lino o pasto seco, hervidos durante 10 minutos en agua en una proporción de 0,2%. El mejor resultado se obtuvo con lino; con pasto desarrollaron gran cantidad de infecciones. El lino debe usarse al 1 - 2%, con extracto de carne 0,01 - 0,02%.

La utilización de extracto de levadura o de peptona, en lugar de extracto de carne, no dio buen resultado. Se ensayaron otras sustancias orgánicas más simples: lactato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, en concentraciones: 0 - 0,003 - 0,01 - 0,03 - 0,1% y con el agregado de sulfato de amonio en esas mismas concentraciones, en agua de canilla, con lino hervido: 0 - 0,5 - 1 - 2%. Los resultados fueron peores que los que se obtuvieron con extracto de carne. Hubo algún desarrollo en los tubos con:

acetato: 0,003 y 0,01% lino 0,5 , 1, 2% y sulfato 0,003%.

lactato: 0,003%, lino 1% y sulfato 0,003%.

citrato: 0,003%, lino 0,5% y sulfato 0,01%.

citrato: 0,01%, lino 2%, y sulfato 0,01%.

En los medios con lino se estudió también la influencia del pH, siendo el más favorable alrededor de 7; en todos los ensayos posteriores se arregló la reacción a dicho pH.

Se hicieron ensayos tratando de suprimir los trozos de heno o lino; para ello se utilizó agar en rama en varias proporcio-

nes, con o sin agregado de extracto de carne o extracto de levadura y también medios agarizados: agar común, agar de levadura, agar de mosta de malta, que fueron fundidos y agregados por gotas, en diferentes proporciones en los tubos y una vez enfriados se les agregó el agua de canilla.

Otros medios usados fueron:

Medio inorgánico de Van Niel, para bacterias del azufre rojas, con diferentes proporciones de bicarbonato de sodio, sulfuro de sodio y a diferente pH.

Infusión de heno, infusión de tierra, peptona o extracto de levadura, en diferentes diluciones y con el agregado de sulfuro de sodio o ácido sulfhídrico en diferentes concentraciones.

Infusión de heno o extracto de heno en diferentes diluciones con el agregado de extracto de carne o extracto de levadura en diferentes concentraciones.

En ninguno de esos medios se obtuvo desarrollo. En definitiva se adoptó para la obtención de cultivos de enriquecimiento de Thiothrix, el uso de heno hervido 0,3 - 1%, en agua de canilla, con el agregado de extracto de carne 0,01%.

En los cultivos de enriquecimiento de las bacterias estudiadas en este grupo, no se obtuvo nunca en forma notable, desarrollo de representantes de las bacterias del azufre incoloras, no filamentosas, con azufre en su interior, que pertenecen al grupo de las Achromatiaceae. Sólomente en una oportunidad se observaron formas pequeñas, de forma elíptica, móviles y con gránulos en el interior; otras veces aparecieron espirilos muy móviles; pero en ambas ocasiones esos organismos se hallaban en número muy reducido y no pudieron conservarse, a pesar de haberse ensayado su enriquecimiento utilizando diferentes medios de cultivo.

## 2).- Aislamientos:

a).- Aislamiento de Beggiatoa: Se utilizó el método dado por Cataldi en su trabajo; "Aislamiento de Beggiatoa alba en cultivo puro". Se basa en la propiedad que poseen estas bacterias de estar dotadas de un movimiento deslizante. Si se coloca un copo de Beggiatoa en una caja de Petri con agar de Busgen, los filamentos comienzan a moverse y arrastrándose sobre el agar consiguen alejarse del lugar de la siembra, limpiándose al mismo tiempo de las bacterias que los acompañaban. Si se cortan trozos de agar que tengan filamentos aislados y se colocan en medio de Busgen, (extracto de carne 0,05% en agua de canilla), se obtiene desarrollo de Beggiatoa, que puede estar pura en alguno de los tubos; en el caso de estar el cultivo infectado puede purificarse poniendo nuevamente un copo en agar y repitiendo la operación anterior.

En el presente trabajo se consiguió aislar solamente una cepa de Beggiatoa. El aislamiento se hizo a partir de un cultivo en heno al 0,6%, sin sulfato de calcio; también pudo aislarse esta misma partiendo de algunos copos muy pequeños que se observaban en el material de agua antes de sembrarlo para obtener el cultivo de enriquecimiento; en este último caso los filamentos estaban desprovistos de gránulos de azufre.

Con las otras Beggiatoa que se tenían en cultivos con heno y sulfato de calcio, se hicieron pasajes a medio con heno al 0,8%, sin sulfato, que es el usado por Cataldi para el enriquecimiento de las Beggiatoa que consiguió aislar; la autora señala que es necesario cultivar dicho germen en medio con heno para intentar su aislamiento. Una vez obtenido buen desarrollo en dicho medio, con gérmenes de procedencias diferentes, se hicieron cajas con medio de Busgen agarizado (1,2gr.%). En algunas ocasiones no se

separaron los filamentos en los copos y perdieron su movilidad; otras veces los filamentos se aislaron bastante, mediante su movimiento de arrastre; se cortaron diferentes trozos de agar y se llevaron a medio de Busgen, pero no se consiguió desarrollo.

Se ensayó el uso de diferentes concentraciones de extracto de carne, extracto de levadura, peptona, en agua de canilla y de diferentes diluciones de caldo común, no obteniéndose tampoco desarrollo. La única cepa aislada había desarrollado muy bien en medio de Busgen, tratándose de bacterias tan delicadas, posiblemente existan en las diferentes cepas, exigencias particulares relacionadas con el medio de cultivo.

b).- Ensayos de aislamiento de Thiothrix: Se hicieron cajas con agar agua ( se utilizó agar lavado), en concentraciones: 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6%, con el agregado de extracto de carne o extracto de levadura en concentraciones: 0,01 - 0,02 - 0,03 - 0,04% y a un pH alrededor de 7. Las cajas se hicieron con un trozo de lino (2%), o sin él. La mejor concentración de agar fue 0,4%: pareció que los filamentos desarrollaban, pero este desarrollo fue rápidamente ahogado por las infecciones y no pudo aumentar en forma considerable en ninguna de las tentativas de aislamiento.

### 3).- Morfología y caracteres de cultivo

a).- Beggiatoa desarrolla en los cultivos de enriquecimiento con heno, formando redes blancas adheridas a las paredes del frasco; estas redes se sitúan en zonas transversales formando franjas que pueden hallarse a diferentes alturas en el frasco, ubicación que parece estar relacionada con la cantidad de ácido sulfhídrico que se forma en el fondo del recipiente: cuando la concentración de este compuesto es elevada, estas bacterias desarrollan casi en la superficie del líquido y después de un tiempo, al dis-



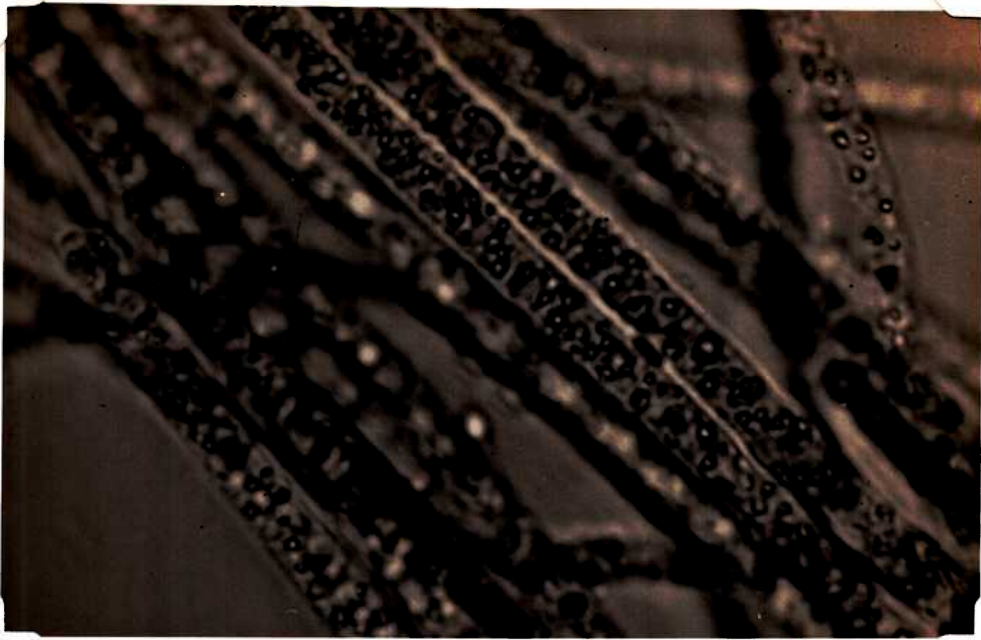


Fig.10.-Filamentos de Beggiatoa alba de un cultivo de enriquecimiento.(x2500)



Fig.11.-Filamentos de Beggiatoa alba de un cultivo puro.(x2500)

minuir la cantidad de ácido sulfhídrico, el desarrollo se observa en la parte inferior del frasco; si se agrega sulfato de calcio al medio, se nota que los filamentos se disponen formando redes en una zona más elevada. Cuando las condiciones del cultivo son muy buenas se pueden formar conglomerados que presentan el aspecto de verdaderos ovillos blancos.

Si se observa al microscopio uno de estos ovillos, se ve que está formado por filamentos oscuros, larguísimos y muy entrecruzados, dotados de un movimiento lento. Con gran aumento, puede notarse que el color oscuro de los filamentos, es debido a la presencia de gran cantidad de gránulos o corpúsculos negros, muy refringentes. Se demuestra la composición de dichos gránulos tratando un ovillo de filamentos colocado en un portaobjetos y dejado secar al aire, por ácido acético, según recomienda Corsini: los gránulos que se hallan en el interior del germen desaparecen y en el exterior se forman cristales de azufre.

Además de los copos, se observan filamentos libres de diferentes longitudes, Están dotados de un movimiento de arrastre y de otro de rotación alrededor de su eje; observando el extremo del filamento se nota que poseen un tercer movimiento, de oscilación, idéntico al de las Oscillatoria.

En cultivos con heno y sulfato de calcio los gránulos son tan abundantes, que es imposible tratar de diferenciar los elementos que constituyen el filamento; en cultivo puro, en medios con sustancias orgánicas, no presenta gránulos, siendo su aspecto muy semejante al de una cianofícea. Pueden observarse los tabiques que dividen los filamentos en segmentos que tienen las siguientes dimensiones: 2- 2,8 x 3,4 - 6,2/.

El hecho de presentar este organismo una morfología tan



Fig.12.-Copo de Beggiatoa alba de un cultivo puro.(x90)



Fig.13.-Filamentos de Beggiatoa alba de un cultivo puro pasados a agua con  $\text{SH}_2$ .(x2500)

semejante a la de algunas algas, podría hacer suponer que se tratara de un alga que hubiera perdido su pigmento; la propiedad que a distinguiría a la Beggiatoa, sería la de ser capaz de formar gránulos de azufre en el interior de los filamentos colocados en un medio con ácido sulfhídrico. Para demostrar que el germen aislado posee esa propiedad, se sembraron copos en una serie de tubos con 5c.c. de agua de canilla a los que se agregaron diferentes cantidades ( medidas por gotas ), de una solución saturada de ácido sulfhídrico. Observando los copos a las 24 horas se notó que se hallaban llenos de gránulos de azufre, obteniéndose los mejores resultados con 1, 3 ó 5 gotas de ácido sulfhídrico.

Se estudió el desarrollo en medios con diferentes sustancias orgánicas: extracto de carne, extracto de levadura, peptona, lactato de sodio y citrato de sodio , en las concentraciones: 0,025 0,05 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1%. También se ensayó el uso de caldo común y diluido 1:2, 1:3, 1:4. Se obtuvieron los siguientes resultados: A las 24 horas, el mejor desarrollo se produjo con extracto de carne 0,05 y 0,1%; posteriormente hubo desarrollo en otros tubos: extracto de carne desde 0,025 hasta 0,5%, extracto de levadura desde 0,025 hasta 0,1%, peptona desde 0,025 hasta 0,25%, caldo común. Con lactato de sodio el desarrollo fue más lento pero muy abundante en las concentraciones 0,05 y 0,1%. Con citrato de sodio no hubo desarrollo.

