

Tesis de Posgrado

Estudio de las bacterias fermentadoras del género *Bacillus*, *Aerobacillus*

Giambiagi, Nélica

1950

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giambiagi, Nélica. (1950). Estudio de las bacterias fermentadoras del género *Bacillus*, *Aerobacillus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0639_Giambiagi.pdf

Cita tipo Chicago:

Giambiagi, Nélica. "Estudio de las bacterias fermentadoras del género *Bacillus*, *Aerobacillus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1950. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0639_Giambiagi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

T.

MINISTERIO DE EDUCACION
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

Estudio de las bacterias fermentadoras
del género Bacillus (Aerobacillus?)

Tesis para optar al título de "Doctor en Ciencias
Naturales" presentada por

NELIDA GIAMBIAGI

680

1950-AÑO DEL LIBERTADOR GENERAL SAN MARTIN - 1950



Agradezco al Doctor Alfredo Sordeili su constante asesoramiento y ayuda. Ellos han hecho posible la realización de este trabajo.

S U M A R I O

Capítulo I. Introducción	Pag. 3
" II Estudio de la literatura	" 4
" III Parte Experimental	" 11
1) Aplicación de los métodos corrientes para el aislamiento de <u>B. polymyxa</u> y <u>B. macerans</u> de materiales de la naturaleza. Sus resultados.	
2) Estudio de métodos apropiados para reconocer la presencia y asegurar el aislamiento de <u>B. polymyxa</u> . Sus resultados	
3) Estudio de métodos apropiados para reconocer la presencia y asegurar el aislamiento del <u>B. macerans</u>	
a) Fracaso de gran números de ensayos. Su descripción.	
b) Aplicación de una propiedad característica del <u>B. macerans</u> (producción enzimática de dextrinas cristalinas) para reconocer su presencia en la naturaleza y para su aislamiento.	
c) Método de aislamiento del <u>B. macerans</u> .	
Capítulo IV: Discusión de resultados.	Pag. 44
Capítulo V: Resumen-Conclusiones-Materiales y Métodos.	47
Bibliografía	Pag. 51

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

En el curso de una investigación preliminar acerca de la dispersión de bacterias esporuladas anaerobias fermentadoras de hidratos de carbono, encontramos una especie aerobia facultativa, gran productora de gas, cuya identificación fué relativamente fácil. En un principio proyectamos realizar un trabajo de tesis estudiando la variación de las propiedades biológicas de dichas bacterias fermentadoras aerobias provenientes de distintos "habitats" en la naturaleza, por entender que debía ser muy sencillo su aislamiento, tan distinta fué la realidad que decidimos llevar a cabo en ese trabajo, un estudio de la dispersión de dichas bacterias, lo que importó, previamente, el estudio de los métodos de aislamiento

- (1) En el presente trabajo se utiliza el término "fermentación" para indicar la formación de ácido y gas a partir de hidratos de carbono.

C A P I T U L O I I

ESTUDIO DE LA LITERATURA

La literatura sobre las especies del género Bacillus fermentadoras de hidratos de carbono no es muy abundante ni muy clara.

Distintas especies han sido descritas o incluidas en este grupo. Son ellas:

Clostridium polymyxa Frazmowski 1880.

Bacillus thalassophilus Russell 1892 (considerado sinónimo de B. polymyxa por Gottheil 1901)

Granulobacter polymyxa Beijerinck 1893

Bacillus subanaerobius Migula 1900 (considerado sinónimo de B. polymyxa por Gottheil 1901,

Bacillus polymyxa (Frazmowski) Migula 1900

Bacillus asterosporus Migula 1900 (Astasia asterospora Meyer 1892).

Granulobacter polymyxa var. mucosum y var tenax Beijerinck
Van Delden 1902

Bacillus violarius acetonicus Bréaudat 1906

Bacillus asterosporus alpha, Bacillus dilaboides y Bacillus clostridioides descritos por Hasselhoff y Bredemann en 1906 y considerados por Bredemann variantes del B. asterosporus en 1909.

Bacillus amaracrylus Voisenet 1911

Bacillus polymyxa Beijerinck y den Dooren de Yong 1923

Aerobacillus polymyxa (Frazmowski) Donker 1926

Aerobacillus violarius (Bréaudat) Donker 1926

Aerobacillus amaracrylus (Voisenet) Donker 1926

Bacillus aerosporus Greer 1928

Bacillus ovoaethylicus Pribram 1933 (Bacillus mycoides
var. ovoaethylicus Wagner 1916)

Bacillus pandora Corbet 1930

Bacillus macerans Schardinger 1904

Bacillus acetoethylicum Northrop, Asche y Senior 1919

Aerobacillus macerans Schardinger Donker 1926

Aerobacillus acetoethylicus (Northrop) Donker 1926

Bacillus thermoamylolyticus Coolhoas (1928) según Porter
muy similar al B. macerans pero más termófilo)

Zymobacillus macerans (Schardinger) Kluyver y Van Niel
1936

Bacillus schuykilliensis Eisenberg 1942

Donker (1926) incluyó a la mayoría de estas especies dentro de cinco solamente y dió la siguiente lista de sinónimos:

1- Aerobacillus polymyxa (Prazmowski) Donker

Sinónimos: Clostridium polymyxa Prazmowski

Granulobacter polymyxa Beijerinck

Bacillus polymyxa Beijerinck y den
Dooren de. Yong

Bacillus asterosporus (Meyer) Migula

2- Aerobacillus acetoethylicus (Northrop) Donker

Sinónimo: Bacillus acetoethylicus Northrop

3- Aerobacillus macerans (Schardinger) Donker

Sinónimo: Bacillus macerans Schardinger

4- Aerobacillus violarius (Bréardat) Donker

Sinónimo: Bacillus violarius acetonicus Bréardat.
dat.

5- Aerobacillus amaracrylus (Voisenet) Donker

Sinónimo: Bacillus amaracrylus (Voisenet)

Porter, Mc Cleskey y Levine (1937) incluyen a todas las especies en dos grupos: uno del B. polymyxa y otro del B. macerans que diferencian en base a tests" fisiológicos. Los sinónimos y las características de diferencia-

ción que establecieron son las siguientes:

1 Aerobacillus polymyxa (Prazmowski) Donker 1926

Sinónimos: Clostridium polymyxa Prazmowski 1880

Granulobacter polymyxa Beijerinck 1893

Bacillus polymyxa Beijerinck y den Dooren de Yong 1923

Bacillus asterosporus (Meyer) Migula (1900) especie tipo

Bacillus mycoides var ovoacetyllicus Wagner 1916

Bacillus aerosporus Greer 1928

Características fisiológicas: Voges Proskauer positivo

Ramposa y Sorbitol: ni ácido ni gas.

No crece a 45 ° sino a 20°

2 Aerobacillus macerans (Schardinger) Donker

Sinónimos: Bacillus macerans Schardinger 1905

especie tipo

Bacillus acetoethyllicus Northrop 1919

Aerobacillus acetoethyllicus (Northrop)

Donker 1926

Características fisiológicas: Voges Proskauer negativo.

Ramposa y Sorbitol ácido y gas.

Buen crecimiento a 45° y no a 20°.

Estos investigadores no pudieron trabajar con B. violarius acetonicus ni con B. amaracrylus pues las cepas originales parecen haberse perdido.

El trabajo de Porter, McClekey y Levine es el más completo de los que tratan de bacterias esporuladas fermentadoras y es el que ha servido de base a estudios posteriores.

El Bergey's Manual (1939) considera, sin embargo, al B. pandoro como otra especie distinta del B. polymyxa y del B. macerans. También considera al B. violarius acetonicus, B. amaracrylus, B. Ovoa ethylicus y B. aerosporus variantes del B. polymyxa y al B. Acetoethyllicus variante del B. macerans.

En su edición de 1948 el Bergey's manual supone al B. pandora una probable variante de B. polymyxa y al B. violarius acetonicus y B. amaracrylus probables sinónimos del mismo bacilo. También supone al B. schuykilliensis, descrita como especie en 1942 (posterior al trabajo de Porter) una probable variante de B. macerans

En lo que respecta a diferenciación fisiológica, Smith, Gordon y Clark no pudieron comprobar totalmente las diferencias establecidas por Porter para los dos grupos, pues trabajaron con cepas de B. polymyxa que fermentaban sorbitol y ramosa con producción de ácido y gas. También Ledingham, Adams y Stanier (1945) trabajaron con cepas de dicho bacilo que fermentaban ramosa con producción de ácido y gas.-

Tilden y Hudson (1942) demostraron que las dos especies (B. polymyxa y B. macerans) pueden ser separadas de acuerdo a la naturaleza de sus amilasas.

Katznelson (1944) estableció que estas dos especies pueden ser diferenciadas en base a sus requerimientos vitamínicos pues en medios sintéticos, el B. polymyxa requiere solamente biotina, mientras que el B. macerans tiene necesidad de biotina más tiamina para desarrollarse.

En cuanto a la ubicación de estas especies dentro de la clasificación general de bacterias: Donker propuso (1926) que un nuevo género se creara para incluir las bacterias esporuladas, facultativas, móviles por medio de flagelos peritricos, con esporangio en forma de clostridio, que producen catalasa y fermentan hidratos de carbono. Él sugirió el nombre genérico de Aerobacillus Pribram (1929 y 1933) utilizó el mismo nombre genérico de Aerobacillus para incluir en él especies que no concuerdan con la caracterización dada por Donker a dicho género.

También Janke (1930) hizo una descripción de Aerobacillus que no responde a la original. Es sin embargo, a Donker, a quien corresponde prioridad en el nombre.

Kluyver y Van Niel (1936) incluyen al género Aerobacillus en la tribu Bacilleae y colocan al B. macerans en un género aparte dentro de la misma tribu

XI Tribu : Bacillae

1- Bacillus Cohnn 1872

Bacterias en forma de bacilo, ya inmóviles, ya móviles por medio de flagelos peritricos. Forman endosporas. Quimioheterótrofas oxidan varios compuestos orgánicos y son capaces de fermentar hidratos de carbono siendo el 2, 3 butelene glicol y el alcohol etílico, sus principales productos. Son gram positivos. Especie tipo: Aerobacillus polymyxa

3- Zynobacillus nov. gen.

Bacilos móviles o inmóviles, en el primer caso flagelos peritricos. Forman endosporas. Quimioheterótrofos oxidan varios compuestos orgánicos y son capaces de fermentar hidratos de carbono siendo los principales productos obtenidos alcohol etílico y ácido acético. Gram positivo. Especie tipo Zynobacillus macerans (Schardinger).

El Bergey's Manual (1939) coloca dentro del género Bacillus al " Group Aerobacillus" y en él reúne las especies que tienen la característica de fermentar hidratos de carbono con producción de ácido y gas. En este grupo están incluidas tres especies y establece la siguiente clasificación dentro del género:

VI . Aerobacillus Donker Group

A. Subgénero Aerobacillus (Van Niel)

89. B. polymyxa

B. Subgénero: Zynobacillus (Van Niel)

90. B. pandora

91. B. macerans

El mismo Bergey's Manual en su edición de 1948 considera, como ya hemos dicho al B. pandora una probable variante del B. polymyxa y hace del B. polymyxa y del B. macerans dos especies más en la larga serie de especies del género

Bacillus, sin tomar en cuenta la propiedad distintiva de fermentar hidratos de carbono que es común a ambas.