Se investigó la acción de diferentes fuentes de azufre. Como medio de cultivo se utilizó el medio mineral de Van Niel, para bacterias rojas, con o sin bicarbonato de sodio al 0,2%; se agregó sulfuro de sodio en las concentraciones: 0 - 0,001 - 0,003 - 0,01 0,03 - 0,1 - 0,3% ó bien tiosulfato de sodio en las concentraciones: 0,01 - 0,03 - 0,1 - 0,3 - 1%, ó bien solución saturada de áci-

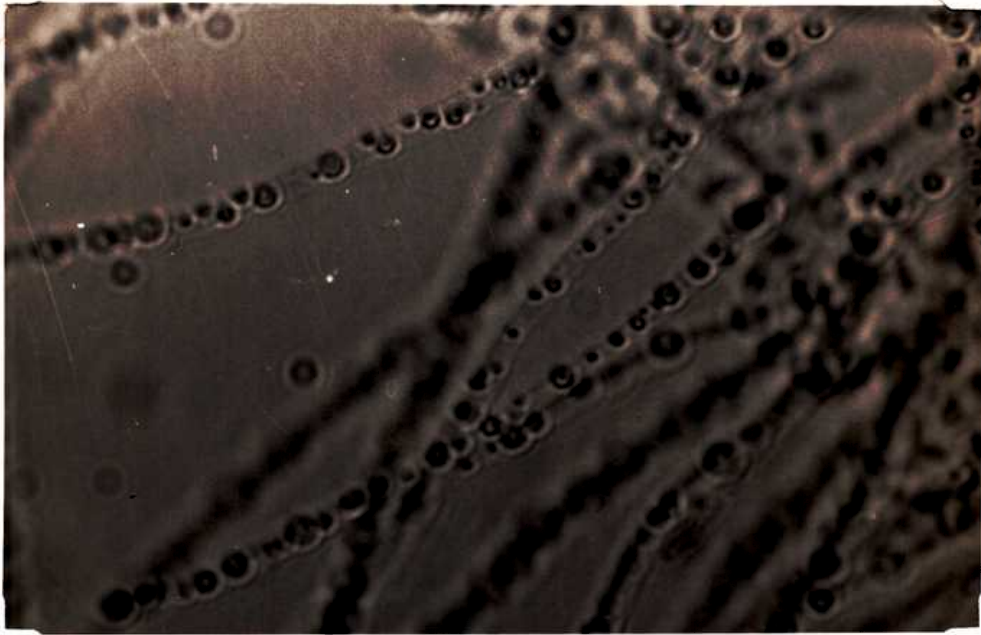


Fig.16.-Filamentos de Thiiothrix tenuis de un cultivo de enriquecimiento.(x2500)

do sulfhídrico: 1, 3, 5, 7, 9, 11 gotas en 10c.c. de medio. Todos los medios se llevaron a pH 7,4. Se obtuvo desarrollo con tiosulfato de sodio 0,01, 0,03 y 0,1% observándose gránulos de azufre en el interior de los filamentos. Escaso desarrollo con sulfuro de sodio 0,001 y 0,003 y con 1 y 3 gotas de ácido sulfhídrico.

b).- Thiothrix forma en los cultivos de enriquecimiento, copos blancos en el seno del líquido, que observados al microscopio con pequeño aumento se presentan como masas de filamentos negros, rígidos, inmóviles, con aspecto de verdaderos pelos; se hallan fijados por uno de los extremos a masas de bacterias o a otros filamentos, generalmente Cladothrix. Pueden estar dispuestos paralelamente, o bien, como sucede en la mayor parte de los casos, estar fijos en un mismo punto presentando así una disposición radiada característica.

Mediante gran aumento pueden observarse los gránulos de azufre en el interior de los filamentos, dispuestos generalmente en una única hilera. El ancho de los filamentos es de 1,2-1,4 $\mu$ . No existe diferenciación notable entre la base y el ápice de los filamentos. No pudieron observarse tabiques debido a que se trabajó siempre con cultivos de enriquecimiento, llenos de gránulos de azufre. En algunos cultivos se observaron trozos cortos de filamentos que parecían provistos de un lento movimiento de arrastre y que podrían corresponder a los conidios citados en las descripciones que se han hecho de Thiothrix.

#### 4).- Posición sistemática de las bacterias estudiadas:

La bacteria filamentosa, móvil, se obtuvo en cultivos de enriquecimiento de 10 muestras de agua y se consiguió aislarla únicamente de una de ellas. Corresponde al género Beggiatoa, cuya diagnosis es la siguiente:

## Género Beggiatoa.

Género creado por Trevisan, para incluir ciertas bacterias filamentosas del agua. La definición genérica dada es: *Thallus e filis muco obvolutis, liberis, oscillantibus, simplicibus, elasticis, rigides, arachnoideis, punctis asterisceformibus, primum in fascias dispositis deinde inordinatis, notatis conflatus.*

El género es colocado por diferentes autores entre las algas o entre los hongos; frecuentemente con las Oscillatoria, entre las cianofíceas. La especie tipo es Beggiatoa alba (Vauch.) Trev. llamada Beggiatoa punctata por Trevisan, en 1842. Kuetzing incluye Beggiatoa como el primer subgénero de Oscillaria y describe siete especies.

Cohn incluye el género en la tribu Nematogenae y Trevisan en la subtribu Euvibrionieae. Este género es incluido entre las bacterias por varios autores antes de 1888, incluyendo Magnin, en 1879, Winter, en 1880, Van Thiegem, en 1884, Grove, en 1884, Zopf, en 1885, Flügge, en 1886. Hansgirg lo incluye como único género de su subfamilia Beggiatoeae. Winogradsky aclara la diagnosis del género: Lo describe como formado por filamentos siempre libremente móviles, nunca fijos a un sustrato, incoloros y sin vaina, variables en el ancho y que muestran un crecimiento intercalar uniforme y no tienen diferenciación entre la base y la punta. Bajo condiciones normales de desarrollo siempre contienen gránulos de azufre en cantidades que varían con las condiciones. Esos gránulos aparecen en forma de gotas oleosas redondas, que consisten en azufre blando o semifluido; no se observan nunca cristales de azufre en los filamentos vivos. La unión de los filamentos puede verse sólo cuando no existe azufre en el interior de los mismos. Winogradsky considera difícil la diferenciación de buenas especies en base al tamaño.

La diagnosis de Winogradsky fue aceptada generalmente por los sistemáticos subsiguientes. Migula, en 1894, afirma: "Beggiatoa Trevisan, Zellen mit Schwefelkörnchen. Diesen letzere Familie und Gattung schliess sich auch in ihrem anatomischen Bau so eng an die Oscillarien an, dass sie besser mit diessen vereinigt und die Schizophyceen zugeweißen wird."

Buchanan, en 1918, designa la especie tipo como Beggiatoa alba (Vaucher) Trevisan. Bergey y colaboradores lo incluyen como el segundo género de la familia Beggiatoaceae, con la siguiente descripción: Filamentos sin vaina, formados por células planas, discoidales, no fijados. Multiplicación por división transversal de los filamentos. Muestra deslizamiento ondulatorio. Las células contienen gránulos de azufre. La especie tipo es Beggiatoa alba (Vaucher) Trevisan.

La cepa aislada se clasifica por sus dimensiones como Beggiatoa alba (Vaucher) Trevisan, especie caracterizada por la siguiente descripción:

Beggiatoa alba (Vaucher) Trevisan. (Oscillaria alba Vaucher, Conferv., 198; Beggiatoa punctata Trevisan, Flora Euganea 1842, 56; Trevisan, I generi e le specie delle batteriacee, 1889, 10.)

Filamentos de considerable longitud y 3 - 4/ de diámetro conteniendo numerosos gránulos de azufre fuertemente refringentes. Los filamentos se parten en segmentos cortos que después desarrollan en largos filamentos. Los sulfatos son reducidos a azufre libre. Los filamentos están adheridos a plantas acuáticas produciendo copos viscosos.

Habitat: Fuentes sulfurosas; pantanos.

La bacteria filamentosa, fija, inmóvil, se obtuvo en cul-



tivos de enriquecimiento de 4 muestras de aguas, no habiendo sido posible aún aislarla. Corresponde al género Thiothrix, cuya diagnosis es la siguiente:

Género Thiothrix.

Género de bacterias del azufre propuesto por Winogradsky, con la siguiente diagnosis: "Faden unbeweglich, gegliedert, mit einer zarten Scheide, einen deutlichen Gegensatz von Basis und Spitze zeigend, durch ein Gallertpolster an feste Gegenstände befestigt, unter normalen Wachstumsbedingungen dicht mit Schwefelkörnern gefüllt; Reproduction durch Stäbchengonidien, welche auf festen Gegenständen kriechend sich langsam bewegen, nach kurzer Bewegungsdauer sich auf verschiedene Gegenstände festsetzen und zu Fäden auswachsen.

El género es reconocido por muchos autores posteriores, entre ellos Migula, en 1894, Chester, en 1899, Ligula, en 1900, Chester, en 1901, Fischer, en 1903, E.F. Smith, en 1905, Orla-Jensen, en 1909, Heim, en 1911, Frost, en 1911. Buchanan, en 1918, incluye este género como el primero en la familia Beggiatoaceae, con la siguiente descripción: Filamentos inmóviles, segmentados, con una diferenciación definida entre base y punta, fijados, generalmente llenos de gránulos de azufre. Los filamentos producen conidios en forma de bastones, en sus extremos. Estos conidios son móviles por medio de un lento movimiento de arrastre, se fijan y desarrollan un nuevo filamento. El habitat es fuentes sulfurosas calientes. La especie tipo es Thiothrix nivea (Rabenhorst) Winogradsky. Bergey y colaboradores, en 1923 y también en 1939, adoptan esta descripción.

Los representantes del género Thiothrix que se obtuvieron en el presente trabajo pueden ser identificados como pertenecientes a la especie Thiothrix tenuis Winogradsky, que se distingue por

los siguientes caracteres:

Thiothrix tenuis Winogradsky. (Beitrage zur Morph. u. Physiol. der Bakterien, I. Schwefelbakterien, 1888,39.)

Filamentos<sup>a</sup> muy largos y con alrededor de un micron de ancho; de grosor casi uniforme.

Habitat: Agua sulfurosa.

---

### III).- Bacterias del azufre con pigmento rojo o verde.

Se tratará a continuación del interesante grupo de bacterias caracterizadas por poseer pigmentos fotosintéticos; algunas presentan color rojo y otras poseen pigmentos que les dan un color verde semejante al proporcionado por la clorófila a los vegetales superiores.

1).- Cultivos de enriquecimiento: Como estas bacterias son anaerobias, fue necesario, para lograr en lo posible la expulsión del oxígeno de los cultivos de enriquecimiento, utilizar el procedimiento simple de Beijerinck, citado por Van Niel. Consiste en el empleo de frascos de vidrio de cuello angosto y tapón esmerilado, que se llenan completamente con el líquido de cultivo previamente hervido y se tapan cuidando que no queden burbujas de aire. En el presente trabajo se utilizaron frascos de 300 a 500c.c. de capacidad.

Se siguieron dos métodos: Uno de ellos, el de Winogradsky, es semejante al usado para el enriquecimiento de las formas incoloras, con azufre en su interior; es decir, el material de barro y aguas se mezcla con sulfato de calcio y creta y se le agrega un puñado de heno; luego se llenan los frascos con agua de canilla. En este caso los frascos deben colmarse con el líquido, para lograr una buena anaerobiosis.

Otro de los métodos de enriquecimiento usados fue el descrito por Van Niel, en su magistral trabajo sobre las bacterias rojas y verdes. Consiste en la utilización de un medio inorgánico, con la siguiente composición básica:

Cloruro de amonio. . . . .	1,0	gr.
Fosfato bipotásico . . . . .	0,5	gr.
Cloruro de magnesio. . . . .	0,2	gr.
Agua destilada . . . . .	1000	c.c.

Además se agrega bicarbonato de sodio y sulfuro de sodio en diferentes concentraciones, generalmente 0,1% de sulfuro de sodio y 0,5% de bicarbonato de sodio.

Van Niel, consideró tres grupos de bacterias según la concentración de sulfuro de sodio y el pH óptimos para el desarrollo y recomendó la utilización de este medio básico, con diferentes cantidades de sulfuro de sodio y en condiciones diferentes de pH, para la obtención de cultivos de enriquecimiento de los diferentes tipos de bacterias coloreadas. Para el grupo 1: 0,1 - 0,2% de sulfuro de sodio y pH alrededor de 9. Para el grupo 2: 0,02 - 0,05% de sulfuro de sodio y pH 7,5 - 8. Para el grupo 3: 0,1 - 0,2% de sulfuro de sodio y pH 7,5. En adelante se denominarán estos medios V.N.I., V.N.II., V.N.III.

De acuerdo con las directivas encontradas en el trabajo de Van Niel, los frascos se expusieron a la luz artificial; para ello se dispusieron lamparitas eléctricas en los estantes de un armario metálico, modificándose la temperatura a voluntad mediante el uso de bombitas de mayor o menor intensidad; en general se procuró obtener una temperatura de 30 a 32°. En verano fue suficiente utilizar bombitas de 40 Watt. para obtener la temperatura deseada; en invierno se usaron de 60 y 100Watt.

Se ensayó también el medio de Lehner, que es un medio inorgánico cuya composición es semejante a la del medio de Van Niel

Bicarbonato de sodio . . . . .	5,0	gr.
Cloruro de amonio . . . . .	1,0	gr.
Tiosulfato de sodio . . . . .	2,0	gr.
Carbonato de magnesio . . . . .	0,2	gr.
Fosfato monopotásico . . . . .	0,1	gr.
Sulfuro de sodio . . . . .	1,0	gr.
Agua . . . . .	1000	c.c.

En los frascos con heno se obtuvieron mezclas de bacterias coloreadas, pero dieron muy buen resultado como procedimiento para

cultivo en bruto, sobre todo para las bacterias verdes. Por el método de Van Niel, más selectivo, desarrollaron solamente las bacterias correspondientes a alguno de los grupos. En general, se siguió el primer método y luego se hicieron enriquecimientos y aislamientos en los diferentes medios de Van Niel.

Se utilizaron muestras provenientes de aguas estancadas y de tierras de jardín. En el caso de utilizarse el medio de Van Niel, se sembraron 5 - 10c.c. de agua o aproximadamente 1gr. de tierra; si se trabajaba con el método de Winogradsky, se colocaba en el frasco el material con bastante barro, y luego se agregaba agua de canilla hasta colmar el recipiente.

2).- Aislamiento: Se usó el método de aislamiento en tubos de agar, por ser el más sencillo y dar excelente resultado. Se prepara el medio tipo de Van Niel, con 2% de agar lavado y se entuba a razón de 10 c.c. por tubo; se esteriliza a 120°. Aparte se preparan las soluciones de bicarbonato de sodio al 5%, esterilizada por filtro Zeits o por bujía, el sulfuro de sodio, ácido fosfórico y carbonato de sodio, al 10%, esterilizados en autoclave a 110°.

Para efectuar el aislamiento, una vez fundido y entibiado el agar, se le agrega el bicarbonato de sodio, generalmente en la proporción de 0,5%, y luego el sulfuro de sodio, en las diferentes proporciones ya mencionadas según los medios. Se lleva al pH necesario mediante el agregado de ácido fosfórico o carbonato de sodio estéril, al 2 ó al 10%. Se siembra un tubo con unas gotas del cultivo de enriquecimiento y se hacen 7 u 8 diluciones sembrando en cada pasaje cuatro o cinco gotas de medio. Se enfrían rápidamente los tubos y se cubre la superficie del medio con una capa de vaselina - parafina, para impedir la acción del oxígeno.

Una vez obtenido desarrollo de colonias, que se produce a los 5 ó 6 días, se eligen los tubos de diluciones mayores, donde las colonias se hallan bastante espaciadas y se corta el agar en rodajas; se pican las colonias y se llevan nuevamente al medio sólido, haciendo diluciones; es necesario hacer varios pasajes de colonia a colonia, porque muchas veces en una colonia suele presentarse la bacteria del azufre muy mezclada con otras bacterias. Una vez aislados, los gérmenes se conservan en cultivos en punción en el medio agarizado al 0,5 ó al 2% y cubierto por vase, lina parafina.

3).- Métodos generales para el estudio de las bacterias rojas y verdes del azufre: En los ensayos realizados para estudiar los caracteres de cultivo y para la fisiología se usó el medio de Van Niel, con 0,2 ó 0,5% de agar; los tubos fueron hervidos largo rato antes de ser utilizados, para expulsar todo el aire.

En el estudio de la influencia del sulfuro de sodio y del pH, se utilizaron las concentraciones: 0 - 0,03 - 0,1 - 0,3% y los pH: 6 - 6,5 - 7 - 7,5 - 8 - 8,5 - 9. Se investigó también la influencia del bicarbonato de sodio en las concentraciones: 0 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1% y la del cloruro de sodio: 0 - 0,5 - 1 - 2 - 5%.

Los cultivos se hicieron con la concentración de sulfuro de sodio y el pH óptimos para cada cepa.

Para la fisiología se estudió: Si las bacterias eran capaces de desarrollar con tiosulfato de sodio como fuente de azufre; para ello se empleó este compuesto en las proporciones: 0 - 0,03 - 0,1 - 0,3 - 1%, con o sin sulfuro de sodio al 0,03%. Se agregó una gota de solución de sulfuro de sodio al 1%, (concentración que

es insuficiente para el desarrollo de estas bacterias), para lograr la anaerobiosis.

Para el estudio de las fuentes de nitrógeno se utilizaron: cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de sodio y nitrito de potasio, en las concentraciones: 0 - 0,03 - 0,1 - 0,3%. Se agregaron al medio Van Niel con 0,5% de agar.

Además se trató de investigar: 1º: Si estos organismos son autótrofos absolutos o facultativos, es decir, si en ausencia del compuesto de azufre que son capaces de utilizar, pueden desarrollar mediante el empleo de sustancias orgánicas. 2º: Si las sustancias orgánicas influyen en el desarrollo, agregadas a los medios con sulfuro de sodio. 3º: Si estos organismos son capaces de desarrollar en la oscuridad, ya sea con sulfuro de sodio o bien con sustancias orgánicas. Para lograr dichos fines se usó el medio de Van Niel con agar al 0,5% y bicarbonato de sodio al 0,5% y las siguientes sustancias orgánicas: extracto de carne, extracto de levadura, peptona, lactato de sodio y citrato de sodio, en las concentraciones: 0 - 0,03 - 0,1 - 0,3%. Una serie de tubos se hizo sin sulfuro de sodio y sustancias orgánicas, cuidando la anaerobiosis en la forma ya citada. Otra serie se hizo con la concentración de sulfuro de sodio óptima para cada cepa y además las diferentes sustancias orgánicas. Las dos series se pusieron a la luz y un duplicado de la primera se dejó en la oscuridad; también se colocaron a la luz y oscuridad tubos con la concentración óptima de sulfuro de sodio pero sin el agregado de sustancias orgánicas.

Para facilitar el estudio de las bacterias halladas, se separaron en dos grupos teniendo en cuenta el color proporcionado a los cultivos de estos organismos por los pigmentos que poseen:

A).- Bacterias con pigmento rojo.

B).- Bacterias con pigmento verde.

A).- Bacterias con pigmento rojo.

Los cultivos de bacterias pertenecientes a este grupo, presentan una coloración roja intensa, que es algo más apagada y con un tinte lechoso en los cultivos jóvenes, provistos de gránulos de azufre, ya sea en el interior de las células o en el exterior de las mismas. El color se hace más vivo y a veces con un leve matiz purpurino, a medida que el cultivo envejece y el azufre va desapareciendo.

Estas bacterias se describirán separadamente en dos grupos:

- 1).- Bacterias rojas que depositan azufre en el interior de sus células.
- 2).- Bacterias rojas que no depositan azufre en el interior de sus células, pero sí en el exterior.

---

1).- Bacterias rojas que depositan azufre en el interior de sus células.

Presentan diferencias que permiten hacer con estas bacterias dos subgrupos:

Subgrupo I).- Células de forma elipsoidea o cilíndrica.  
Gérmenes libres, móviles.

Subgrupo II).- Células de forma generalmente esférica. La mayoría de los gérmenes se agrupan en masas inmóviles. Los gérmenes aislados o dispuestos en diplococos son móviles.

---

Subgrupo I).- Estas bacterias provienen de cultivos de enriquecimiento en medio de Winogradsky o de Van Niel y fueron aisladas en medio Van Niel III.

- 1).- Morfología: Estas bacterias tienen; generalmente,



forma elipsoidea o cilíndrica, pero presentan grandes variaciones en la forma y el tamaño, sujetas a las condiciones del medio; las células son redondeadas a pH bajo: 6 - 6,5 y algo más alargadas a pH 7,5 - 8. El tamaño aumenta al aumentar la concentración de sulfuro de sodio en el medio. En un mismo preparado pueden encontrarse células de tamaños diferentes y de forma elíptica o cilíndrica. A veces, las bacterias presentan un ligero encurvamiento que les da forma de haba.

Los gérmenes son, en su mayoría, libres y dotados de movimiento; se presentan aislados o en pares; otras veces, generalmente con grandes concentraciones de sulfuro de sodio, parecen formar cadenas, aunque no se distinguen tabiques sino solamente estrangulaciones.

En cultivos jóvenes, las bacterias están completamente llenas de gránulos de azufre, que presentan el aspecto de gotas brillantes, muy refringentes; en cultivos viejos, al ser consumido el sulfuro de sodio del medio, las células no poseen ya gránulos y finalmente pierden la movilidad. En estos cultivos se presentan los gérmenes con diferentes aspectos, variando la forma y el tamaño. En cultivos muy viejos suelen encontrarse células de un tamaño mayor que lo común, dispuestas como diplococos aplanados, con paredes espesadas y muy refringentes, que podrían corresponder a las formas de resistencia mencionadas por Van Niel.

El tamaño de estos organismos es de 2,4 - 5,6  $\mu$  1,2 - 2,8  $\mu$

2).- Caracteres de cultivo: En el medio V.N.III líquido, en tubos con tapón de vaselina - parafina, el desarrollo no es muy abundante. Mejor desarrollo se obtiene con el medio agarizado al 0,2, 0,5, ó 2%.

3).- Acción del bicarbonato de sodio: El desarrollo es

más o menos parejo en todas las concentraciones ensayadas.

4).- Acción del sulfuro de sodio y del pH: Con 0,03% de sulfuro de sodio, el desarrollo es muy escaso y de color rosa pálido a pH 7 y 8; con 0,1 y 0,3% de sulfuro de sodio, el mejor desarrollo se obtiene con pH desde 7 a 8,5; siendo el óptimo 7 - 7,5. Al aumentar la concentración de sulfuro de sodio, el desarrollo se hace más lento.

5).- Acción del cloruro de sodio: Parece no ejercer influencia sobre el desarrollo.

6).- Fuente de azufre: No se obtiene desarrollo con tiosulfato de sodio.

7).- Fuentes de nitrógeno: El mejor desarrollo se obtiene con cloruro de amonio o sulfato de amonio, desde 0,03 a 0,3%; el desarrollo es escaso con 0,03% de nitrato de sodio.

8).- Acción de las sustancias orgánicas: En general el desarrollo es mejor con sulfuro de sodio que sin él. Con sustancias orgánicas y con sulfuro de sodio hay desarrollo con: extracto de carne y peptona desde 0,03 - 0,3%, extracto de levadura y lactato de sodio 0,03 y 0,1% y con citrato de sodio 0,03%; el mejor desarrollo, con colonias de mayor tamaño y pigmentación más fuerte se produce con lactato de sodio 0,1%.

Con sustancias orgánicas, sin sulfuro de sodio, hay desarrollo con: extracto de carne desde 0,03 a 0,3% y muy escaso con: extracto de levadura 0,03%, peptona 0,1%, lactato de sodio 0,1 y 0,3%; el mejor desarrollo se obtiene con extracto de carne 0,3%.

En la oscuridad no se obtiene desarrollo con sulfuro de sodio ni con sustancias orgánicas.

9).- Posición sistemática de las bacterias estudiadas:

De las 5 cepas aisladas 3 provienen de tierras de jardín y 2 de aguas. Se identifican como representantes del género Chromatium Perty. Según las descripciones de Van Niel, se pueden considerar pertenecientes al tipo morfológico Chromatium, cuya diagnosis sigue a continuación:

Género Chromatium.

Nombre genérico creado por Perty, en 1852, con la siguiente diagnosis: "Körper äusserst klein, cylindrisch, roth, braun, violett, grün gefärbt, im ausgebildeten Zustand mit innem Bläschen (Blastien). Ein Bewegungsfaden am Vorderende? Vermehren sich durch Quertheilung. " El género fue reconocido y descripto más ampliamente por Schroeter, en 1886. Winogradsky incluye este género entre sus bacterias del azufre. Acepta la diagnosis de Schroeter y reconoce la especie mejor conocida Chromatium okenii. El género es incluido en las clasificaciones de bacterias del azufre en la subfamilia Chromatiaceae por Ligula, en 1900 y 1904, E.F. Smith en 1905 y Frost en 1911. Orla-Jensen, en 1909, lo considera sinónimo de Rhodomonas. Buchanan, en 1911, y Bergey y colaboradores, en 1923, dan la siguiente diagnosis que se encuentra sin modificaciones en la clave de Bergey de 1939:

Células elíptico-cilíndricas o cilíndricas relativamente gruesas. Contenido celular rojo, conteniendo gránulos de azufre oscuros. Células algo variables en forma, rectas, más o menos curvadas, células cortas ovoides y las alargadas cilíndricas. Móviles por medio de flagelos polares. La especie tipo es Chromatium okenii Perty.