El B. polymyxa ha sido muy estudiado en estos últimos años porque produce, a partir de hidratos de carbono 2,3 butilene-glicol y etanol.

El 2,3 butilene-glicol tiene amplia aplicación industrial porque puede ser convertido en butadieno, precursor esencial del caucho sintético y también por su propiedad de no congelar(usada en anticongelantes).

El butadieno que se obtiene mediante esta fermentación tiene la particularidad de ser un isómero puro, levorotatorio, con $(\alpha)_D^{26} = -13,34$ (Neish, 1945).

En Canadá especialmente, durante la última guerra, fueron estudiadas las condiciones de mejor rendimiento industrial de la fermentación por B. polymyxa.

También se cita en la bibliografía al B. polymyxa como productor de la polymyxina, un antibiótico activo sobre bacterias Gram negativas.

El B. macerans tiene la propiedad característica y muy importante de dar dextrinas cristalinas no reductoras como producto de degradación del almidón. Es la única enzima conocida en la naturaleza capaz de darlas. Schardinger (1908) fué el primero que estudió y obtuvo dichas dextrinas. También Eilden y Hudson(1939, 1942) y Kerr (1943) trabajan con dicha enzima. Tratan de establecer si las dextrinas obtenidas por su intermedio (α y β) son verdaderos componentes de la molécula de almidón.

Con este bacilo se obtienen ,como productos finales de la fermentación de azúcares, acetona y etanol, por lo que tiene importancia industrial.

También se conoce al B. macerans por tener propiedades enriadoras.

Del B. pandora, que según Corbet, es el bacilo responsable del importante cambio que ocurre durante la coagula-

ción natural del Hevea latex, no hemos encontrado posteriores trabajos

Tal es el estado actual de la literatura de las bacterias estudiadas. El hecho de que su posición sistemática no haya sido aún definitivamente establecida y el de ser las únicas bacterias esporuladas aerobias que fermentan hidratos de carbono con producción de ácido y gas, mientras las anaerobias del mismo género presentan este hecho casi general, son entre otros motivos por los que el tema cuyo estudio iniciamos, no está desprovisto de interés.

HEVEA LATEX

C A P I T U L O I I I

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio experimental fué realizado para conseguir los objetivos expuestos en el plan. El encabezamiento y sucesión de los distintos problemas planteados determinó, como es natural, la realización de ciertos experimentos que se exponen a continuación.

1) Aplicación de los métodos corrientes para el aislamiento de B. polynyxa y B. macerans de materiales de la naturaleza . . . Sus resultados.

Los métodos generalmente usados para el aislamiento de bacterias esporuladas aerobias tienen aplicación directa en B. polynyxa y B. macerans.

Los principios en que estos métodos se basan son los que fluyen naturalmente de las propiedades de las bacterias esporuladas en su forma de esporas. Consisten:

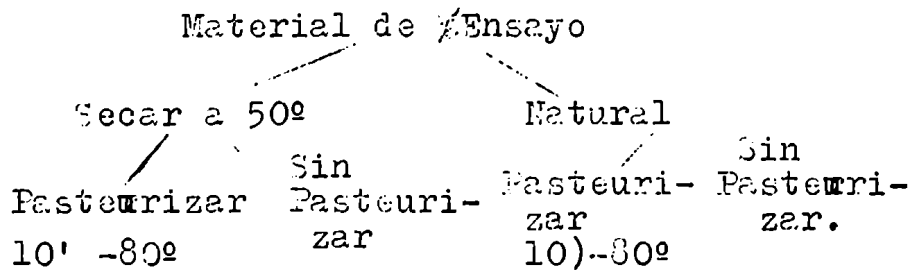
- 1) En producir la esporulación de las bacterias
- 2) En destruir las formas vegetativas a una temperatura inferior a la de la muerte de las esporas.
- 3) Siembra para el aislamiento

En cualquiera de los tiempos, antes o después del primero, o antes o después del tercero, se pueden utilizar métodos de desarrollo diferencial que son conocidos como métodos de enriquecimiento.

La aplicación de los métodos, expuesta en forma general se hizo de la siguiente manera:

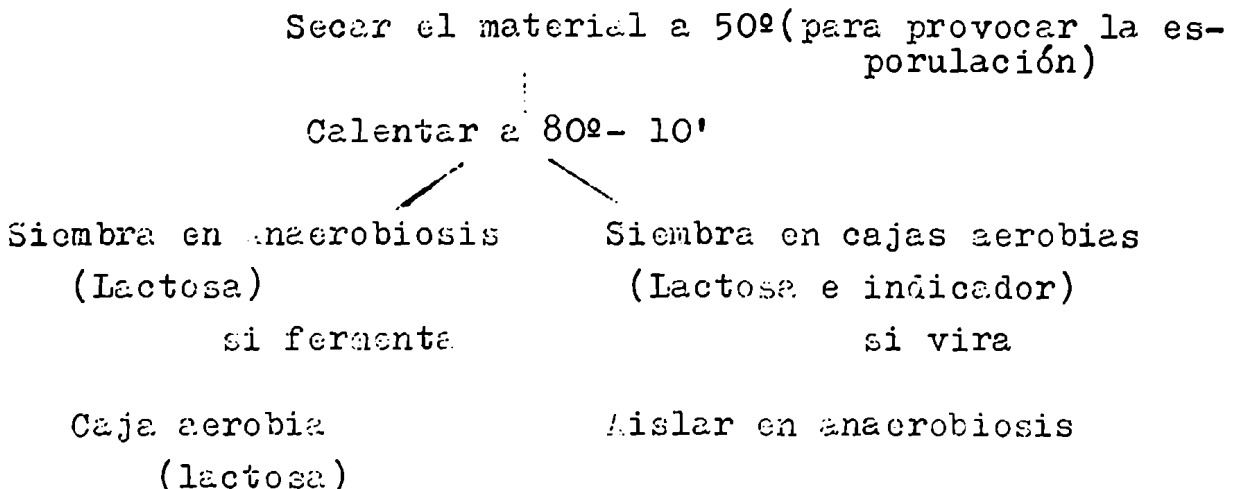
1º) El primer experimento consistió en poner parte del material de ensayo a secar en estufa de 50º en cajas de

Petri durante 48 horas más o menos, con el objeto de hacer esporular al bacilo y parte se utilizó en condiciones naturales con el objeto de comprobar si el bacilo se encontraba esporulado ya en la naturaleza. Luego se pasteurizó el material y se mantuvo otra parte sin pasteurizar para ver si también así se podía aislar aerobacilos:



Estas muestras se incubaban en caldo lactosado a 37° durante 48 horas. Los tubos que presentaban fermentación se sembraban en cajas de Endo, agar Rojo Neutro (recomendado por Ledingham para aislar *B. polymyxa*) y agar extracto lactosado con Bromo Cresol Púrpura. Se aislaban las colonias que acidificaban el medio o que tomaban el color en el caso del agar Rojo neutro.

2º) Otro método en el que se toma en cuenta, a más de la característica del bacilo de ser esporulado y fermentador de hidratos de carbono, la de ser anaerobio facultativo:



3º) Otro método semejante al anterior:

Secar el material a 50º	80º - 10'	Enriquecerlo
		en caldo
Secar a 50º	80º - 10'	Siembra en anaerobiosis (lactosa)
Mezclar con tierra seca esteril en caja de Petri)		Siembra en Aerobiosis (Lactosa mas indicador)

4º) Otro esquema de aislamiento que se siguió se basó en el hecho de que el bacilo es un esporulado que desarrolla en anaerobiosis y se trató de aislarlo como tal:

Material natural lo llamamos (1)

Material secado a 50º lo llamamos (2)
(para esporular)

Se siembra este material en caldo lactosado (hervido 10') durante 48 horas con el objeto de hacer desarrollar las bacterias anaerobias. O sea:

Enriquecer (1) Obtenemos (E₁)
" (2) Obtenemos (E₂)

Luego

E ₁ Secar a 50º	Siembra en placa con 20 c.c. de agar en dilución
	Siembra en tubo de agar en profundidad (hervido 10')
E ₂ Secar a 50º	Siembra en placa con 20 c.c. de agar en dilución
	Siembra en tubo en profundidad (hervido durante 10')

Numerosos ensayos fueron hechos con cada uno de los métodos descriptos, utilizando materiales diferentes: tierra, desperdicios, agua de canilla, agua de albañal, zanahoria, papa, azúcar, achicoria, trigo, maíz, abono, cáscara de arveja, leche, flor de limón, acelga, remolacha, cebolla, porro, coliflor, cáscara de naranja, flor de heliotropo, margarita, malvón, geranio, flor de conejito, flor de cebolla, rosa, ruda, cala, hoja de enredadera, flor de romero, pasto, papa descompuesta etc.

El total de estos ensayos antes de llegar a la elección de un método definitivo fué de 150 más o menos, lo que, como puede comprenderse, llevó un trabajo de varios meses.

Es comprensible también que, en la elección del material de la naturaleza primara el conocimiento, aunque escaso, que existe en la literatura acerca de su habitat "

Por otra parte no es difícil, a priori, suponer que tales bacterias esporuladas tengan una difusión extraordinaria cuando su principal "habitat" es la tierra, pues su difusión bajo formas de esporas, permite su permanencia en los más diversos materiales.

La existencia de bacterias esporuladas aerobias productoras de gas, que podían ser tanto B. polymyxa, B. macerans, u otra especie desconocida, fué investigada, después de muchos fracasos, por el procedimiento adoptado finalmente que nos permitió hacer hallazgos positivos en la gran mayoría de los materiales ensayados.

Antes de adoptar un método de aislamiento definitivo, tomamos en cuenta todas las observaciones que los ensayos anteriormente descritos nos permitieron hacer. Pudimos deducir por ellos que no era necesario secar el material a 50° puesto que las bacterias ya se hallan esporuladas en la naturaleza con lo cual acortamos la duración del método de aislamiento en 48 horas más o menos. Además, en los primeros ensayos utilizábamos material pesado de cada una de las muestras (1 o 5 gr.). Decidimos después que esta cantidad era excesiva pues la abundancia del bacilo en la naturaleza es tal que permite obtener aislamientos positivos con muy pequeñas cantidades de muestra. Suprimimos la pesada inicial y en vez de suspender el material en agua estéril y, después de agitar tomar 5 ml. y llevarlo a tubo estéril donde se lo pasteuriza 10' a 80° y luego pasar al medio de enriquecimiento como recomienda Ledingham (1945), decidimos colocar el material directamente en ese medio y pasteurizarlo inmediatamente, con lo cual el

método se hizo más práctico.

También concluimos que se facilitaba el aislamiento colocando el material en un medio de enriquecimiento más rico que el caldo lactosado y adoptamos el agua de levadura lactosado o agua de levadura salicina por haber observado que, por lo menos el B. polymyxa desarrollaba mucho mejor en ese medio que en el anterior.

Además suprimimos la siembra en agar extracto lactosado con Bromo-Cresol-Púrpura porque la acidificación del medio se efectuaba en amplias zonas o por toda la caja sin individualizar a las colonias acidificantes. Sembramos entonces en agar rojo neutro porque allí podíamos individualizar al B. polymyxa y en Endo porque pensábamos que allí podíamos aislar tanto al B. polymyxa como al B. macerans.