En lo que se refiere a la especie, el polimorfismo de estos organismos, unido al hecho de que en las clasificaciones existentes no se han tratado estas bacterias en cultivo puro, hacen difícil intentar la identificación. De acuerdo con la clave de

Bergey y con las descripciones de Bavendamm, y teniendo en cuenta el tamaño de las células, podrían ser identificadas como Chromatium vinosum Ehrenberg (Winogradsky), cuya descripción es la siguiente:

Chromatium vinosum (Ehrenberg) Winogradsky. (Ehrenberg, Infusionstierchen, 1838; Winogradsky, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien, I. Schwefelbakterien, 1888, 99.) Células elípticas,  $2,1 \times 5$  . Las masas son de color violeta rojizo, Activamente móviles.

Habitat: Agua.

---

Subgrupo II: El enriquecimiento se obtuvo por el método de Winogradsky y el aislamiento utilizando el medio V.N.III.

1).- Morfología: Estas bacterias tienen en general forma esférica, presentándose aisladas ó en pares como diplococos; suelen formar tetradas y conglomerados constituidos por diferentes números de células, como racimos. Las células libres y los diplococos son móviles; a veces se observan agrupaciones de 3 células dotadas de movimiento de rotación.

El diámetro de estas bacterias es de 1,4 - 2 " .

Las células, en los cultivos jóvenes, se hallan llenas de gran cantidad de gránulos de azufre, que van desapareciendo al envejecer los cultivos, quedando finalmente el protoplasma vacuolizado; en cultivos muy viejos se observan diplococos muy grandes, con paredes espesadas, análogamente a lo que sucede en el subgrupo anterior.

2).- Caracteres de cultivo: Esta bacteria es muy exigente con respecto a las condiciones del medio de cultivo; en muchas ocasiones no se consiguió obtener desarrollo, lo que dificultó

las experiencias. En medio V.N.III líquido no desarrolla pero sí en dicho medio agarizado, siendo el cultivo de color rojo, muy poco castaño.

3).- Acción del bicarbonato de sodio: Con 0,5% se obtiene el mejor desarrollo.

4).- Acción del sulfuro de sodio y del pH: Desarrolla con sulfuro de sodio 0,03 y 0,1% y pH 7 - 7,5; el desarrollo es más lento con 0,3% de sulfuro y pH 7,5. En general las mejores condiciones son: sulfuro de sodio 0,1% y pH 7.

5).- Fuente de azufre: No desarrolla con tiosulfato de sodio.

6).- Fuente de nitrógeno: Desarrolla únicamente con cloruro de amonio 0,03 y 0,1%.

7).- Acción de las sustancias orgánicas: En general el desarrollo es mejor con sustancias orgánicas sin sulfuro de sodio, que con el agregado de sulfuro; se obtiene buen desarrollo con extracto de carne 0,03%; el mejor desarrollo con lactato de sodio 0,03%; algo menor con lactato de sodio al 0,1%; con sulfuro de sodio y sustancias orgánicas no se produjo desarrollo notable.

En la oscuridad no hubo desarrollo en el medio con sulfuro de sodio ni con sustancias orgánicas.

8).- Posición sistemática de la cepa estudiada: Se aisló una cepa proveniente de agua. Teniendo en cuenta la clasificación de las bacterias rojas en base a la morfología, hecha por Van Niel este organismo podría pertenecer al tipo Thiocystis. Este género tiene los siguientes caracteres:

Género Thiocystis.

Género de bacterias del azufre descrito por Winogradsky en 1888. Las células esféricas están reunidas en familias peque-

ñas compactas, envueltas individual o conjuntamente en un quiste gelatinoso y capaces de tener movilidad. Generalmente de 4 - 20 - 30 células están unidas en una familia. Las células son vivamente coloreadas, las células aisladas casi incoloras. En masas las células muestran un hermoso color violeta o rojo violado. Las células están frecuentemente llenas de gránulos de azufre.

El género fue incluido por Trevisan en 1889, en la tribu Ascococceae. De Toni y Trevisan en 1889, dan una nueva descripción. El género es discutido por Nigula en 1900 y 1904, por Smith en 1905 y Frost en 1911. Smith da también una descripción.

Orla-Jensen en 1909, hace de este nombre genérico un sinónimo de Rhodocystis. Buchanan en 1918, lo incluye como el primer género de la tribu Thiocapseeae y da una descripción que se conserva en la clasificación de Bergey y colaboradores de 1939, con ligeras modificaciones. La descripción dada por estos últimos es la siguiente:

Generalmente 4 a 30 células unidas en familias pequeñas, compactas, envueltas de a una o varias conjuntamente en un quiste gelatinoso, capaces de estar dotadas de movilidad. Cuando las familias han alcanzado un tamaño definido, escapan del quiste gelatinoso, hinchándose y ablandándose este último uniformemente o en algún sitio particular. Las células que han escapado pasan al estado de células móviles o se unen en complejos de familias muy fusionadas, de los cuales se separan más tarde. Las células son vivamente coloreadas, las células aisladas casi incoloras. En masas las células muestran un hermoso color violeta o rojo. Las células están frecuentemente llenas de gránulos de azufre.

La especie tipo es Thiocystis violacea Winogradsky.

En la descripción de este género figuran, según se ha

visto, la existencia de membranas gelatinosas y quistes, formaciones que no se presentan en las bacterias estudiadas.

Sin embargo, la forma estudiada en este trabajo coincidiría más, de acuerdo con Bavendamm, con el género Lamprocystis, que posee las características siguientes:

Género Lamprocystis.

Nombre genérico propuesto por Schroeter en 1886 para reemplazar al género invalidado Cohnia Winter (q.v.), con la siguiente descripción: "Zellen elliptisch, anfangs zu rundlichen Zellhaufen zusammengeballt, später hohle Säcke bildend, in welchen die Zellen einschichtig einer Schleimmasse eingebettet lagern; zuletzt zerreisst die Haut stellenweise und bildet ein Netz. Zellinhalt rötlich. Von der Spaltalgengattung Clathrocystis Henfrey nur durch den Mangel des Phycochroms verschieden." Se incluye una especie: Lamprocystis roseo-persicina. Winogradsky en 1888 describe el género con más detalle. De Toni y Trevisan en 1889 dan también una diagnosis. Migula en 1900, describe el género y lo incluye en las Rhodobacteriaceae. Su descripción fue usada por Smith en 1905, y Frost en 1911. El nombre genérico es también usado por Orla-Jensen en 1909, para el octavo género de la familia Rhodobacteriaceae del orden Cephalotrichinae. Buchanan en 1918, da una descripción genérica que es seguida por Bergey y colaboradores en 1923, los que incluyen el género en la tribu Lamprocysteae. En la clave de Bergey y colaboradores de 1939, se conserva la misma descripción:

Células elipsoideas que se dividen primeramente en 3 planos para formar masas esféricas de células, más tarde en 2 planos formando sacos huecos en los cuales las células se hallan embebidas en una película en las paredes; finalmente la membrana se rompe y la masa total toma aspecto de red como sucede en el género

de algas Clathrocystis. Generalmente coloreadas intensamente de violeta. Presentan pequeños gránulos de azufre. Capaces de estar dotados de movilidad. La especie tipo es Lamprocystis roseopersicina (Kützing) Schroeter.

Por las dimensiones podría tratarse de la especie Lamprocystis rosea, cuya descripción dada por Bavendamm es la siguiente:

Lamprocystis rosea (Miyoshi) Migula, System der Bakterien. 1900, 1044; Thioderma roseum Miyoshi, Jour. Coll. Sc. Imp. Univ. Tokyo, 1897, 158.

Células esferoideas, 2,5 de largo, 1,5 de ancho, coloreadas de rojo pálido, reunidas en películas de color rojo púrpura pálido. La mayoría con pequeños gránulos de azufre.

Pero, no habiéndose podido obtener cultivos en medios líquidos, no se ha observado en la bacteria estudiada la formación de película fina que figura como característica de esta especie. En conclusión la posición sistemática de la forma estudiada queda indefinida, hasta que no consiga efectuarse una comparación, en cultivo puro, entre diferentes representantes de los géneros Chromatium, por una parte y Thiocystis y Lamprocystis por la otra.

La forma estudiada presenta, sin embargo suficientes características que difieren de las del género Chromatium, como para no considerarla comprendida dentro del mismo, aunque la inclusión en los géneros Thiocystis o Lamprocystis es una cuestión que queda aún por resolver debido especialmente a la escasez de los datos contenidos en las descripciones que se encuentran en la literatura, las cuales no se refieren a cultivos puros y no han podido, en consecuencia, ser comparadas con las de la forma estudiada en el presente trabajo.

---



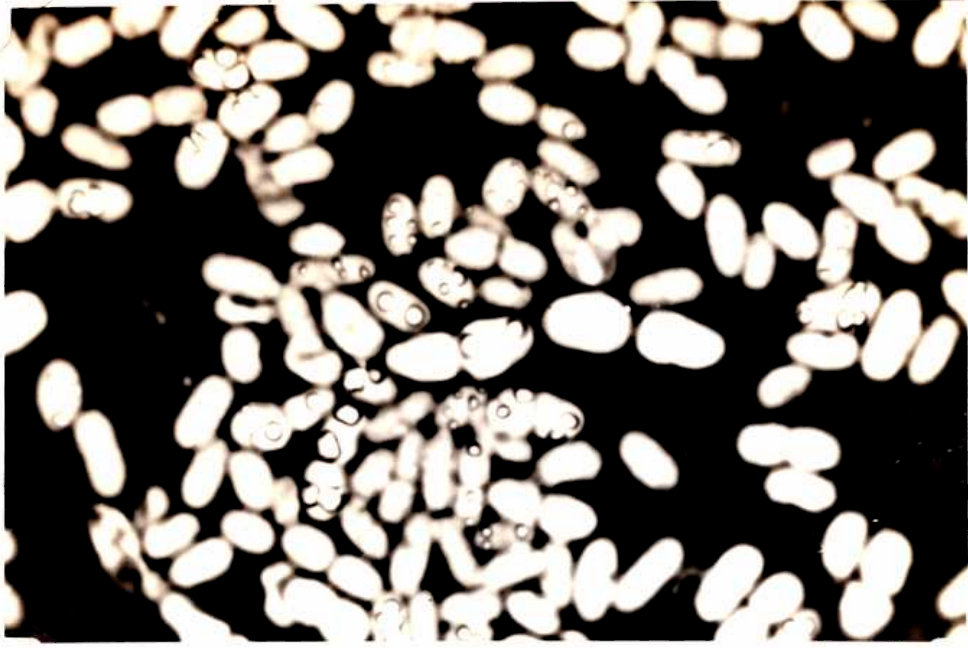


Fig.17.- Chromatium vinosum. (x2500)

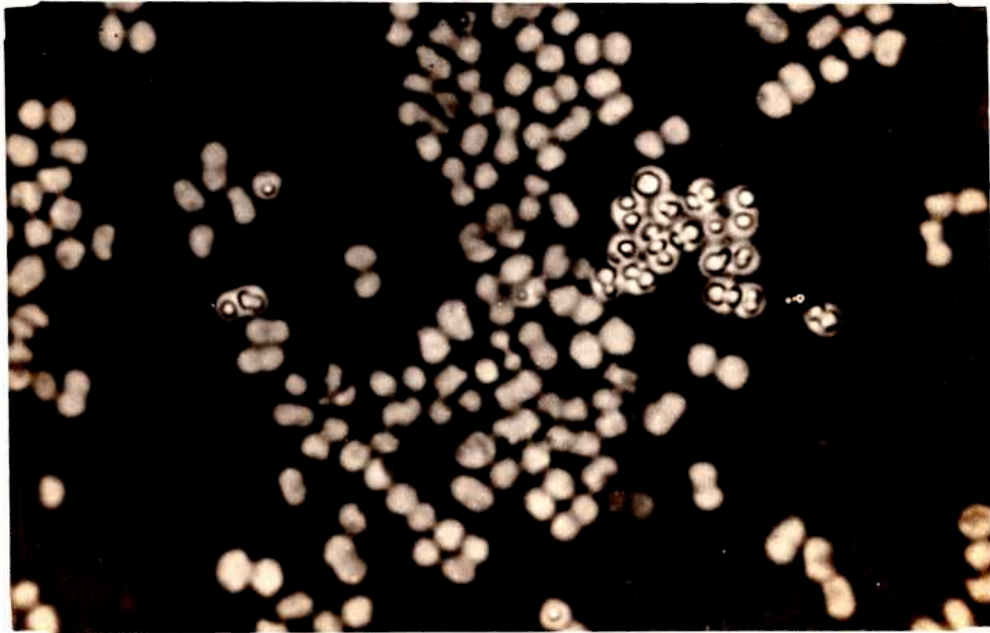


Fig.18.- Lamprocystis rosea. (x2500)

2).- Bacterias rojas que no depositan azufre en el interior de las células, pero sí en el exterior.

Las bacterias que forman este grupo no depositan azufre en el interior de las células, aunque este elemento se encuentra en gran abundancia en el exterior de los gérmenes formando gránulos, análogamente a lo que sucede en el caso de las bacterias incoloras descritas anteriormente correspondientes al género Thiobacillus. A su vez las cepas de este grupo presentan ciertas diferencias que permiten hacer tres subgrupos:

Subgrupo I: Células en forma de bastones, móviles.

Subgrupo II: Células en forma de vibriónes, móviles.

Subgrupo III: Células en forma de espirilos, móviles.

---

Subgrupo I: El enriquecimiento se obtuvo en el medio de Lehner y el aislamiento en el mismo medio con agar. Luego se hicieron pasajes al medio V.N.III, continuándose las experiencias en el medio de Van Niel, para uniformar los métodos.

1).- Morfología: Estas bacterias tienen forma de bastones, variando bastante su tamaño con las condiciones del medio de cultivo. Son móviles y se presentan aislados o en pares. El tamaño varía desde  $1,5 - 4 \times 0,6 - 1,6 \mu$ ; aumenta al aumentar la concentración de sulfuro de sodio y el pH. La forma de los bastoncitos puede ser elíptica, cuando son cortos y de extremos redondeados; cuando las bacterias tienen tamaño mayor se presentan a veces ligeramente encurvadas. A pH 7 las formas son redondeadas y pueden formar cadenas cortas de 4, 5 y raras veces 10 elementos, asemejándose a estreptococos. El azufre se halla en el exterior de los organismos y tiene el aspecto de gotas oleosas, refringen-

tes; nunca se observó azufre en el interior de las células.

2).- Caracteres de cultivo: Se aislaron de medio de Lehner líquido, en el que se produce buen desarrollo. En el medio V.N.III también se obtiene buen desarrollo, aunque como se verá más adelante es mejor con un pH más alto: 8 - 8,5.

3).- Acción del bicarbonato de sodio: El mejor desarrollo se obtiene con 0,2 y 0,5%.

4).- Acción del sulfuro de sodio y del pH: Con 0,03% de sulfuro de sodio y pH 7,5 - 8 - 8,5 - 9, hay poco desarrollo; con 0,1 y 0,3% de sulfuro hay buen desarrollo a pH 7,5 - 8 - 8,5 - 9; el desarrollo óptimo se obtiene con 0,1% de sulfuro y pH 8; en general el desarrollo es escaso a pH menor que 8 y es lento con grandes concentraciones de sulfuro de sodio.

5).- Acción del cloruro de sodio: Con 10% no hay desarrollo; con las demás concentraciones desarrolla bien y con 1% el desarrollo es favorecido.

6).- Fuente de azufre: Desarrolla muy bien con tiosulfato de sodio al 1%, ya sea sin sulfuro de sodio o con este compuesto en la concentración 0,03%; el desarrollo es escaso con tiosulfato 0,3% con o sin sulfuro y menor aún con tiosulfato 0,03 y 0,1% con el agregado de sulfuro 0,03%.

7).- Fuentes de nitrógeno: Las más favorables son: cloruro de amonio y sulfato de amonio 0,03 y 0,1%; menor desarrollo con 0,3% y escaso con nitrato de sodio y nitrito de potasio 0,03%.

8).- Acción de las sustancias orgánicas: En general, el desarrollo es mejor con sulfuro de sodio que sin él.

Con sustancias orgánicas y con sulfuro de sodio, se obtiene buen desarrollo con: extracto de carne y extracto de levadura 0,03 y 0,1% y: peptona, lactato de sodio y citrato de sodio desde

0,03 a 0,3%; en general el extracto de levadura y la peptona agregados en concentraciones de 0,03 y 0,1 al medio con sulfuro de sodio, favorecen el desarrollo.

Con sustancias orgánicas y sin sulfuro de sodio, se obtienen los siguientes resultados: el mejor desarrollo se produce con lactato de sodio al 0,1 y 0,3% y con citrato de sodio 0,1%; también hay desarrollo, aunque más escaso con: extracto de carne 0,1%, peptona de 0,03 a 0,3%, lactato de sodio 0,03% y citrato de sodio 0,03 y 0,3%.

Estas bacterias no desarrollan en la oscuridad, con sulfuro de sodio ni con sustancias orgánicas.

#### 9).- Posición sistemática de las bacterias estudiadas:

Se aisló una cepa proveniente de agua. De acuerdo con la clasificación de las bacterias rojas en tres tipos morfológicos, hecha por Van Niel, estas bacterias podrían corresponder al tipo Pseudomonas, que comprende bastones pequeños, que no acumulan azufre en el interior. Según la clasificación de Molisch, estas bacterias perteneciendo al orden Rhodobacteria, no pueden ser incluidas en la familia Thiorhodaceae, porque no contienen gránulos de azufre en el interior de sus células. Dentro de la familia Athiorhodaceae, cuyos representantes no depositan azufre en sus células, la bacteria estudiada podría pertenecer al género Rhodobacillus, por tratarse de un bastón móvil. La diagnosis de este género es la que sigue:

#### Género Rhodobacillus.

Género de bacterias designado por Molisch en 1907, para incluir bacterias que contienen bacteriopurpúrina y bacterioclorina, pero no gránulos de azufre. Los organismos son bastones cortos, redondeados en los extremos, generalmente solitarios y móviles. Se describe una especie: Rhodobacillus palustris Molisch.

Meyer en 1912, usa Rhodobacillus como designación para la segunda sección del género Bacillus. Buchanan en 1918, lo incluye como el quinto género de la tribu Rhodobacterioideae, como:

Células en forma de bastones, solitarias, generalmente móviles. La especie tipo es designada Rhodobacillus palustris Molisch Bergey y colaboradores siguen a Buchanan.

La forma considerada en el presente trabajo es capaz, sin embargo, de desarrollar en medios inorgánicos y depositar azufre en el exterior de las células, mientras que no hay constancia de que Rhodobacillus posea esta propiedad, aunque no exista ninguna indicación en contra.

En el caso de considerarse la forma estudiada dentro del género Rhodobacillus, como la única especie descrita en el mismo es Rhodobacillus palustris y el cultivo estudiado no coincide con dicha especie por ser aerobia, correspondería considerar la forma descrita como una nueva especie para la cual se propone la denominación de Rhodobacillus anaerobius.

---

Subgrupo II: El enriquecimiento se llevó a cabo por el método de Winogradsky y el aislamiento se obtuvo a partir de colonias que desarrollaron al intentar aislar bacterias verdes en medio de Van Niel con 0,1% de sulfuro de sodio y pH 7.

1).- Morfología: Se presentan generalmente como vibriones en forma de verdaderas comas; otras veces como bastoncitos encurvados, o bien rectos con los extremos ensanchados en forma de clava. Están dotados de un movimiento muy rápido. El tamaño oscila entre 1 - 2,8 x 0,3 - 0,6 " .

2).- Caracteres de cultivo: Esta bacteria produce abun-

dante desarrollo en uno de los medios utilizados por Molisch para el estudio de las bacterias purpúreas, que tiene la siguiente composición:

Peptona . . . . .	5,0	gr.
Glicerina . . . . .	5,0	gr.
Agar . . . . .	18,0	gr.
Agua de canilla . . . . .	1000	c.c.

No se obtuvo desarrollo en los medios de Van Niel con agar al 0,2% pero sí en el mismo medio agarizado al 2% con 0,1% de sulfuro de sodio y pH 7. En estas condiciones es capaz de formar azufre en el medio, que puede observarse formando gotas refringentes.

3).- Acción del sulfuro de sodio y del pH: La serie se hizo con medio Van Niel con agar al 2% y las siembras en punción; el mejor desarrollo se obtuvo con 0,1% de sulfuro de sodio y pH 7, también hubo desarrollo aunque menor, con sulfuro 0,03% y pH 6,5 - 7 - 7,5 y muy escaso desarrollo en los tubos sin sulfuro y pH 7 y 7,5.

4).- Acción de las sustancias orgánicas: En general el desarrollo es mejor sin sulfuro de sodio. Con sustancias orgánicas y con sulfuro de sodio se obtienen los siguientes resultados: el mejor desarrollo con lactato de sodio desde 0,03 a 0,3%; desarrollo menor con extracto de levadura 0,03 a 0,3% y peptona 0,3% y escaso con extracto de carne 0,03 a 0,3% y Peptona 0,03 y 0,1%; con citrato de sodio no se produce desarrollo.

Con sustancias orgánicas sin sulfuro de sodio, se obtiene buen desarrollo con: extracto de carne 0,1 a 0,3%, extracto de levadura 0,3%, peptona y lactato de sodio 0,03 - 0,3%; el desarrollo es menor con extracto de levadura 0,03 y 0,1%. El mejor desarrollo se obtiene con peptona 0,3%.

En la oscuridad no se produce desarrollo, con sulfuro de

sodio ni con sustancias orgánicas.

5).- Posición sistemática de las bacterias estudiadas.

Se aisló una cepa proveniente de agua. Estas bacterias podrían corresponder al tipo morfológico Pseudomonas, citado por Van Niel. Si se intentara clasificarlas siguiendo la sistemática de Molisch, pertenecerían al género Rhodovibrio Molisch, que comprende vibriones caracterizados por la siguiente diagnosis:

Género Rhodovibrio.

Nombre genérico usado por Molisch en 1907, para incluir las bacterias que contienen bacteriopurpurina, sin gránulos de azufre, con células cortas, en forma de coma, activamente móviles por medio de un único flagelo terminal. Es descripta una especie Rhodovibrio parvus Molisch.

Buchanan en 1907, lo incluye como el sexto género de la subfamilia Rhodobacterioideae, con la descripción:

Células cortas, en forma de coma, activamente móviles por medio de un único flagelo terminal. La especie tipo es Rhodovibrio parvus Molisch.

Bergey y colaboradores siguen a Buchanan.

En cuanto a la especie, la bacteria estudiada podría considerarse comprendida en la única descripta: Rh. Parvus Molisch, cuya diagnosis es la que sigue:

Rhodovibrio parvus Molisch, (Molisch, Die Purpurbakterien, 1907, 21.)

Bastones débilmente curvados,  $0,9 \times 1,6$  a  $2,1 \mu$ . Móviles con un largo flagelo polar. Las masas de células muestran color rojo. Microaerófilos.

Habitat: Agua.