Las cepas aisladas en todos estos casos fueron examinadas para determinar su naturaleza utilizando las siguientes propiedades fundamentales que sirven para identificar o distinguir al B. polymyxa del B. macerans (reacción de Voges-Proskauer, crecimiento a 45° y desarrollo en sorbitol y Rannosa). Las cepas aisladas (19) resultaron corresponder a B. polymyxa.

La falta de crecimiento de B. macerans en todos los ensayos realizados, nos permite concluir que los métodos generales para aislamiento de bacterias esporuladas no tiene aplicación para el aislamiento de B. macerans.

2) Estudio de métodos apropiados para reconocer la presencia y asegurar el aislamiento de B. polymyxa. Sus resultados.

El examen de los resultados expuestos y otros más obtenidos después, nos permitió establecer un método apropiado para reconocer la presencia y asegurar el aislamiento de B. polymyxa de todos los materiales ensayados vinculados de alguna manera, al suelo.

El método de aislamiento adoptado que resultó selecto

tivo para el B. polynxa fué el siguiente:

- 1º) Siembra del material: una pequeña parte de la muestra se coloca en tubos de agua de levadura lactosada o agua de levadura salicina (Greer, 1928). Estos tubos tienen campanita. Antes de incubarlos se los somete a la
- 2º) Pasteurización : en baño maria a 80º durante 10'
- 3º) Enriquecimiento: los tubos pasteurizados se incuban a 37º durante 48 horas.
- 4º) Observación de los tubos que presentan fermentación
- 5º) Siembra del material de esos tubos en cajas de agar agua de levadura lactosada con Rojo Neutro o de Endo
- 6º) Observación de colonias rojas en ambas cajas
- 7º) Aislamiento y siembra de estas colonias en estría de agar agua de levadura lactosada con Rojo Neutro y en tubo de agua de peptona lactosada con campanita.
- 8º) Identificación del aerobacilo : la presencia de esporas en el agar estría y la presencia de ácido y gas en el tubo de lactosa identifican al aerobacilo.

Dispersión del bacilo: se aislaron B. polynxas de tierra, maíz, zanahora, arveja, lino, chaucha, apio, remolacha y papa podrida, lo que indica su amplia distribución.

Propiedades

Una vez en posesión de un método de aislamiento de B. polynxa nos fué posible realizar el estudio comparativo de sus propiedades con la finalidad de establecer los límites de posible variación de las distintas cepas de B. polynxa aislados. También se solicitó B. polynxas ya clasificadas a distintas instituciones con el objeto de compararlas con las obtenidas en el laboratorio. Se trabajó con 28 cepas, la procedencia de las cuales es la siguiente:

Nº de Cepa	Procedencia
1 -----	tierra de jardin
2 -----	" " "
3 -----	" " "
4 -----	" " "
5 -----	" " "
6 -----	Maíz (Zea Mays)
7 -----	Zanahoria (Daucus carota)
8 -----	Chaucha (Phaseolus vulgaris)
9 -----	Arveja (Pisum arvense)
10 -----	Zanahoria (Daucus carota)
11 -----	Tierra de jardin
12 -----	" " "
13 -----	Lino (Linum usitatissimus)
14 -----	Papa macerada
15 -----	Remolacha (Beta vulgaris)
16 -----	Apio (Apium graveolens)
17 -----	Papa macerada
18 -----	" "
19 -----	" "
8523 -----	A.T.C.C. (Estados Unidos)
8519 -----	A.T.C.C. " "
7070 -----	A.T.C.C. " "
455/5 -----	Div. of bact. and dairy res (Canadá)
C 42/3 -----	" " " "
C 2(1) -----	" " " "
47 -----	" " " "
331-1 -----	Instituto de la Nutrición (Bs.As).
19-2 -----	" " "

Hubiésemos deseado trabajar también con cepas de las bacterias designadas por B. pandora y B. schuyllkilliensis ya que su sinonimia no es aún muy clara pero no las pudimos conseguir.

Con estas cepas hemos podido comprobar lo dicho en la literatura sobre este bacilo.

El bacilo polymyxa es un bacilo Gram negativo, fino, que se presenta generalmente aislado, raras veces en cadena, forma esporangios tipo clostridium, la espora es centralo algo excéntrica (es muy común verla en forma de raqueta) las esporas son grandes, ovoides, con paredes teñibles más bien Gram positivas. Se puede ver también en los preparados, bacterias sin teñir. Son bacilos móviles, con flagelos peritricos.

Desarrollo del bacilo en medios sólidos

Agar extracto: las colonias en este medio, a las 24 horas son chicas, más o menos circulares, convexas, brillantes, superficie lisa, color blanquecino o transparente, borde irregular, estructura finamente granular.

Agar extracto estría: el crecimiento es escaso, blanquecino o transparente.

Agar extracto glucosado el crecimiento es muy mucoso.

Agar agua de levadura lactosado con Rojo Neutro Colonias circulares, elevadas muy convexas, brillantes, mucosas, borde entero toman el color rojo del medio y son difíciles de disolver.

Agar agua de levadura lactosado con Rojo Neutro (estría) el desarrollo es muy abundante, brillante espeso, color rojo o rosado, de consistencia viscosa.

Agar agua de lev. lact. con Rojo Neutro (punción) fermenta el agar lo que significa que desarrolla bien en anaerobiosis.

Gelatina licuan en forma estratiforme, crateriforme o en dedo de guante. Alrededor del séptimo día de desarro-

llo licuan totalmente, algunas lo hacen más lentamente

Papa inoculando una papa con una suspensión de B. polynya por medio de una pipeta Pasteur, se puede observar que ella fermenta al par que se licúa presentando un líquido pardo. Este líquido se serega por el punto de inoculación y allí se endurece formando una costra.

Tambien observamos que sembrando el bacilo en estria de papa cruda (cortada esterilmente' y en estria de papa esterilizada en autoclave, se pone parda la papa cruda y queda completamente blanca la esterilizada.

Zanahoria: buen desarrollo, espeso brillante viscoso transparente.

Desarrollo en medios líquidos

Caldo extracto: ligera turbidez, no forma película

Hidratos de Carbono

Almidon : fermenta (más efectiva la fermentación con N orgánico que con el amoniacal.

Maltosa: fermenta (igualmente efectiva con N org. que con el amoniacal.

Dextrina: fermenta (algo más efectiva con N org.

Glucosa: fermenta

Lactosa: fermenta (mas efectiva con N org.)

Sacarosa: fermenta

Melibiosa: fermenta

Rafinosa: ya sea con N org. como con el amoniacal el B. polynya acidifica el medio sin producir, casi practicamente gas (El Bergey 's manual dice que produce 'ácido y gas'.

Dulcitol; no fermenta.

Leche Reducc. En las primeras experiencias que realizamos con las cepas citadas ñgirieron sin coagular pero en las realizadas últimamente coagularon y produjeron gas.

Avena con Carbonato de Calcio abundante fermentación

Voges Proskaver: positivo

Indol: negativo.

Reduce NO_3^- a NO_2^-

No produce SH_2

No utiliza Citrato de Na como fuente de carbono

Crecimiento a temperatura ambiente: a las 24 horas no se observa desarrollo; después de 3 o 4 días el desarrollo es muy bueno.

Crecimiento a 45° a las 24 horas no hay desarrollo. Comprobamos que, de los medios ensayados, el mejor para el desarrollo del *B. polymyxa* fué el preparado con levadura de pan autolizada, peptona, lactosa y Rojo Neutro.

B. POLYMYXA

N.º de cepa	Crec. a 24 horas (agar P.H.)	Crec. a 48 horas (agar P.H.)	logos Pruebas de M.A. M ₂	Reducción	S _{H₂}	Indol	Caldo extracto	Gelatin	Leche	Citrato de Na como base cristalina y (G.C. de C.)	Test para Amino
1	desar. con nulo sed. col mucositas	Apenas desarrollo	+	+	neg.	neg.	ligero turbidez	licúa estratific.	Caz. G.	no hay desar.	neg
2	Poco desarrollo. 1/2. muy buen desar.	"	"	"	neg.	neg.	"	licúa estratific.	"	"	"
3	Desar. pobre 4/8. desar. pobre	"	"	"	neg.	neg.	"	licúa estratific.	"	"	"
4	no desarrollo 4/8. desar. buen desar. menor	"	"	"	neg.	neg.	"	licúa estratific.	"	"	"
5	Desar. pobre 4/8. buen desar.	"	"	"	neg.	neg.	"	licúa en forma de ab. de sang.	"	"	"
6	Desar. pobre 4/8. muy buen desar.	"	"	"	neg.	neg.	"	licúa (ab. de sang. de agar)	"	"	"
7	no desarrollo 1/8. 1/2. desarrollo muy buen desar. mucosa	Desar. no bueno	"	"	neg.	neg.	"	licúa estratific.	"	"	"
8	Crec. pobre 4/8. crec. pobre	Crec. pobre	"	"	neg.	neg.	"	licúa	"	"	"
9	Desar. pobre 1/2. muy buen desar.	Crec. pobre	"	"	neg.	neg.	"	licúa	"	"	"
10	no desar. 4/8. desar. bueno, en caso	Crec. pobre	"	"	neg.	neg.	"	licúa	"	"	"
11	no desarrollo 4/8. muy buen desar.	Crec. pobre	"	"	neg.	neg.	"	licúa lentamente	"	"	"
12	desarrollo pobre 1/2. muy buen desar.	Crec. pobre	"	"	neg.	neg.	"	licúa	"	"	"
13	no desarrollo 4/8. desar. bueno	Crec. pobre	"	"	neg.	neg.	"	licúa	"	"	"
14	no desarrollo 4/8. de muy bueno	no hay desarrollo	"	"	neg.	neg.	"	licúa	"	"	"

B. POLYMYXA Continuation

N° de cepa	Crecimiento	Crec.	Yoges	Reduccion:	S.H ₂	Indol	Caldo	Citrato	fest.	Avano
	a temp amb Obs: 24 horas	a 45°	Prokover de Mg a 1%	Prokover de Mg a 1%			extracto Gelatina Leche	de No (como para dextrinas y CG Co de C)	para dextrinas crisalinas	
15	Poco desarrollo	no desar	+	+	neg	neg	ligero Licua turbidez levemente	no desar	neg	muy bien desar
16	no desarrollo 4d: col mucosas	"	+	+	neg	neg	" Licua	"	"	"
17	Poco desarrollo 4d: col mucosas	"	+	+	neg	neg	" Licua	"	"	"
18	Poco desarrollo 4d: desar. mucoso	"	+	+	neg	neg	" Licua	"	"	"
19	Desar. escaso 4d: des. tenue	"	+	+	neg	neg	" Licua	"	"	"
47	Desar. casi nulo 4d: muy buen des.	"	+	+	neg	neg	" Licua (debe de gome)	"	"	"
C29A)	Desar. casi nulo 4d: col mucosas	"	+	+	neg	neg	" Licua (debe de guante)	"	"	"
C47(3)	no desarrollo 4d: muy buen des.	"	+	+	neg	neg	" Licua debe de guante	"	"	"
7070	Desar. casi nulo 4d: idem	"	+	+	neg	neg	" Licua ambien te	"	"	"
8519	Poco desar. 4d: idem	"	+	+	neg	neg	" Licua craterif.	"	"	"
8523	no desar. 4d: desar. bueno	Crec pobre	+	+	neg	neg	" Licua craterif.	"	"	"
455/5	Crec. pobre 4d: buen desar.	no des.	+	+	neg	neg	" Licua (debe de guante)	"	"	"
19.2	Desar. casi nulo 4d: idem	no des.	+	+	neg	neg	" Licua estratif.	"	"	"
331-1	Des. casi nulo 4d: idem	no des.	+	+	neg	neg	" Licua estratif.	"	"	"