Debido a que en el cultivo estudiada también se obtiene



Fig.19.- Rhodobacillus anaerobius. (x2500)

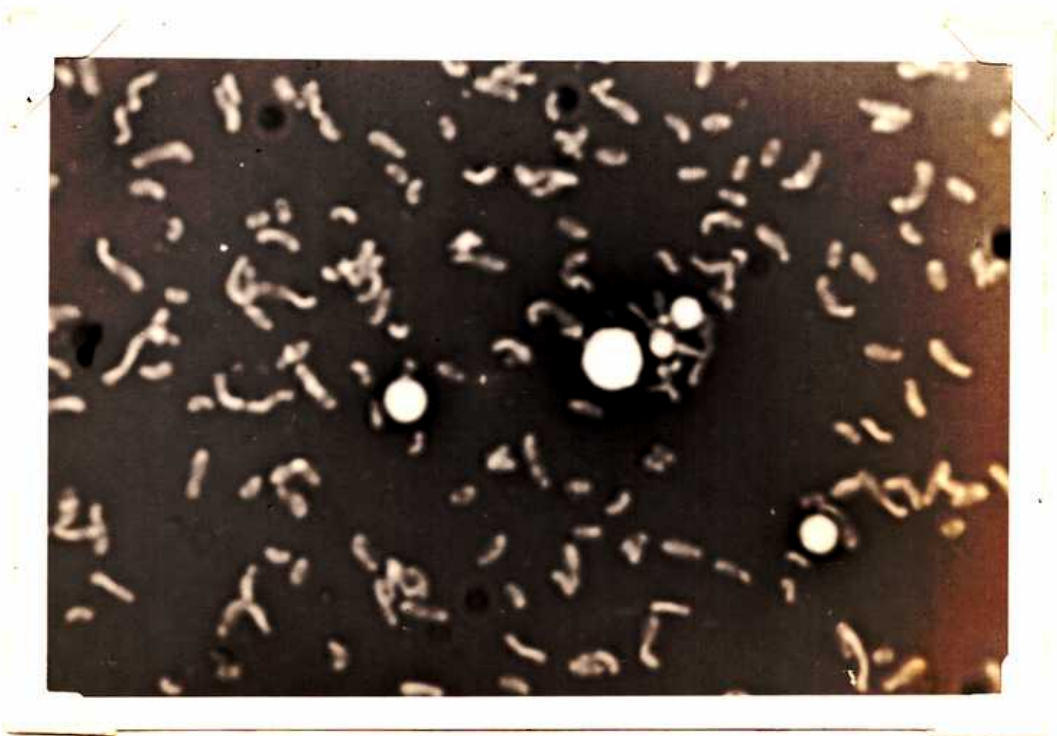


Fig.20.- Rhodovibrio parvus. (x2500)



deposición de azufre en el exterior de las células, son válidas aquí las mismas consideraciones hechas en este sentido con respecto al género Rhodobacillus.

---

Subgrupo III: El enriquecimiento se realizó en medio con heno, de Winogradsky, y el aislamiento en medio de Van Niel, con 0,1% de sulfuro de sodio y pH 6,5 a 7.

1).- Morfología: Algunas células tienen forma de media luna; la mayoría se presenta con dos curvaturas que le dan aspecto de S, con los extremos apuntados; también algunas bacterias son espirilos de diferentes longitudes, existiendo algunos larguísimos, con numerosas espiras. El tamaño medio de estos organismos es el siguiente:  $4,6 - 9 \times 1 - 1,4 \mu$ .

2).- Caracteres de cultivo: Es difícil obtener cultivos abundantes de estos espirilos; no se han logrado conocer las condiciones más favorables para el desarrollo óptimo. En un mismo medio, hubo o no desarrollo en diferentes oportunidades. Desarrollan en medio de Molisch; en el medio de Van Niel, con agar 2%, sembrado en punción se obtuvo buen desarrollo, con formación de gránulos de azufre en el exterior de las células; en algunos gérmenes, generalmente de tamaño mayor que el normal, puede observarse, aunque muy raramente, azufre en el interior de las células, en forma de gotas oscuras, adaptándose al contorno del organismo.

3).- Acción del sulfuro de sodio y del pH: El mejor desarrollo se obtiene con sulfuro de sodio 0,1% y pH 6,5; desarrolla también con sulfuro 0,03% y pH 7 y menos con pH 6 y 6,5; también desarrolla poco con 0,1% de sulfuro y pH 7 y 7,5. En general el desarrollo no es muy abundante en ninguno de los tubos.

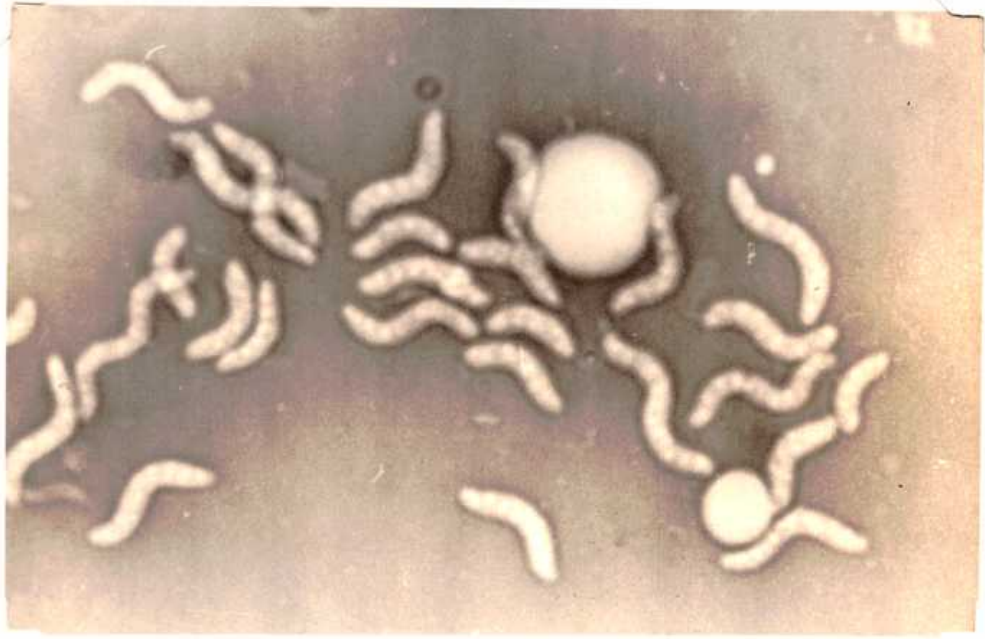


Fig.21.-Rhodospirillum photometricum.(x2500)

No se obtuvo desarrollo en ningún medio en la oscuridad. En los otros ensayos que se efectuaron con este organismo, no se llegó a obtener resultados debido a las dificultades inherentes al desarrollo.

4).- Posición sistemática de las bacterias estudiadas:

Se aisló una cepa proveniente de agua. Se trata de un espirilo provisto de pigmento fotosintético, que desarrolla en medios con sustancias orgánicas, pero también puede utilizar sulfuro de sodio y formar azufre, que generalmente se deposita en el exterior de las células aunque ocasionalmente se han observado en el interior de las mismas algunos gránulos semejantes a los de dicho elemento.

Siguiendo idéntico razonamiento al expresado a este respecto en los géneros Rhodobacillus y Rhodovibrio, se ha considerado conveniente, hasta no haber aclarado la cuestión anteriormente citada, incluir la forma estudiada aquí, en el género Rhodospirillum Molisch, cuya diagnosis sigue:

Género Rhodospirillum.

Nombre genérico usado por Molisch, en 1907, para incluir bacterias que contienen bacteriopurpurina, sin gránulos de azufre, con células libres, curvadas en una espiral, activamente móviles por medio de un flagelo polar o un penacho de flagelos. Se describen dos especies nuevas Rhodospirillum giganteum Molisch, y Rhodospirillum photometricum Molisch y la especie de Esmarch, Spirillum rubrum es incluida como Rh. rubrum (Esmarch) Molisch.

El nombre está también usado por Crisa-Jensen, en 1909, para reemplazar el antiguo de Thiospirillum como el 12º género de su familia Rhodobacteriaceae.

Meyer en 1912, denomina Rhodospirillum, a la segunda sec-

ción del género Spirillum.

Buchanan incluye el género como el séptimo de la subfamilia Rhodobacterioideae, con la descripción:

Células espirales, activamente móviles por medio de flagelos polares. La especie tipo es designada Rhodospirillum rubrum (Esmarch) Molisch.

Bergey y colaboradores, siguen a Buchanan.

Con respecto a la especie, teniendo especialmente en cuenta las dimensiones de la cepa estudiada, esta puede ser incluida en la especie Rhodospirillum photometricum Molisch, que presenta las características siguientes:

Rhodospirillum photometricum Molisch. (Die Purpurbakterien, Jena, 1907, 24.)

Formas espirales, 1,4 5 - 8 , generalmente en forma de S, con un flagelo en cada extremo. Activamente móviles. Las células contienen bacteriopurpurina y bacterioclorina. Microaerófilos.

Habitat: Agua de río (Moldau).

---

## B).- Bacterias con pigmento verde.

Estos organismos están caracterizados por poseer un pigmento que da a los cultivos un color verde claro análogo al proporcionado por la clorófila a los vegetales superiores. Debido a esta propiedad estas bacterias fueron consideradas algas por ciertos autores. A ese pigmento se lo llamó bacterioviridina y su estudio reveló que era diferente a la clorófila. En los cultivos viejos se ha observado que el color se hace amarillento y luego castaño.

El enriquecimiento se obtuvo mediante el método de Wingrafsky. Una vez obtenido desarrollo de bacterias verdes, se hicieron pasajes al medio de Van Niel, con diferentes concentraciones de sulfuro de sodio, bicarbonato de sodio y a diferente pH, determinándose como óptimo para el aislamiento, un medio con 0,2% de bicarbonato de sodio, 0,1% de sulfuro de sodio y pH 7. El desarrollo es también bueno en V!N.III.

1).- Morfología: Presentan grandes variaciones en lo que se refiere a la forma y tamaño, de acuerdo con las condiciones del medio. La forma que se observa más comunmente, es la de bastones, que pueden ser curtos y aislados o formar filamentos. En medios con pH bajo 6 - 6,5 y bajas concentraciones de sulfuro de sodio, pueden verse cocos pequeños y organismos de forma elipsóidea cuyas dimensiones son  $1 \times 0,8 \mu$ . Con 0,3% de sulfuro y pH 7 se han observado formas enroscadas en tirabuzón, aunque muy escasas. Los bastones pueden ser ensanchados en sus extremos y presentan diferentes longitudes, llegando a tener  $8 \mu$  de largo; el ancho es de  $1 \mu$ . Pueden formar filamentos larguísimo, de 35 y más micrones de lar-

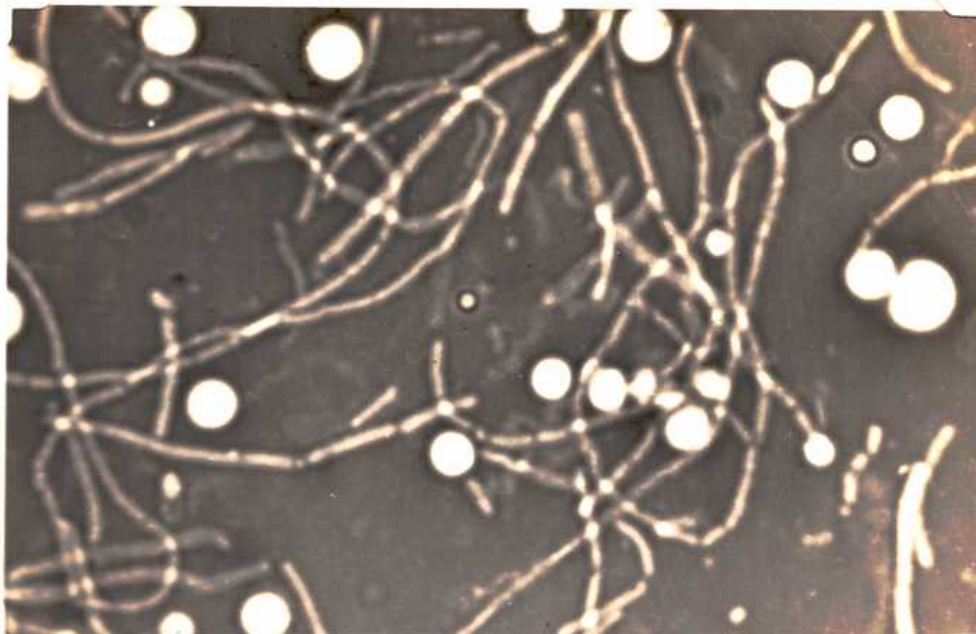


Fig.22.- Chlorobium limicola. (x2500)

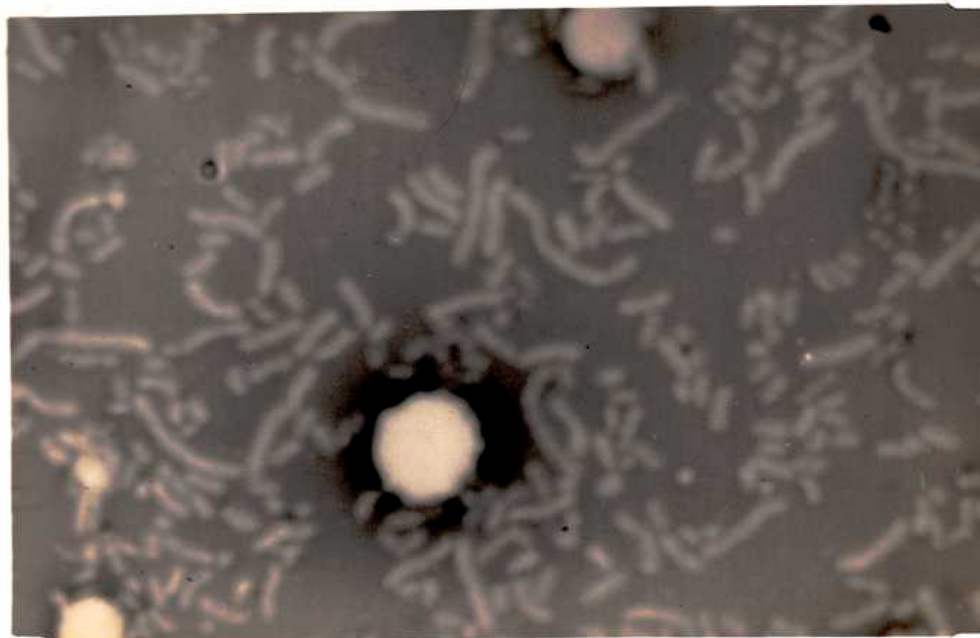


Fig.23.- Chlorobium limicola. (x2500)

go, en los cuales es difícil notar los tabiques.

Estas bacterias son siempre inmóviles; parecen estar rodeadas de una sustancia gelatinosa: algunos bastones parecen provistos de vaina. El azufre se deposita en el medio, aunque en algunos casos se ha observado en el interior de los bastones que presentaban entonces un ancho mayor que el normal, con aspecto de gotas refringentes, de borde negro, alargadas, adaptándose al contorno de las células.

2).- Caracteres de cultivo: Desarrollan bien en medio líquido de Var Niel, en tubos con tapón de vaselina-parafina, pero se obtienen mejores resultados usando el mismo medio agarizado al 0,2%. En medio líquido forman conglomerados o copos de color verde en el fondo y las paredes del tubo; observadas al microscopio, también las células aisladas presentan color verde.

3).- Acción del sulfuro de sodio y del pH: Con 0,03% de sulfuro hay poco desarrollo a pH 6,5 - 7 - 7,5; el mejor con pH 7; con 0,1% de sulfuro, buen desarrollo a pH 7 - 7,5; menor a pH 8. Con 0,3% de sulfuro, el desarrollo es más lento pero muy bueno a pH 7,5. En general con menor concentración de sulfuro de sodio desarrollan a pH menor.

4).- Acción del bicarbonato de sodio: Hay buen desarrollo con 0,1 - 0,2 - 0,5%, pero el óptimo es 0,2%.

5).- Acción del cloruro de sodio: El agregado de esta sal no favorece el desarrollo.

6).- Fuente de azufre: No son capaces de utilizar tiosulfato de sodio.

7).- Fuente de nitrógeno: El desarrollo es muy bueno con cloruro de amonio y sulfato de amonio al 0,03 y 0,1%; menor con sulfato de amonio al 0,3%; en escaso con nitrato de sodio 0,03 y 0,1%.

8).- Acción de las sustancias orgánicas: Con sustancias orgánicas y sulfuro de sodio hay desarrollo únicamente con extracto de carne 0,03%.

Con sustancias orgánicas, sin sulfuro de sodio, el mejor desarrollo se obtiene con peptona al 0,1%; el desarrollo es menor con extracto de carne, peptona al 0,3% y extracto de levadura al 0,03 y 0,1%; el desarrollo es escaso con peptona 0,03% y lactato de sodio al 0,03%.

En la oscuridad no se obtiene desarrollo en medio con sulfuro de sodio ni en medios con sustancias orgánicas.

9).- Posición sistemática de las bacterias estudiadas: Se aislaron tres cepas provenientes de aguas. Estas bacterias podrían ser consideradas adoptando el punto de vista de Van Niel, como pertenecientes al género Chlorobium, único representante de las bacterias verdes descrito en la literatura. Este género no fue citado explícitamente por Nadson como perteneciente a las bacterias y no ha sido aún incorporado en la última edición de la clave de Lerner; si se acepta el punto de vista anteriormente citado, el mismo debería figurar entre las bacterias del azufre poseedoras de pigmento capaces de efectuar fotosíntesis. La diagnosis dada por Buchanan es la siguiente:

Género Chlorobium.

Nombre genérico propuesto por Nadson en 1906, de acuerdo con Uhlenz para;

Organismo que contiene clorófila verde, que el autor considera como perteneciente a las bacterias aunque lo relaciona con Stichococcus bacillaris.

Nadson no menciona que se trata de una bacteria del azufre. Se describe como un microorganismo verde con clorófila inactiva.



que está relacionado con pequeñas cianofíceas unicelulares. Dice que las bacterias verdes citadas por Winogradsky son generalmente Chlorobium limicola.

Respecto a la especie se ha considerado conveniente incluir la forma representada por las tres cepas que se han estudiado en este trabajo, en la única descrita hasta ahora Chlorobium limicola Nadson, aunque las mismas presentan algunas diferencias con la descripción original que es la que sigue:

Chlorobium limicola Nadson: Cocos de 0,4 - 0,5  $\mu$  de diámetro, circulares o elípticos o bastones cortos. No móviles. Multiplicación por división transversal. Cadenas comunes en ambas formas; las esféricas y las de bastones. Se presentan formas de involución y apocloróticas.

---

## Capítulo V.

### Consideraciones generales.

Las cuestiones más importantes que deben ser consideradas con respecto a las bacterias del azufre, se refieren a dos puntos principales:

1).- Importancia del azufre o sus compuestos en el metabolismo de estas bacterias.

2).- Clasificación sistemática de las mismas.

La segunda cuestión podría ser resuelta si se lograra estudiar perfectamente el metabolismo de estos microorganismos y siempre que se llegara a adoptar un determinado criterio, ya sea morfológico o fisiológico para la clasificación de todas las bacterias en general.

El problema consiste en realidad en determinar si se justifica la existencia de un orden con la denominación Thiobacteriales, la que indicaría que el azufre tiene a su cargo un papel importante en relación con los organismos que constituyen dicho orden.

En el presente trabajo se han estudiado diferentes bacterias del azufre que pueden separarse, teniendo en cuenta su metabolismo, como sigue:

1).- Bacterias incoloras, autótrofas absolutas, que llevan a cabo quimiosíntesis, incapaces de desarrollar con sustancia orgánica como fuente de carbono y que necesitan utilizar azufre o alguno de sus compuestos para su metabolismo. Son las que se han identificado como Thiobacillus thioparus y Thiobacillus thiooxidans

2).- Bacterias incoloras, capaces de efectuar quimio-síntesis utilizando ácido sulfúrico y formando azufre, elemento que depositan en sus células, pero también capaces de desarrollar con sustancias orgánicas, es decir, autótrofas facultativas. Corresponden a la cepa que se ha identificado como Beggiatoa. En lo que se refiere a Thiothrix, no puede ser considerado aquí, por no haberse conseguido cultivos puros.

3).- Bacterias poseedoras de pigmento, que efectúan fotosíntesis y que no pueden desarrollar en ausencia de la luz. Estas pueden a su vez, utilizar sulfuros y formar azufre y también desarrollar con sustancias orgánicas, existiendo algunas que prefieren medios inorgánicos y otras cuyo desarrollo es más abundante en medios orgánicos.

En lo referente a la deposición de gránulos de azufre, se presentaron los siguientes casos:

1).- Bacterias incoloras, que depositan azufre en el exterior.

2).- Bacterias incoloras, que depositan azufre en el interior.

3).- Bacterias con pigmento rojo, que depositan azufre en el interior.

4).- Bacterias con pigmento rojo o verde; que depositan azufre en el exterior.

Y en cuanto a la forma de las bacterias estudiadas, se presentaron los tipos siguientes: 1)filamentosas móviles, 2)filamentosas fijas, 3)bastoncitos móviles, 4)bacterias de forma elíptica o cilíndrica, móviles, 5)bacterias de forma esférica móviles, que pueden formar grandes agrupaciones no dotadas de movilidad, 6)vibriones, 7)espirilos.

Es evidente que se trata de un grupo de bacterias muy heterogéneo, considerado desde cualquier punto de vista.

Se podría intentar la separación de las bacterias del azufre, en base a su morfología; en tal caso no existiría un Orden especial que agrupara a dichos gérmenes: estos se hallarían ubicados en grandes grupos morfológicos de bacterias, según fueran bastoncitos, filamentos, vibriones, espirilos. Este es el fundamento de la clasificación de Kluyver y Van Niel, publicada en 1936. A su vez, dentro de los grandes grupos morfológicos, podría hacerse notar, en la denominación del género, si el azufre o los pigmentos tienen un papel importante.

Pero existen caracteres fisiológicos que son de importancia primaria para algunas bacterias, hecho que hacen resaltar Stanier y Van Niel en su reciente clasificación (1941). Así, el hecho de que los organismos provistos de pigmento posean la importante propiedad de ser fotosintéticos, justifica, para estos autores, la formación de un Orden con los mismos. Dado que estas bacterias no son capaces de desarrollarse en ausencia de la luz, es lógico que se eleven a la categoría de Orden, por presentar un carácter diferencial de tanta importancia.

En cambio, dentro del orden de las Thiobacteriales, considerado en las clasificaciones actuales, se han incluido bacterias, que no sólo son muy diferentes morfológicamente, sino también fisiológicamente: en la formación de este Orden no se ha seguido un criterio único; no hay un fundamento morfológico, puesto que en el mismo existen las formas más diversas de bacterias, ni fisiológico, puesto que agrupa tanto organismos autótrofos como heterótrofos, organismos quimiosintéticos y fotosintéticos. En cuanto a la designación de Thiobacteriales, tampoco se justifica, porque

el azufre, en algunos casos, no tiene ninguna relación con la morfología ni con la fisiología.

En las familias consideradas en el orden de las Thiobacteriales se hace a veces difícil la ubicación de algunos gérmenes, debido a la importancia que se asigna al hecho de que las células contengan o no azufre en el interior, diferencia en la cual se funda la formación de las subfamilias, dentro de la familia Rhodobacteriaceae. Existen bacterias rojas, que utilizando compuestos del azufre y formando gránulos de dicho elemento, no lo depositan en su interior; estas no pueden encontrar ubicación en las clasificaciones. Según Van Niel, el hecho de que el azufre se deposite dentro o fuera de las células no tendría gran importancia, pareciendo depender según este autor del tamaño de las bacterias. Por lo tanto, parecería más lógico hacer una separación entre las bacterias poseedoras de pigmento, según que tuvieran o no la propiedad de utilizar compuestos del azufre, aunque pudieran también desarrollarse con sustancias orgánicas; todas las bacterias con pigmento, capaces de utilizar compuestos del azufre, formando azufre, que depositan ora en el interior, ora en el exterior de las mismas, deberían ser reunidas en un mismo grupo. Es decir que las bacterias descritas en el grupo b). en el presente trabajo aunque no depositen azufre en el interior de sus células, podrían pertenecer a la subfamilia Chromatioideae, siempre que en la misma no se especificara que el azufre esté contenido en las células, dejando la subfamilia Rhodobacterioideae para aquellos organismos con pigmento fotosintético, que no son capaces de utilizar compuestos del azufre y desarrollan solamente en medios orgánicos.

Finalmente, habría que mencionar, en la descripción del Orden, las formas con pigmento verde además de las de pigmento

rojo.

En lo que se refiere a las demás bacterias del azufre, Stanier y Van Niel adoptan un criterio morfológico. Parece también acertada la opinión de estos autores, en el sentido de agrupar a las bacterias filamentosas juntamente con las Cianofíceas. Por lo que se ha visto en el presente trabajo, al tratar de la única cepa identificada como Beggiatoa, su semejanza con las cianofíceas es tan estrecha que permite abrigar dudas sobre la exactitud de la identificación, pudiendo suponerse que se trate de una cianofícea decolorada.

---

## Capítulo VI.

### Conclusiones.

De las experiencias realizadas en la presente investigación pueden deducirse las siguientes conclusiones:

1).- Para la obtención de cultivos de enriquecimiento de las bacterias del azufre, dio buen resultado el método de Wincogradsky, ya sea en aerobiosis para las formas incoloras, o en anaerobiosis para las formas pigmentadas.

2).- Se consiguieron cultivos puros de Beggiatoa, utilizando el método sencillo e ingenioso ideado por Cataldi. No pudieron obtenerse cultivos puros de Thiothrix.

3).- Con los métodos desarrollados en el trabajo no fue posible obtener el cultivo artificial de bacterias incoloras de la familia Achromatiaceae; sólo en pocas oportunidades se observaron algunas en número reducido en los materiales de origen o en los cultivos de enriquecimiento.