B. POLYMYXA

Hidratos de Carbono

N. de cepa	Almidón 1%	Almidón 2%	Almidón 5%	Glucosa 1%	Glucosa 2%	Lactosa 1%	Lactosa 2%	Dextrina 1%	Dextrina 2%	Sorbitol 1%	Ramnose 1%	Rafinosa 1%	Rafinosa 2%	Maltosa 1%	Dulcitol 1%	Sacarosa 1%	Melibiosa 1%	Inulina 1%
1	A.G. Sd. Red.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	A.G.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
2	A.G. Sd. Red.	Red. G. (lig. alk.)	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	A.G.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
3	A.G. Sd. Red.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
4	A.G. Sd. Red.	Red. G. (lig. alk.)	Red. G. (lig. alk.)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
5	A.G. Sd. Red.	Red. G. (lig. alk.)	Red. G. (lig. alk.)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. neg. (ácido)	Red. neg. (ácido)	Red. neg. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
6	A.G. Sd. Red.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
7	A.G. Sd. Red.	A. neg.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	li. neg.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	A.G.	A.G.	A.G.
8	A.G. Sd. Red.	A.G.	A.G.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	neg. neg.	A.G.	neg. neg.
9	A.G. Sd. Red.	Red. G. (alk.)	Red. G. (alk.)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (lig. alk.)	A.G.	A.G.
10	A.G. Sd. Red.	Red. G. (lig. alk.)	Red. G. (lig. alk.)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A. neg.	A. neg.
11	A.G. Sd. Red.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.
12	A.G. Sd. Red.	Red. G. (lig. alk.)	Red. G. (lig. alk.)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	A.G.	neg. neg.	A.G.	A.G.	A.G.
13	A.G. Sd. Red.	A.G.	A.G.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	A.G.	neg. neg.	A. neg.	A.G.	A.G.
14	A.G. Sd. Red.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	Red. G. (ácido)	A.G.	neg. neg.	Red. G. (ácido)	A.G.	A.G.

G. mucho gas
g. poco gas

B. POLYMYXA Hidratos de Carbono continuation

N° de cepa	Almidón 1% N.org	Almidón 2% N.org	Glucosa 1% N.org	Lactosa 1% N.org	Dextrina 1% N.org	Dextrina 1% N.org	Arabinosa 1% N.org	Rafinosa 1% N.org	Rafinosa 1% N.org	Maltosa 1% N.org	Dulcitol 1% N.org	Sacarosa 1% N.org	Melibiose 1% N.org	Inulina 1% N.org
15	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	A.G.	neg neg	neg neg	A.G.	A.G. (Red)	neg neg
16	A.G.	Red G (late)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	A.G.	neg neg	neg neg	A.G.	A.G.	A.G.
17	A.G.	No se observa	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.neg	Red G (ácido)	neg neg	Red G (ácido)	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
18	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
19	A.G.	Red G (late)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.neg	A.G.
47	A.G.	Red G (late)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.neg	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
C2(1)	A.G.	Red G (late)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
C2(3)	A.G.	Red G (late)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.neg	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.neg	A.G.
1070	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.neg	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.neg
8519	A.G.	No se obs.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	No se obs.	A.G.	A.G.	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
8523	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
455/5	A.G.	No se obs.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
1972	A.G.	A.neg	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.G.
331-1	A.G.	A.neg	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	Red G (ácido)	A.G.	Red G (ácido)	neg neg	neg neg	Red G (ácido)	A.G.	A.neg

Variantes

Después de muchos sucesivos pasajes por agar agua de levadura lactosado con Rojo Neutro de las cepas de B. polynya estudiadas, en las que siempre apreciaban colonias bien rojas, circulares, elevadas y mucosas desarrollaron, un buen día, en la gran mayoría de las cepas dos tipos diferentes de colonias. Para cerciorarnos de que no se trataba de una contaminación volvimos a preparar cajas y nuevamente obtuvimos los mismos resultados. Decidimos entonces estudiar estas dos variantes y ver si se mantenían estables y si se observaban diferencias en las propiedades bioquímicas de ambas.

Ledingham, Adams y Stanier (1945) hablan de variantes en este bacilo, diciendo que las características del cultivo original fueron extremadamente variadas y, en las últimas generaciones se disociaron en varios tipos. Nosotros no observamos más que dos tipos bien diferenciados de colonias y, en algunos casos, una variable intermedia con características de uno y otro.

A las variantes obtenidas las denominamos Tipo 1 y Tipo 2 y las características de las colonias de ambas son: en agar agua de levadura lactosado con Rojo Neutro

Tipo 1: colonias rojas circulares, elevadas, convexas, borde ligeramente ondulado, espesas, brillantes. difíciles de suspender en agua y medios de cultivo.

Tipo 2: colonias transparentes, con puntos de relejo azulado brillantes, no convexas, borde algo irregular, no mucosas, fáciles de suspender en agua y medios de cultivo.

en agar extracto de carne

Tipo 1: colonias blancas, circulares, chicas, convexas y brillantes

Tipo 2: colonias transparentes, chicas, circulares, no convexas.

En ambos casos las variantes son fáciles de identificar por el color. Microscópicamente hemos observado que las colonias Tipo 1(en agar extracto) corresponden a bacterias casi totalmente esporuladas, mientras que las colonias Tipo 2 a bastones sin esporular(Esta observación coincide con la hecha por Mascotti en una publicación reciente(1950).

Respecto a la estabilidad de estas variantes, a pesar de muchos intentos, no hemos podido observarla. Al repetir una colonia de una variante dada, obteníamos, sin regularidad, ya la misma variante en forma pura, ya la otra variante o a veces, dos tipos de colonias una de las cuales parecía intermedia por sus características, entre las variantes pues presentaba aspectos comunes a una y a otra o también, observamos colonias Tipo 1 y colonias Tipo 2, habiendo partido siempre de una sola de ellas.

A pesar de esto, y mientras conseguíamos una variante pura ensayamos estudiar sus propiedades bioquímicas, si bien no pudimos constatar si el tipo de variante sembrado, se mantenía en el medio líquido inoculado.

Como puede observarse en el cuadro, no obtuvimos diferencias apreciables en las propiedades de las variantes.

B. POLYMYXA Variantes

N° de cepo	Gram (cultivo a temp. ambiente, observo de el 1° día)	Gelatina	Reducción de $M_{2}O_{5}$	$S_{H_{2}}$	Indol	Caldo Extrato Leche	Almidón	Sacarosa	Sorbita	Bismuro	Glicosa	Moloso	Dextrino
1 Tipo 1	Totamente esporulado	Licúa	+	neg.	neg	Ligero turbidez Coag. Coag.	A.G. (Red)	Red. G. (A)	neg neg neg neg	1%	A.G.	Red. G. (A)	1% Obs: 24hr. Obs: 48hr. Obs: 24hr.
1 Tipo 2	Bastones Gram- (sin esporular)	Licúa	"	"	"	"	A.G.	A.G.	"	"	A.G.	Red. G. (A)	A.G.
3 Tipo 1	Esporulado, con algunos bastones	Licúa	"	"	"	"	Red. G. (alc.)	Red. G. (alc.)	"	"	A.G.	A.G.	A.G.
3 Tipo 2	Bastones (exclusivamente)	Licúa	"	"	"	"	Red. G. (alc.)	Red. G. (A)	"	"	A.G.	Red. G. (A)	A.G.
4 Tipo 1	Esporas exclusivamente	Licúa	"	"	"	"	A.G. (Red)	Red. G. (A)	"	"	A.G.	A.C.	A.G.
4 Tipo 2	Bastones exclusivamente	Licúa	"	"	"	"	A.G.	Red. G. (A)	"	"	A.G.	Red. G. (A)	A.G.
9 Tipo 1	Esporas exclusivamente	Licúa	"	"	"	"	Red. G. (alc.)	Red. G. (alc.)	"	"	A.G. (Red)	Red. G. (A)	A.G.
9 Tipo 2	Bastones	Licúa (más en tubos)	"	"	"	"	A.G. (Red)	Red. G.	"	"	A.G. (Red)	A.G.	A.G.
C 42(B) Tipo 1	Esporas con algunos bastones	Licúa	"	"	"	"	Red. G. (Glc.)	Red. G. (A)	"	"	A.G.	Red. G. (A)	A.G.
C 42(B) Tipo 2	Esporas ovoides y bastones gram-	Licúa	"	"	"	"	Red. G. (A)	Red. G. (A)	"	"	A.G.	A.G.	A.G.
10 Tipo 1	Esporas exclusivamente	Licúa	"	"	"	"	No se observa	Red. G. (A)	"	"	A.G.	A.G.	A.G.
10 Tipo 2	Bastones Gram- exclusivamente	Licúa	"	"	"	"	A.G.	Red. G. (A)	"	"	A.G.	A.G.	A.G.
M-2 Tipo 1	Esporas exclus. Licúa vomente	Licúa	"	"	"	"	A.G. (Red)	A.G.	"	"	A.G.	A.G.	A.G.
M-2 Tipo 2	Bastones Gram-	No licúa	"	"	"	"	A.S.	A. neg.	"	"	A. neg.	A.G.	A.G.

3) Estudio de métodos apropiados para reconocer la presencia y asegurar el aislamiento del Bacillus macerans

a) Fracaso de gran número de ensayos. Su descripción

Ya hemos comentado en el capítulo anterior como en nuestros primeros ensayos pensábamos aislar con igual probabilidad y con el mismo método, ya B. polymyxa, ya B. macerans y cómo todos los bacilos fermentadores obtenidos resultaron ser exclusivamente B. polymyxa.

Ante la dificultad de aislar B. macerans por los métodos generales empezamos a buscar algún método en la literatura descripto para ese fin, pero tampoco encontramos allí ninguna técnica indicada.

Decidimos entonces conseguir cepas de B. macerans de algunas instituciones estudiar su biología y ver si por ello se podía deducir algún método de aislamiento.

Las cepas que recibimos tenían un desarrollo excesivamente pobre. Nuestro primer problema fué entonces tratar de conseguir un medio de cultivo adecuado a su desarrollo. Ensayamos para ello sembrar las cepas en los medios de cultivo más diversos, por ejemplo: agua de levadura lactosada a distintos pH; extracto de Malta a distintas diluciones; infusiones de higo, zanahoria, uva, remolacha tierra, tomate, fruto de rosa; en manzana, jugo de naranja, huevo, extracto de carne, agar azul de Metileno-eosina, medio de Salle, medio de Voisenet, medio de Endo, algunos medios sintético etc.

En todos ellos obtuvimos siempre el mismo resultado negativo. Hasta que un día, haciendo ensayos de siembra en puré de papa con CO_2Ca , después de varios pasajes, comenzaron a desarrollarse bien todas las cepas. Se volvió a repetir el ensayo y nuevamente, después de sucesivos pasajes por papa, partiendo de estrias póbrrimas se obtuvieron estrias de desarrollo bueno. Ya creíamos haber soluciona-

do el problema del desarrollo del B. macerans cuando, al ensayar la fermentación de azúcares con estas cepas vimos que ninguna de ellas los fermentaban. Supusimos que habían perdido su actividad enzimática e intentamos reactivarlos con "heat shock" o con siembras en otros medios de cultivo distintos, pero no conseguimos el objetivo buscado.

Todas las cepas presentaban la característica de macerarlas papas inoculadas, sin embargo, dichas papas, no presentaron nunca signos de fermentación, ni se pudo obtener a partir de ellas enzimas capaces de transformar almidón en dextrinas cristalinas. Después de varias observaciones llegamos a la conclusión de que las cepas con que estábamos trabajando pertenecían al B. pugilus, cepa con la que se nos habrían contaminado todos los B. macerans en las dos veces que creímos haberlos reactivado.

Este hecho mantuvo desorientado nuestro trabajo durante varios meses pues nosotros tratábamos de aislar de distintos materiales, las colonias que maceraban la papa con las características observadas en las papas inoculadas en el laboratorio con las cepas que, equivocadamente, creímos ser B. macerans.

Supusimos que la papa sería un buen medio de enriquecimiento para dicho bacilo y, así, por ejemplo, un ensayo de aislamiento que practicamos, consistió en buscar papas podridas con las características ya mencionadas, y de allí preparar suspensiones en agua estéril que luego pasteurizábamos y aislábamos según el método descrito en el capítulo anterior.

Otro procedimiento consistió en tomar pedacitos de lino enriado (ya que al B. macerans se lo cita por sus propiedades enriadoras) y colocarlo sobre una rodaja de papa cruda cortada esterilmente en caja de Petri estéril, incubarlo luego y tratar de aislar allí donde la papa se presentase macerada.

Estos estudios, antes de llegar a la conclusión de que estábamos equivocados, nos llevaron más de medio año de trabajo, viéndonos obligados, después de este tiempo, a recomenzarlos desde el principio.

Nuevamente obtuvimos cepas de *B. macerans* de E.E.U.U. y comenzamos a trabajar con ellas. Esta vez mantuvimos las cepas en medio de avena y CO_2Ca (Tilden y Hudson 1942) y tuvimos muy buenos desarrollos. Estas respondían, por sus reacciones, a la descripción del *B. macerans* dada en la literatura.

Como primer intento de aislamiento, ensayamos recuperar estas cepas después de haberlas mezclado con tierra estéril, o de haber inoculado papas con ellas:

Tierra es- teril	+ unas gotas de una sus- pensión de <i>B. macerans</i>	estufa a 44° hasta secar la tierra con el objeto de hacer es- porular al bacilo.	Pasteurizar ... caja 90°-10'
Papa ino- culada con <i>B. Macerans</i>	Tomar mate- rial de esa papa y mezclar con tierra estéril	Estufa a 44°	Pasteurizar ... caja 90°-10'
Papa inoculada con <i>B. Macerans</i>	Tomar material de esa papa y hacer una sol. acuosa.	No pasteurizar ... caja zar	Past.a ... caja 90°-10'

En los tres casos el bacilo fué recuperado.

El segundo paso, en nuestro intento de recuperación del *B. macerans*, consistió en mezclar tierra natural + *B. macerans* y tratar de recuperarlo. Seguimos un procedimiento aná-

logo al primero de los descritos más arriba, pero el bacilo no fué aislado. Intentamos otra experiencia valiéndonos de la propiedad que tiene el bacilo de ser anaerobio facultativo: para ello, mezclamos: B. magerans + B. polymyxa (ambos anaerobios facultativos) + B. cereus + B. mycoides (aerobios absolutos) con tierra estéril. Sembramos por dilución en anaerobiosis en tubos de agar agua de levadura que habían hervido durante 10'. Después de 48 horas de incubados, rompimos el tubo y sacando material del fondo del agar con un anse, hicimos placas (aerobias). Según lo previsto, el B. mycoides y el B. cereus se habían separado de los otros dos en el cultivo anaerobio, y, en las cajas pudimos reconocer las colonias del B. magerans.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, pensamos aislar al B. magerans de la naturaleza mediante un procedimiento análogo. El material utilizado fué tierra. Pensábamos en el primer paso (cultivo anaerobio) eliminar las bacterias aerobias y en el segundo paso (cultivo en cajas aerobias del material anaerobio) seleccionar las bacterias aerobias facultativas.

Sin embargo, tampoco con este ensayo obtuvimos resultados positivos.

Todos estos fracasos se explicarían por la exigencia de elementos nutritivos que presenta el bacilo para su buen desarrollo, pues, hasta esta altura de la tesis no empleamos el medio de avena (que resultó excelente para el cultivo del B. magerans) para enriquecimiento, en ninguno de los experimentos.

- b) Aplicación de una propiedad característica del B. macerans (producción enzimática de dextrinas cristalinas) para reconocer su presencia en la naturaleza y para su aislamiento.

Aquí hicimos un breve paréntesis para estudiar la propiedad característica del B. macerans de producir enzimas capaces de transformar el almidón en dextrinas cristalinas no reductoras. Esta enzima, única conocida hasta hoy en la naturaleza, sirve para individualizar al B. macerans entre todas las demás especies de bacterias existentes.

Pensemos entonces aplicar dicha propiedad en el aislamiento del bacilo. Observamos que esta propiedad se manifestaba cuando el bacilo desarrollaba en un medio rico como lo es el de avena con CO_2Ca .

Basándonos en ensayos previos en los que comprobamos que ni el B. polymyxa, ni el B. cereus ni el B. mycoides producían dicha enzima, fuimos planificando nuestro trabajo de la siguiente manera:

Pusimos en cajas de Petri,

Tierra estéril + suspensión de B. macerans ----- Estufa a 37° ----- 48 horas
Para hacerlo esporular.

Tierra estéril + suspensión de B. macerans + suspensión de B. mycoides ----- Estufa a 37°
----- 48 horas.

Tierra estéril + suspensión de B. macerans + suspensión de B. cereus ----- Estufa a 37°
----- 48 horas.

Tierra estéril + suspensión de B. macerans + suspensión de B. polymyxa ----- Estufa 37°
----- 48 horas.

Tierra estéril + suspensión de B. macerans + suspensión de B. mycoides + suspensión de B. cereus

+ suspensión de ----- Estufa a 37° ----- 48 horas.
B. polymyxa

Después de 48 horas pusimos 1 o 2 ansas de este material en tubos con 1 c.c. de agua estéril y los pasteurizamos en baño a 90° / 5'. Después sembramos en avena. Al cabo de 3 o 4 días hicimos "test" para comprobar la presencia de enzimas capaces de transformar almidón en dextrinas, en todos los cultivos.

Dicho "test" consiste en colocar en tubo de ensayo 1 c.c. de solución de almidón al 4 por ciento (esterilizado según Tilden y Hudson, 1942) y 0.5 c.c. del cultivo, de dejar en baño maría a 40° y, a distintos tiempos, sacar una gota del tubo, y colocarla en un porta objeto. Colocar al costado de la gota unos cristales de I metálico y, por acción de los vapores del mismo cristalizan las dextrinas (si las hay) en forma de agujas y exágonos que se pueden ver fácilmente con el microscopio.

El "test" resultó positivo para todos los tubos ensayados, lo que significó que esta propiedad nos sirve para indicar la presencia de B. macerans en una mezcla de bacterias, y también que dicha enzima no se inhibe en presencia de ellas.

En base a esta observación hicimos otra experiencia:

Mezclamos tierra natural + B. macerans

Secamos en estufa a 37°

Pasteurizamos ---- Placas (1) ---- no obtuvimos
10' - 30° B. macerans

Avena ----- Placas (2) ---- recuperamos
B. macerans

dió dextrinas
positivas

y conseguimos así recuperar el B. macerans inoculado a la tierra natural pero habiendo enriquecido el cultivo por siembra en el medio de avena.

No lo conseguimos, en cambio, en las placas (1) hechas a partir de tierra inoculada, esporulada y pasteurizada que no había pasado por el medio de enriquecimiento apropiado para B. macerans.

Esto nos condujo finalmente, después de tantos fracasos a un método de aislamiento para B. macerans que será tratado con detalle a continuación

C) Método de aislamiento de B. macerans

El método de aislamiento apropiado es el siguiente:

- 1) Secar el material en estufa a 37° para esporularlo (tratándose de vegetales, esto lo hicimos en desecador a vacío, mezclando el material triturado con tierra estéril)
- 2°) Colocar un ansa de este material en tubos de medio de avena
- 3°) Pasteurizar estos tubos colocándolos en baño maria a 80 80° durante 10' llevar a estufa.
- 4°) Ensayar "tests" para la formación de dextrinas cristalinas por acción sobre el almidón después de unos días (3 o 4) de cultivo a 37°.
- 5°) Hacer cajas por dilución de los tubos positivos
- 6°) Aislar en tubos de avena las colonias circulares, transparentes, pequeñas, brillantes.
- 7°) Identificación del B. macerans: producción de dextrinas cristalinas a partir de ese tubo y, como complemento, la formación de burbujas en ese mismo medio y las propiedades morfológicas observadas por coloración de Gram.

DISPERSION : se estableció la presencia de B.macerans en :tierra, papa(Solanum tuberosum),lino enriado, hoja y flor de naranja(Citrus sinensis) Ortiga (Urtica sp)hoja de zanahoria (Daucus carota) flor de margarita (Chrysanthemum)frutescens) flor de corona de novia (Spiraea sp) y espinaca(Spinacia oleracea)

PROPIEDADES; las distintas cepas de Bacillus macerans con que trabajamos son las siguientes:

Nº de cepa	Procedencia
7068	A.T.C.C.
7069	"
482/9	N.R.R.L
504/6	"
503/10	"

Estas cepas se nos contaminaron todas con B.pumilus, las perdimos. Recibimos nuevamente de:

Nº de cepa	Procedencia
B. 171	Cult. Coll. Northern Reg. Res.Lab. Peoria, Illinois
B. 172	"
B. 392	"
B. 429	"
B. 430	"
B. 432	"
B. 433	"
B. 434	"
B. 436	"
3-19	Inst. de Micr. Agricola Ministerio de Agricultura (Bs.As).
3- 21	"

Y aislamos las siguientes

<u>Nº de cepa</u>	<u>Procedencia</u>
20	Tierra
21	Lino (Linum usitalissimum)
22	Tierra
23	Margarita (Chrysanthemum frutescens)

Morfología: todas las cepas son bastones Gram negativos finos (0.6 x 3). En estrías de agar Rojo Neutro lactosado jóvenes se presentan como bastones finos, largos, Gram negativos, con gránulos internos Gram positivos. A veces se presentan en cadenas cortas. Esporas ovoides. Esporangios tipo clostridio, en forma de raquetas. A veces las esporas presentan membrana teñible, otras no. En sucesivos pasajes por agar extracto, el cultivo se va debilitando y podemos observar en él, bastones con una protuberancia central o, a veces terminal, que es bien teñible y no presenta aspecto de espora. Parecería un nudo hecho con la bacteria. Observamos también que pasando el cultivo de estría a estría de agar extracto, además de perder el poder de desarrollo pierde también la facultad de esporular. Haciéndolo, en cambio, por medio de avena adquieren uno y otra.