4).- Se obtuvieron cultivos puros de Thiobacillus thioparus y Thiobacillus thiooxidans, bacterias autótrofas absolutas, que necesitan utilizar azufre o alguno de sus compuestos como fuente de energía para la síntesis de la sustancia orgánica de su protoplasma a partir del anhídrido carbónico.

5).- Los métodos utilizados por Van Niel en su estudio sobre las bacterias rojas y verdes, fueron empleados en el presente trabajo con muy buen resultado, habiéndose obtenido en esa forma cultivos puros de dichos organismos.

6).- El estudio fisiológico de las cepas aisladas ha per-

mitido comprobar que, a excepción de las pertenecientes al género Thiobacillus, todas las demás son capaces de desarrollar, en mayor o menor grado, en medios en cuya composición intervienen sustancias orgánicas, entre las cuales resultó favorable, en general, el lactato de sodio; también se produjo desarrollo con sustancias orgánicas complejas, como ser: extracto de carne, extracto de levadura y peptona.

7.- Las bacterias poseedoras de pigmento no fueron capaces de desarrollar, en ningún caso, en ausencia de la luz, ya sea utilizando medios de cultivo inorgánicos, con sulfuro de sodio, o medios con sustancias orgánicas. El proceso foto sintético parece tener mayor importancia que el quimio sintético en el metabolismo de las bacterias mencionadas.

8.- El estudio morfológico y fisiológico de las cepas aisladas ha permitido agruparlas en 8 géneros, en los cuales se han diferenciado en total, 9 especies.

9.- La posición sistemática de las bacterias rojas y verdes aisladas resultó difícil, por no existir buenas descripciones de los géneros en que podrían ser ubicadas, debido especialmente al hecho de no haberse referido en las mismas a cultivos puros.

10.- Algunas de las especies aisladas correspondientes a las bacterias rojas y verdes del azufre, no pudieron ser exactamente identificadas, ni siquiera con los géneros existentes en las clasificaciones, lo que señala la exactitud de las observaciones de Van Niel, en el sentido de la necesidad de realizar un estudio sistemático detallado de las mismas, con gran número de cepas, para poder intentar un nuevo sistema de clasificación.

---



## Capítulo VII.

### Resumen.

El presente trabajo tuvo como finalidad la de describir y, en lo posible, clasificar, las diferentes bacterias del azufre que se hallaran en muestras de aguas estancadas y tierras de jardín de los alrededores de Buenos Aires.

Las bacterias del azufre son organismos autótrofos, capaces de utilizar el anhídrido carbónico como fuente de carbono para elaborar la sustancia orgánica de su protoplasma. Entre ellas existen formas incoloras, las que, mediante la oxidación del azufre o sus compuestos obtienen la energía necesaria para llevar a cabo la síntesis de la sustancia orgánica: efectúan quimiosíntesis. Otras, poseedoras de pigmentos, son además fotosintéticas, es decir que la energía radiante es un factor esencial para su metabolismo.

Estos organismos despertaron siempre gran interés, existiendo a su respecto diversos trabajos, entre los cuales, los que aclaran mejor su comportamiento fisiológico son los de Winogradsky en lo que se refiere a las bacterias incoloras con azufre en su interior, los de Van Niel, sobre las bacterias rojas y verdes y los de Waksman y Starkey sobre las bacterias incoloras que oxidan azufre y tiosulfato depositando azufre en el exterior.

En este trabajo se aislaron, de aguas, 6 cepas de Th. thio-  
parus y 1 de Th. thiooxidans. Las bacterias de este grupo fueron enriquecidas en medios con tiosulfato o con azufre y aisladas en medios sólidos con tiosulfato.

Se obtuvieron buenos cultivos de enriquecimiento de las bacterias filamentosas Beggiatoa y Thiothrix, utilizando el método de Winogradsky, basado en el uso de heno y sulfato de calcio.

Se aisló una cepa de Beggiatoa alba, mediante el método de Cataldi, fundado en la propiedad característica de dicho germen de poseer un movimiento deslizando y en su capacidad de desarrollar en medios con sustancias orgánicas.

Se obtuvieron cultivos de enriquecimiento de Thiothrix, probablemente Thiothrix tenuis, pero no fue posible conseguir su aislamiento.

No fue tampoco posible enriquecer en forma apreciable las bacterias pertenecientes a la familia Achromatiaceae.

Mediante las excelentes directivas encontradas en el trabajo de Van Niel, fue posible realizar el estudio de algunos representantes de las bacterias rojas y verdes. Los cultivos de enriquecimiento de las mismas se obtuvieron con el método de Winogradsky, lográndose la anaerobiosis por el método de  Beijerinck. También se usaron para el enriquecimiento el medio de Van Niel y el de Lehner. El aislamiento se efectuó a partir de las colonias obtenidas en tubos de agar, en el medio de Van Niel.

La fisiología de estos gérmenes permitió comprobar que, además de desarrollar en medios inorgánicos con sulfuro de sodio, son capaces de utilizar compuestos orgánicos para su crecimiento. Pero si la quimiosíntesis parece no tener una gran importancia, la fotosíntesis tiene a su cargo el papel principal en el metabolismo de estas bacterias, puesto que ellas no han podido desarrollar en la oscuridad en ninguno de los medios utilizados.

Las tres cepas verdes se identificaron como Chlorobium limicola Nadson. En cuanto a la identificación de las cepas rojas,

resultó muy difícil, aunque las mismas pueden estar comprendidas en los tres tipos morfológicos de Van Niel: Chromatium, Thiocystis y Pseudomonas. Se aisló además una bacteria roja en forma de espirilo.

En cuanto a la clasificación de las formas con pigmento sintético no ha podido resolverse exactamente debido a que los sistemas existentes han sido hechos, en su casi totalidad, basados en observaciones efectuadas con cultivos impuros. En posesión ahora del método simple de Van Niel para los aislamientos y aumentando suficientemente el número de cepas en cultivo puro, podrá procederse a su ordenación de acuerdo con una nueva sistemática más racional.

---

Sammurius

Lidia Spauri

Frederick Hull

Abastellano

## Bibliografia.

- (1)- Bavendamm, W. 1924. "Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Süß und Salzwassers. Grundlinien zu einer Monographie. G.Fischer. Jena."
- (2)- Beggiato, F.S. 1838. Memoria delle terme Euganee. Padova.
- (3)-  Beijerinck, M.W. 1904. "Über die Bakterien welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können". Centralb. f. Bakt. II, 11: 593-599.
- (4)- Bergey, D. 1939. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. A Key for the identification of Organisms of the Class Schizomycetes". 5th. ed. Williams & Wilkins.
- (5)- Buchanan, R.E. 1925. General Systematic Bacteriology.
- (6)- Cataldi, M.S. 1940. "Aislamiento de Beggiatoa alba en cultivo puro." Rev. del Inst.Bact.del D.N.H. IX(4): 393-423.
- (7)- Cohn, F. 1875. "Untersuchungen über Bakterien." II. Beitr. Biol. Pflanz. 1:H.3: 141-207.
- (8)- Corsini, A. 1905. "Über die sogenannten Schwefelkörnchen die man bei der Familie der Beggiatoaceae antrifft." Centr.f. Bakt. II, 14: 272-289.
- (9)- Cramer, in Müller, Ch. 1870. "Chemisch-physikalische Beschreibung der Thermen von Baden in der Schweiz". Baden, 1870.
- (10)- Czurda, V. 1936. "Nachweis der Sauerstoff-Abscheidung in Assimilationsprozess der Thiorhodaceen". Arch. f. Mikrob. 7: 110-114.
- (11)- Engelmamm, Th.W. 1888. "Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht." Bot. Zeit., 46 (42-45): 66 ~~usw~~, m.3 Abb. i.T.
- (12)- Etard y Olivier, L. 1882. "De la reduction des sulfates par les etres vivants". Compt. Rend. d. Acad. d. Sc., 95: 846-49.
- (13)- Foster, J. 1940. The role of organic substrates in photosynthesis of purple bacteria. J. Gen. Physiol., 24 (2): 123-34.
- (14)- Gaffron, H. 1933. "Über den Stoffwechsel der schwefelfreien Purpurbakterien". Bioch. Zeit., 260: 1-17.
- (15)- ----- 1934. "Über die Kohlensäure-Assimilation der roten Schwefelbakterien". I. Ibid., 269: 447.
- (16)- ----- 1935. "Über den Stoffwechseln der Purpurbakterien". II. Ibid., 275: 301.
- (17)- ----- 1935. "The carbon dioxide assimilation of the red sulphur bacteria. Ibid., 279: 1.
- (18)- Jacobsen, H.C. 1912. "Die Oxydation von elementarem Schwefel durch Bakterien. Folia microbio., 1: 487-496.
- (19)- Keil, F. 1912. "Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien". Beitr. Biol. Pflanz., II: 335-372.
- (20)- Kluyver, A.J. and Van Niel, C.B. 1936. "Prospects for a natural system of classification of bacteria". Centr.f. Bakt. II Abt. Bd. 94: 369-403.
- (21)- Lehner, A. 1937. "Zur Physiologie der Purpurbakterien". Centr.f. Bakt. II. 97: 66-90.
- (22)- Lipman, J.C., Waksman, S.A. and Joffe, J.S. 1921. "The oxidation of sulfur by soil microorganisms". Soil Sc., 12: 475-489.
- (23)- Meyer, Lothar. 1864. "Chemische Untersuchungen der Thermen zu Landeck in der Grafschaft Glatz. J.f. prakt. Chemie, Bd. 91, Heft 1: 1-15.
- (24)- Molisch, H. 1907. "Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen". G.Fischer. Jena.
- (25)- Müller, F. 1933. "On the metabolism of the purple sulphur bacteria in organic media". Arch. f. Mikrob., 4: 131-166.

- (26)- Nadson, G.A. 1912. "Mikrobiologische Studien. I. Chlorobium limicola Nads. Ein grüner Mikroorganismus mit inaktivem Chlorophyll. II. Über die Farbe und die Farbstoffe der Purpurbakterien". Bull. d. Jard. Imp. Bot. d. S. Petersbourg, 12 (2/3): 55-89. Ref.: Bot. Centralbl., 1913, 122: 65-66.
- (27)- Nathanson, A. 1902. "Über eine neue Gruppe von farblosen Schwefelbakterien und ihren Stoffwechseln". Mitt. Zool. Station, Neapel, 15(4): 655-680.
- (28)- Soriano, S. 1935. "Dispositivo sencillo para micromanipulaciones". Folia Biológica. 46-47-48: 205-210.
- (29)- Stanier, R.J. and Van Niel, C.B. 1941. The main outlines of bacterial classification. J. of Bact. 41: 437-466.
- (30)- Starkey, R.L. 1925. "Concerning the Physiology of Th. thiooxidans, an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions". Journ. Bact., 10: 135.
- (31)- ----- 1935. "Isolation of bacteria which oxidise thiosulfate". Soil Sci., 39: 197.
- (32)- ----- 1937. "Formation of sulfide by some sulfur bacteria". Journ. Bact., 35(5).
- (33)- Van Niel, C.B. 1931. "On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria". Arch. f. Mikrob., 3 (1): 1-112.
- (34)- Van Niel, C.B. and Smith, J. 1935. "Studies on the pigments of the purple bacteria. I. On spirilloxanthin a component of the pigment complex of Spirillum rubrum". Arch. f. Mikr. 6: 219-229.
- (35)- Van Niel, C.B. 1936. "On the metabolism of the Thiorhodaceae". Arch. f. Mikrob. 7: 323-358.
- (36)- Waksman, S.A. and Joffe, J.S. 1922. "Thiobacillus thiooxidans, a new sulfur oxidizing organism isolated from the soil". Journ. Bact., 7: 239-256.
- (37)- Waksman, S.A. 1922. "Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. IV. A solid medium for the isolation and cultivation of Thiobacillus thiooxidans". Journ. of Bact., 7: 605-608.
- (38)- Waksman, S.A. 1922. "Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. V. Bacteria oxidizing sulfur under acid and alkaline conditions". Journ. of Bact., 7: 609-616.
- (39)- ----- 1927. "Principles of soil microbiology. Autotrophic bacteria".: 78-91. Baltimore. The Williams and Wilkins Company.
- (40)- Winogradsky, S. 1883. "Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. I. Schwefelbakterien." Leipzig. Ann. Inst. Past., 3:
- (41)- Winogradsky, S. 1887. "Über Schwefelbakterien". Bot. Zeit. Jahrg. 45, (31-37): 489-507; 513-523; 529-539; 545-559; 569-576; 585-594; 606-610.
- (42)- Winogradsky, S. 1889. "Recherches physiologiques sur les sulfobactéries." Ann. de l'Inst. Past., 3: 49-69.
-