Son móviles, con flagelos peritricos.

Desarrollo del bacilo en medios sólidos

Agar extracto de carne: colonias circulares, pequeñas de borde algo irregular, claras con reflejo azulado, brillantes y convexas

Agar agua de levadura con Rojo Neutro: colonias pequeñas, circulares o algo irregulares, muy brillantes incoloras o ligeramente rosadas, elevadas, bordes nítidos.

Papa inoculada: aparece una zona obscura en el punto

de inoculación y la papa se vuelve blanda en esa zona, despues segrega un líquido oscuro con burbujas por ese mismo punto.

Gelatina : no licúa.

Desarrollo en medios líquidos:

Caldo: ligera turbidez, no forma película

Leche: en general coagula y produce gas

Medio de Avena más CO_3Ca : desarrolla muy bien, segregando un mucus que unifica toda la parte sólida del medio en la parte inferior del tubo con la consistencia de un engrudo, quedando la parte superior completamente transparente. En este medio se siente olor a acetona cuando el cultivo está bien desarrollado. Este medio resultó excelente para el desarrollo del B. macerans y fué el adoptado para su cultivo.

Hidratos de Carbono : las cepas sembradas en medio de avena presentan abundante fermentación, sin embargo, en agua de peptona más un azúcar, con campanita, no demuestran poseer una gran actividad fermentativa. Acidifican siempre, pero, en cambio, se observa muy poco gas en la campanita.

Almidón: fermentaron todos las cepas con producción de ácido y gas.

Sacarosa, Sorbitol, Ramnosa; Dextrina, Glucosa y Maltosa fermentan con producción de ácido y algunas con producción de gas en mayor o menor grado según la cepa, pero otras cepas no lo producen en la mayor parte de los azúcares ensayados.

Voges Proskauer: negativo

Reduce NO_3^- a NO_2^-

El crecimiento a 45° no nos pareció un carácter importante como para diferenciarlo del B. polynyxa. No es una característica muy fija del B. macerans pues no siempre crecían a 45° si bien algunas veces obtuvimos buenos desarrollos.

A temperatura ambiente: no desarrolla en 24 horas.

B. MACERANS

Nº de cepa	Gram	Amidón	Saccharosa	Sorbitol	Biomasa	Bio N. org	Leitinas	Glicosa	Molasa	Malta	Yogur	Tras traer	Temp. amb	Temp. 24h	Temp. 48h	Temp. 72h	Temp. 96h	Citrato de Na	Definitivo	SHS	Reduccion	Leche	Caldo de extractos	Productos de cristal
B.111	Bacilos gram 2,25µ neg. largos x 0,5µ Cadenas cortas x 0,5µ	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg	casí	casí	neg	neg	neg	neg	No. lico	neg.	+	Coag. G	ligera turbidez	Posit.
B.112	Bacilos gram 2,25µ neg. largos x 0,5µ	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A.G.	A. neg.	A. neg.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	No (dog) G	"	"
B.302	Bacilos gram 2,25µ neg. largos x 0,5µ Cadenas cortas x 0,5µ	A.G.	A. neg.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	Coag.	"	"
B.429	Bacilos gram 2,25µ neg. Cadenas cortas x 0,5µ	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	Coag.	"	"
B.430	Bac. gram - 2,25µ Cadenas cortas x 0,6µ	A.G.	A. neg.	A.G.	A. neg.	A.G.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	neg.	"	"
B.432	Bacilos gram - 3µ x 0,75µ	A.G.	A. neg.	Red. G (alt)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	neg.	"	"
B.433	Bacilos gram - largos x 0,6µ Cadenas cortas	Red. G (alt)	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	Coag. G	"	"
B.434	Bac. gram - 2,25µ cadenas cortas x 0,5µ	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	"	neg	neg	neg	neg	neg	"	"	"	"	neg.	"	"
B.436	Bacilos gram - largos 2,25µ cadenas cortas x 0,6µ	A.G.	A.G.	Red. G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	neg. neg.	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	Coag. G.	"	"
3.19	Bacilos gram neg. No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	No se observo	"	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	"	"	"	"	No se ads.	"	"
3.21	Bacilos gram -	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	No se observo	"	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	"	"	"	"	No coag. G	"	"
21	Bastones gram +	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	"	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	neg.	"	"
22	No se observo	A.G.	A.G.	Red. G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	"	"	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	"	"	"	"	Coag. G.	"	"
23	Bastones gram +	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	"	"	casí	casí	neg	neg	neg	"	"	"	"	Coag. G.	"	"
24	No se observo	A.G.	A.G.	A.G.	A. neg.	A. neg.	A. neg.	A.G.	A.G.	A.G.	"	"	casí	casí	neg	neg	neg.	"	"	"	"	Coag. G.	"	"

Dextrinas cristalinas

Según hemos podido observar en nuestros ensayos, la propiedad distintiva del B. macerans que sirve para identificarlo, es la de producir enzimas capaces de transformar el almidón en dextrinas cristalinas no reductoras. Por esta razón hemos estudiado con algún detenimiento dicha propiedad.

Para producir y reconocer las dextrinas cristalinas hemos utilizado el método propuesto por Tilden y Hudson (1942) con ligeras variantes. Dicho método consiste en preparar una solución de almidón al 4 por ciento en un balón aforado sin llevar a volumen (con más o menos la mitad de agua necesaria), se coloca en baño maría hirviente y se lo hace rotar hasta aclarar la solución. Después junto con un balón con agua destilada, se pone a esterilizar en autoclave ya caliente, a 125° durante una hora, terminada la cual se lleva inmediatamente a volumen con el agua recién esterilizada, se agita y la solución queda lista para ser transformada luego en dextrina por la enzima de del B. macerans.

"Test" para comprobar la presencia de dextrinas: de la solución de almidón se toma esterilmente 1 c.c. y se coloca en un tubo de ensayo junto con 0.5 c.c. de una suspensión de avena con cultivo de B. macerans de más o menos 3 días de incubación a 37°. Se coloca a baño maría a 40° y se hace el reconocimiento de las dextrinas a los 15' 30' o una hora de actuar la enzima sobre el almidón (a los 15' ya se pueden observar generalmente, las dextrinas). El reconocimiento de las mismas se efectúa, según Tilden y Hudson, agregando una gota de una solución de I N/10 a 3 gotas de la solución de almidón más dextrina, se deja evaporar en

un porta y se observa al microscopio. Nosotros sustituimos la solución de I por cristales de I_2 , que se colocan a un costado del porta. Los vapores de ellos provocan la cristalización de las dextrinas. Estas cristalizan, de preferencia, en los bordes de la gota.

Según Tilden y Hudson se pueden observar distintos estados en el desarrollo de las dextrinas según el tiempo que actúa la enzima sobre el almidón. Así, observan una primera etapa de color azul violado con el lugol, y de cristales hexagonales en observación microscópica; una segunda etapa en la que el color empieza a hacerse violeta y comienza a verse gran cantidad de agujas en el microscopio hasta que, en la etapa final el color se hace marrón violeta y las agujas, largas cubren toda el área de la gota.

Cristalizando las dextrinas con vapores de I_2 (en vez de lugol) estas observaciones no pudieron ser comprobadas. Parece que el I_2 favorece la cristalización en forma de agujas, ya aún desde los primeros instantes en que actúa la enzima sobre el almidón y, en cuanto al color este se mantiene siempre en un tono azul violado más oscuro que el observado con lugol en los primeros estados.

Después de comprobar la formación de dextrinas por todas las cepas de B. macerans que teníamos, probamos la formación de las mismas con otras bacterias (B. subtilis, B. cereus, B. megatherium y B. mycoides) obteniendo resultados negativos. Ensayamos luego con una mezcla de estas bacterias y B. macerans, observando en estos experimentos, las dextrinas.

En igual forma ensayamos la acción sobre el almidón de las amilasas de la saliva y de la diastasa (que obtuvimos a partir de cebada germinada, puesta a secar después de un cierto grado de crecimiento, molido luego y colocada en un balón con agua y cloroformo). Observamos en ellas la formación de dextrinas, el color de la gota con el I_2 y el

poder reductor, a los 30' de actuar la enzima sobre el almidón en baño de 40°

	Observación microscópica con I	Color con I	Poder Reduc- tor
1 c.c. de almidón + 4 % (control)	película violeta gruesa	azul	negativo
1 c.c. de almidón + 0.5 c.c. de diastasa	Granos pardos	Incoloro	positivo
1 c.c. de almidón + 0.5 c.c. de saliva.	No se ve absolu- tamente nada	Incoloro (con lige- ro tinte amarillo)	Posi- tivo

Comprobando, de esta manera que tampoco estas enzimas forman dextrinas cristalinas no reductoras.

El líquido supernatante del medio de avena sembrado con B.macerans no acusa la presencia de dextrinas en el ensayo con I pese a que en dicho medio hubo almidón. Servirán las dextrinas de alimento a los mismos B.macerans? o no formará dextrinas cristalinas de ese almidón?

Además al tratar de observar la acción de dos enzi-
mas diferentes sobre el almidón (B.macerans y diastasa o
B.macerans y saliva) no hemos podido tampoco observar
dextrinas al terminar el ensayo:

	Obs.micr.	Color con I	Poder Reductor
1 c.c. de almidón + 0.5 c.c. de enzima de <u>B.macerans</u> + 0.5 c.c. de saliva filtra- da por Seitz	No hay dex- trina	Incoloro	positivo
1 c.c. de almidón + 0.5 c.c. de enzima de <u>B.macerans</u> + 0.5 c.c. de diastasa	"	"	"

Pensamos entonces, que haya talvez enzimas (aún produci-

das por el mismo bacilo) capaces de desdoblar las dextrinas cristalinas.

Con el objeto de aclarar este punto tratamos de obtener cristales de dextrinas α y de dextrinas β para utilizarlas como hidratos de carbono en un medio de cultivo y ver si podían ser fermentadas por bacterias.

Para obtener las dextrinas seguimos la técnica indicada por Tilden y Hudson (1942) que consiste en tomar, por ejemplo, 140 c.c. de solución de almidón al 40/0 (preparada según fórmula indicada) mezclarla con 60 c.c. de la enzima y colocarla en baño de 40 ° hasta que el "test" con lugol de color pardo, que es según los autores citados índice de la terminación del ataque. Luego se agrega 10 c.c. de tricloroetileno y se agita el líquido en recipiente con hielo durante 2 o 3 horas, se forma así precipitado abundante. Se deja en heladera durante 2 o 3 días. Se separa el líquido por decantación o por filtro y se guarda el precipitado en la heladera. Se concentra el líquido al 1/4 se agrega tricloroetileno y nuevamente se repite la operación ya indicada. Se mezclan los dos precipitados, se lavan con agua fría y a las 24 horas se los pesa húmedos se agrega, entonces 10 c.c. de agua por cada gramo de peso del precipitado y se coloca la suspensión en Erlenmeyer en baño maría, hirviendo y agitando bajo campana, hasta la disolución de dicho precipitado. Se agrega un poco de carbón, se filtra húmedo, se pone en la heladera y se separan los cristales formados, que constituyen las dextrinas α . Se concentra el líquido al 1/5 en vacío y se pone a cristalizar de nuevo. Se separa el líquido que queda y se lo concentra hasta la consistencia de jarabe, se agrega alcohol poco a poco en 2 o 3 días hasta obtener una concentración del 70 por ciento, precipitan así las dextrinas β . Se purifican las β dextrinas por recristalización en agua hirviendo. Se purifican las α dextrinas por recristalización en agua a la que se agrega alcohol hasta el 70 por ciento.

Probamos el poder reductor de ambas dextrinas cristalizadas con azul de Metileno e hidróxido de sodio. Ninguna de las dos dextrinas da poder reductor. Hacemos luego la hidrólisis de las dextrinas con ácido sulfúrico N/1 en caliente y ambos tubos adquieren poder reductor.

Con estas dextrinas cristalizadas preparamos el medio de cultivo: agua de peptona más dextrina, con indicador y campanita. Sembramos en ellos B. polymyxa, B. cereus, B. macerans y B. Mycoides. Sin embargo no llegamos con estos ensayos, a obtener una conclusión definitiva.

Finalmente quisimos ver si inoculando una papa con B. macerans se producía la transformación de los granos de almidón de la misma en dextrinas.

Después de varios días de cultivo tomamos material con un ansa de la zona blanda de la papa, extendimos este material en un plato, hicimos llegar a este vapores de I y en la observación microscópica vimos los granos de almidón característicos, de color azul, sin ninguna deformación. Pensamos entonces que o bien la enzima capaz de atacar al almidón no era producida por el B. Macerans en papa, o bien que el almidón crudo no era atacable por la misma en caso de ser producida.

Para ver si había enzima introdujimos un pedazo de papa, cultivada con el bacilo, en 1 c.c. de solución de almidón y después de 15' ya había lindísimos cristales. Luego, el B. macerans, produce dicha enzima en papa.

Para probar si el almidón por ser crudo no era atacado por la enzima, preparamos una solución de almidón al 4 % en frío e hicimos actuar sobre 1 c.c. de la misma, enzimas de varias cepas distintas de B. macerans. Hicimos la comparación con el almidón codido después de 1 hora de actuar la enzima sobre ellos:

Enzima de dis- tintas cepas de B. Maccherans	Almidon crudo		Poder Reduc- -tor	Almidon Cocido	
	Color con Lugol	Observa- ción Micros- copica		Color con Lugol	Observación Microscopi- ca
3-19	Precipi- tado casi ne- gro.	Granos pardo roji- zo	No tiene	Pardo Marron	exágonos
171	"	"	"	"	exágonos y agujas
433	Casi incolo- -ro	"	"	"	exágonos.

con lo que se comprueba la hipótesis y a mas justifica la preparación de la sol. de almidón dada por Tildén y Hudson que la esterilizan durante 1 hora a 125° haciéndola de esta manera atacable por la enzima.

C A P I T U L O I V

DISCUSION DE RESULTADOS

Hemos hecho hasta aquí el estudio del B. polymyxa y del B. macerans, de su aislamiento, su dispersión, sus analogías y diferencias. Hemos comprobado gran parte de lo publicado en la literatura por diversos autores sobre los aerobacilos.

En cuanto a las diferencias establecidas por Porter, Mc Cleskey y Levine para distinguir al B. polymyxa del B. macerans, nosotros hemos observado que:

- 1) La reacción de Voges Proskauer siempre nos resultó positiva para el B. polymyxa y negativa para el B. macerans por lo que la consideramos una reacción característica y diferencial entre las dos especies.
- 2) El crecimiento a 45° del B. macerans como carácter diferencial y el crecimiento a temperatura ambiente del B. polymyxa, fueron caracteres que no se manifestaron constantes en los diferentes ensayos que hicimos, por lo que no nos parece que estos sean de importancia fundamental en la diferenciación de ambos bacilos.
- 3) La fermentación de Sorbitol y Ramnosa por parte del B. macerans exclusivamente, tampoco nos pareció un carácter muy importante en la diferenciación, pues si bien ninguna de nuestras cepas de B. polymyxa fermentó dichos azúcares (lo que confirma a Porter), existe el antecedente de que ni Smith ni Ledingham pudieron corroborar dicha afirmación.

Por otra parte, las cepas de B. macerans con que nosotros trabajamos, sembradas en Sorbitol o Bacterose no dieron gas en cantidad apreciable como para considerar dicha fermentación muy efectiva ni muy decisiva en la identificación de las especies.

Respecto a la diferencia entre ambas especies establecida por Tilden y Hudson, basada en las distintas amilasas producidas por ellas, es definitiva, según lo hemos comprobado. Nos parece también que es la diferencia más interesante pues dicha propiedad no solo sirve para distinguir al B. macerans del B. polynyxa sino también para individualizar al B. macerans de toda otra bacteria conocida. Concluimos pues que solamente la reacción de Vogues Proskauer y la producción de enzimas capaces de transformar al almidón en dextrinas cristalinas son significativas para distinguir entre sí a los aerobacilos.

En cuanto a la denominación de estas bacterias, la creación del nuevo género Aerobacillus no nos parece justificada, puesto que la única diferencia que permite distinguirlo del género Bacillus sería la existencia de un sistema capaz de transformar hidratos de carbono con producción de hidrógeno y anhídrido carbónico. Si esta propiedad que en verdad es muy importante, pudiera ser instituida como fundamento de la creación de un género en este grupo de bacterias esporuladas, algo análogo debiera aceptarse para el género Clostridium, separándolo en los grupos de especies con producción de anhídrido carbónico e hidrógeno y en otro grupo sin producción de anhídrido carbónico e hidrógeno de los hidratos de carbono.

Respecto al B. pandora y B. schuykilliensis, que fueron descritos como especies y consideradas en el Bergey Manual (1949) probables variantes de B. polynyxa y de B. macerans respectivamente, tiene, en las descripciones originales, además de la propiedad de fermentar hidratos de carbono, las siguientes características distintivas que

llevaron a los autores a considerarlas especies nuevas:

B. schuykilliensis (Eisenberg) No produce acetil metil
carbinol
No fermenta sorbitol
Licúa gelatina
Produce SH₂

Y de éstas ni la producción de S H₂ ni la licuación de gelatina fueron dadas por ningún autor como de importancia fundamental en la caracterización de las especies aquí estudiadas; además el hecho de no fermentar sorbitol ya hemos aclarado que tampoco parece tenerlo, de donde resulta que la única reacción dada, realmente diferencial, es la de no producir acetil-metil-carbinol y ésta nos permite incluir al B. schuykilliensis dentro del B. naccransi tal como está considerada en el Bergey's Manual, no justificando, en cambio, la nueva especie.

B. pandora (Corbet) produce ácido sin gas de glucosa. Por faltar una de las reacciones importantes, su descripción no permite incluirlo, según nos parece en ninguna de las dos especies existente.

C A P I T U L O V

RESUMEN - CONCLUSIONES

- 1) Se detalla un método para aislamiento de B. polymyxa que consiste en sembrar el material en medio de enriquecimiento, pasteurizar para eliminar bacterias no esporuladas y aislar por dispersión en placa.
- 2) Se detalla un método para aislamiento de B. macerans que consiste en utilizar cultivo de enriquecimiento, pasteurizar, comprobar la existencia de la enzima específica y aislar por dispersión en placa.
- 3) Se establecen las propiedades características fundamentales que sirven para diferenciar al B. polymyxa y B. macerans.
- 4) Se adopta el medio de agua de levadura lactosado con Rojo Neutro y el de avena y carbonato de calcio como más adecuados para el desarrollo del B. polymyxa y B. macerans respectivamente.
- 5) Se observaron en B. polymyxa dos tipos de variantes que siempre resultaron reversibles.
- 6) Se hizo un pequeño número de observaciones con las dextrinas cristalinas no reductoras obtenidas a partir del almidón con la enzima producida por el B. macerans.
- 7) Se discute la conveniencia de la creación del género Aerobacillus y se dan los fundamentos para una decisión contraria.

Materiales y Métodos

A continuación se detallan algunos de los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo.

Agar agua de levadura lactosado con Rojo Neutro: (adoptado para el desarrollo del B. polymyxa) Utilizamos el medio dado por Ledingham, Adams y Stanier (1945) cuya fórmula es la siguiente:

Almidón o lactosa.....	20 gr.
Poptona.....	10 gr.
Extr. de levadura(seco)..	5 gr.
Rojo Neutro.....	0.05 gr.
Agar.....	15. g
Agua.....	1000 c.c.

Luego utilizamos agua de levadura (ver descripción mas abajo) en proporción de 100 c.c. en sustitución de los 5 gr. de extracto de levadura seco. Ensayamos el medio con levadura de cerveza y con levadura de pan y observamos mejor desarrollo en el medio preparado con esta última.-

Preparación de agua de levadura de pan autolizada. Se desmenuza 500 gr. de levadura de pan prensada y se coloca en un balón en estufa de 50° durante 48 horas, agitándolo a las 24 horas varias veces. La levadura sufre una autólisis y la masa sólida se transforma en un líquido espeso que se diluye alternaino de 48 horas con medio litro de agua. Se filtra por papel plegado y el líquido claro que, en general, filtra muy lentamente, se lleva a pH 7 con hidróxido de sodio. Se esteriliza a 110° durante treinta minutos. Esta agua de levadura suele ser designada en el laboratorio como extracto de levadura al medio.

Preparación de agua de levadura de cerveza autolizada
se prepara de igual manera que la descrita para la levadura de pan. En general la autólisis comienza muy rápidamente y la masa queda mucho más fluida al cabo de las 48 horas de autólisis.

Medio de Avena con Carbonato de Calcio: la fórmula, dada por Tilden y Hudson es:

Avena	5 gr
CO ₃ Ca.....	2 "
Agua.....	100 c.c.

Con este medio se suele presentar el inconveniente de la distribución en tubos por la sedimentación rápida de la avena. Se puede obviar este inconveniente agitando fuertemente la mezcla en el balón y mientras se agita tomar con pipeta 5 c.c. y ponerlo en cada uno de los tubos.

También usamos el procedimiento de hacer una mezcla uniforme de avena y carbonato de calcio en un mortero, distribuirla en tantas partes iguales como tubos se quiere preparar y añadir agua en la cantidad requerida. La esterilización se hace 120° durante 20 minutos; en general se mojan los tapones a pesar de todas las precauciones que se adopten para evitarlo.

Para la esterilización de cantidades más grandes de medio, en balones, este inconveniente suele estar agravado por la expulsión del tapón de algodón. Para resolver esta dificultad se mantiene el balón en autoclave un buen tiempo hasta que el medio tome consistencia de engrudo, agitándolo algunas veces. Luego se esteriliza a 120° durante unos pocos minutos, se tapa apenas disminuida la presión y se lo esteriliza a 120°/20'.

Inoculación de papas: se eligen papas sanas, sin lesiones ni brotes que puedan dificultar el levado de las mismas y de tamaño más bien chico de modo que puedan ser conservadas en cajas de Petri estériles para su incubación una vez inoculadas(se usan dos tapas o dos fondos de caja estériles juntos pues así la altura de la caja se hace mayor).

Para inocularla se procede así: se lava la papa con agua y jabón varias veces, se enjuaga con agua, se seca con un trapo bien limpio y se coloca en una caja estéril. Luego se elige el punto de inoculación y se echa sobre él unas gotas de lugol. También se puede flamear dicha porción pasándola rápidamente por mechero. Una vez hecho esto se toma una suspensión en agua de la bacteria que se quiere inocular y con una pipeta Pasteur bien finita se toma material de ese líquido y se introduce en la papa que queda así inoculada.

Pueden hacerse dos o tres inoculaciones de la misma suspensión en la misma papa si se quiere, luego se lleva a estufa para incubar, dentro de la caja de Petri.

Otros medios de cultivo utilizados comúnmente en el presente trabajo fueron: agar extracto de carne, medio de Endo, agua de peptona cuyas fórmulas fueron tomadas del Standard methods. Para colorear bacterias fué utilizado en general el método de Gram-Nicolle.

Mélida Giambrazi

Alfredo

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Adams G.A., and Stanier, R.Y. 1945 Production and properties of 2,3 butanediol. Can J. Research, 23 B: 1
- Adams G.A. 1946 Production and properties of 2,3 butanediol. Can. J. Research. 24 F.:1.
- Adams G.A., and Leslie, J.D. 1946 Production and properties of 2,3 butanediol. Can. J. Research, 24 F: 12
- Adams G.A., and Leslie, J.D. 1946 Production and properties of 2,3-butane diol. Can. J. Research. 24 F 107.
- Adams G.A. 1946 Production and properties of 2,3 butanediol. Can. J. Research., 24 F:1
- Bergey, D.H., Breed, R.S., Murray E. G. D. Parker Hitchens, A. 1939 Bergey's Manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Company Baltimore. Ibid 1940.
- Blink, 1942 Experiments on the concentration of B. macerans enzymes. Kolloid Z., 101:126
- Bréaudat L. 1906 Sur un nouveau microbe producteur d'acé-
tone. Ann. Inst. Pasteur. 20:874
- Clendenning, K.A. and Wright D.E. 1946 Production and properties of 2,3 butanediol. Can. J. Research 24 F: 287

- Clendenning, K.A. 1936 Production and properties of 2,3 butanediol. Can J. Research, 24 F. 249.
- Corbet A.S. 1930 An organism found in the latex of Hevea brasiliensis. J. Bact. 19:320.
- Elsonberg, G.M. 1942 Aerobacillus, lactose fermenting, sporulating species from filtered chlorinated water. J. Am. Water Works Assoc. 34:365.
- Fratkin, S.B., and Adams, G.A. 1946 Production and properties of 2,3-butanediol. Can J. Research. 24 F. 29
- Grant Lee Stahly. 1936 Dissimilation of carbohydrates by bacteria of the genus Aerobacillus. Iowa State Coll. J. Sci, 11:110.
- Greer F.E. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B. coli group. Jour. Int. Dis., 42:501.
- Greer F.E. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B. coli group, Jour. Int. Dis., 42:514
- Greer F.E. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B. coli group Jour. Inf. Dis. 42:525.
- Greer F.E. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B. coli group Jour. Inf. Dis., 42: 537
- Greer, F.E. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B. coli group Jour. Inf. Dis, 42: 545

- Greer F.E. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B.coli group Jour. Inf. Dis., 42:551.
- Greer F.E. Noble, R., Hyham, F., and O'Neil, A. 1928 The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B.co li group Jour. Int. Dis., 42:556
- Greer F.E., and Noble R. 1928, The sanitary significance of lactose fermenting bacteria not belonging to the B.coli group. Jour. Int. Dis., 42:568
- Katznelson, H. 1944 Studies with B. polymyxa Can. J. Research 22:235-40.
- Katznelson H. 1944 Differentiation of Bacillus polymyxa and B. macerans on the basis of vitamin requirements. J. Bact., 48:495.
- Kerr R.W. 1943 On the significance of the degradation of starch by B. macerans amylase J. Am. Chem. Soc. 65: 188.
- Klyver, A.J., and Van Niel, C.B. 1936 Prospect for a natural system of classification of bacteria. Centr. Bakt. Paras, II Abt. 94: 402 .
- Ledingham, G.A., Adams, G.A., and Stanier R.V. 1945 Production and properties of 2,3 butanediol. Can. J. Research, 23 F: 48
- Leslie, J.D., and Castagne, A. 1946 Production and properties of 2,3 butanediol. Can. J. Research, 24 F: 311.
- Mascotti, N.J.V. 1950 Disociación de acrobacillus polymyxa y su influencia en el rendimiento de 2,3-butylene glicol por fermentación de mostos de caiz. Ciencia e Investigación, VI, 4: 187.

- Neish A.C. 1945 Production and properties of 2,3 butanediol Can.J. Research.23 B. :10.
- Perlman, 1944 Fermentations by streptothricin- resist cultures of Aerobacillus polymyxa J.Bact. 48:116.
- Porter R., Mc Cleskey, C.S. and Levine M. 1935 Characteristics of sporulating, facultative bacteria producing gas from lactose. Proc.Soc. Exp. Biol.and Med., 32: 1032.
- Porter R., Mc Cleskey ,C.S., and Levine M. 1937 The facultative sporulating bacteria producing gas from lactose.J.Bact.,33: 163.
- Fribram, E. 1928 Classification of microorganisms. J.Bact.18:374
- Fringsheim, H. 1928 Survey of starch chemistry Chem.Cat. .Mc Co.New York.
- Schardinger, F. 1904 Mitteilung aus dex staatlichen Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Wien. Azetongarung. Wiener Klin. Wochenschr., 17:207.
- Stanier R.Y., Adams G.A. Ledingham, G.A. 1945 Production and properties of 2,3 butanediol.Can J.Research ,23F:72
- Stansly F.G., and Schlosser, M. 1947 Studies on polyoxyin, isolation and identification of B. polymyxa. J.Bact., 54: 549.
- Tilden E.B. and Hudson, C.S. 1939 Conversion of starch to crystalline dextrans by the action of a new type of amylase separated from cultures of A.macerans Im.Chem.Soc.,61: 2900

Tilden E .B., and Hudson. C.S. 1942. Preparation and properties of the amylases produced by B. macerans and B. polynya J.Bact., 43: 527.

Voisenet, E. 1914 Sur un ferment contenu dans les eaux agent de deshydratation de la glicerine. Ann. Inst. Pasteur., 28: 807.

Wilson, J. Schoch, T.J., and Hudson, C.S. 1943 The action of macerans amylase on the fractions from starch. J. Am. Chem. Soc., 65:1380

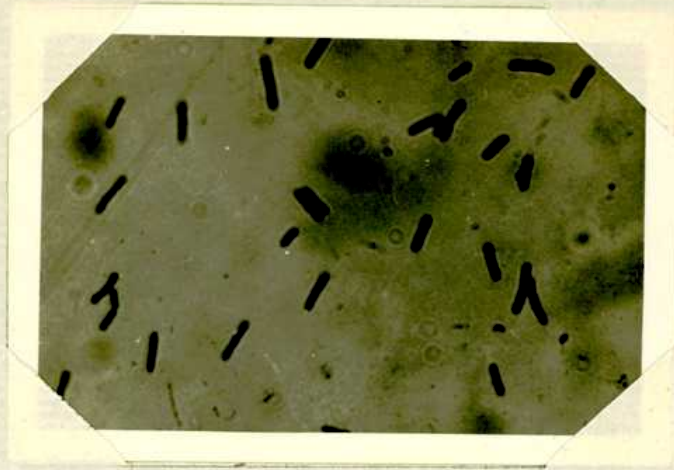
Explicación de las fotografías (1)

Se hace la salvedad que dada la escasez de material fotográfico disponible actualmente, no se pudo ilustrar el trabajo de la manera deseada.

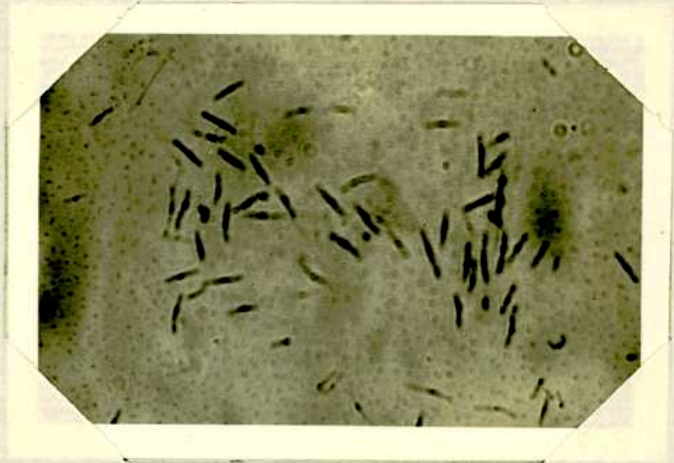
- Fotografía Nº 1: Bacillus polymyxa x 1000 aproximadamente.
- " " 2: Bacillus macerans x 1000 aproximadamente (En ella pueden observarse las protuberancias, generalmente centrales, de las que da cuenta el texto.
- " " 3: Bacillus macerans x 1000 aproximadamente
Esporangios.
- " " 4: Colonia de Bacillus polymyxa en agar extracto de carne x 1000 aproximadamente
- " " 5: Colonia de Bacillus macerans en agar extracto de carne x 1000 aproximadamente.
- " " 6: Dextrinas cristalinas obtenidas por acción de la enzima del B. macerans sobre el almidón x 500 aproximadamente

(1) Fotografías obtenidas por gentileza de mis compañeros del Instituto de Buelos y Agrotecnia señores G.Causa y M.Médici

1



2

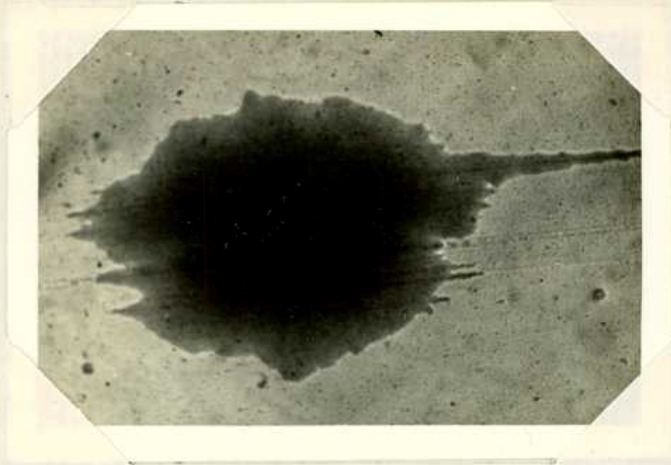


3

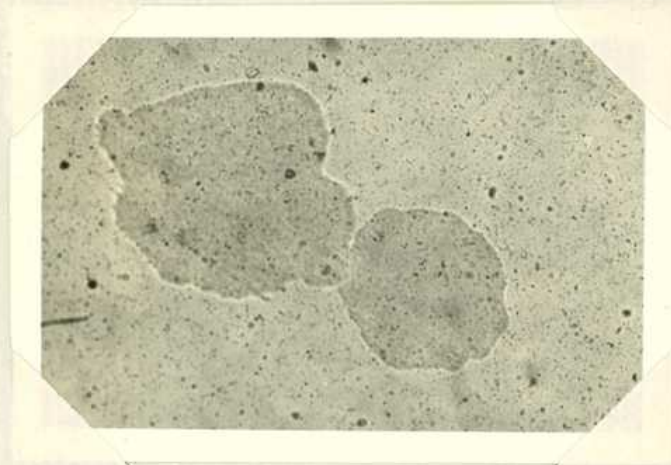


POPH. 2A

4



5



6

