

Nuevo bacilo anaerobio enriador del lino

Por S. SORIANO

(Con las láminas XXVI a XXVIII)

El proceso de enriamiento para la separación de las fibras vegetales es uno de los fenómenos biológicos más interesantes que se verifican en la naturaleza, sobre el cual aun hoy día no se tiene un conocimiento suficientemente preciso como para interpretarlo con claridad.

Aun dejando de parte el aspecto químico y concretándonos al problema microbiológico de determinación de la o las especies a las cuales puede atribuirse la propiedad de separar las fibras, nos encontramos con una serie de opiniones que no pueden conciliarse. Si bien es generalmente admitido que la función específica del enriamiento por inmersión bajo agua (que es uno de los más comúnmente empleados y el que da una mejor calidad de la fibra), es debida a la acción de una flora bacteriológica anaerobia, muy especializada, no se tiene todavía conocimiento exacto para la limitación de las especies a las cuales debe atribuirse.

Desde el trabajo de Winogradsky y Friber (1) en 1895, que estudian por primera vez un agente específico del enriamiento del lino por el método de sumersión, y siguiendo con los de Behrens (2), de Störmer (3) y de Beijerinck y Van Delden (4),

(1) WINOGRADSKY, S., et FIBRES, V., *Sur le rouissage du lin et son agent microbien. Compt. rend. Acad. Sc.*, 121-242, 1895.

(2) BEHRENS, J., *Untersuchungen über die Gewinnung der Hanffaser durch natürliche röstmethoden. Centralbl. f. Bakt.*, II Abt. Bd., 8, p. 114, 1902.

(3) STORMER, K., *Ueber die Wasserröste des Flachses. Centralbl. f. Bakt.*, II Ab., Bd. 13. p. 35, 1904.

(4) BEIJERINCK M. W., and VAN DELDEN A., *On the bacteria wich are active in flax-rotting. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Proceedings of the Section of Sciences.* Vol. VI, 2nd. part, July 1904.

encontramos que los bacilos descritos por estos distintos autores como causantes de la separación de las fibras, pueden ser todos referidos a la especie colectiva o grupo del *Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann. Aún en el caso del *Plectridium pectinovorum* de Störmer, anaerobio facultativo según su autor, es referido sin embargo por el mismo, a la especie descrita anteriormente por Winogradsky y Friebes, a pesar de diferenciarse de ésta también en características morfológicas, como el tamaño de los esporos.

Es indudable sin embargo, para cualquiera que haya trabajado con representantes de la especie *Bac. amylobacter*, que existen entre algunos de ellos diferencias bastante acentuadas como para permitir su separación en especies distintas. A pesar de ello, siguen considerándose por la mayor parte de los autores como formando parte de una sola especie, con evidente perjuicio de su exacto conocimiento. El extenso trabajo de Bredemann ⁽⁵⁾ sobre el *Bac. amylobacter*, ha contribuído seguramente a crear una mayor confusión sobre este asunto, por cuanto se han aceptado generalmente sus conclusiones sin someterlas a crítica alguna. Esperamos que no estará lejos el día en que se hará una revisión extensa de la especie de Bredemann, para precisarla y limitarla, sacándola de la ambigüedad y elasticidad actual. Por lo pronto, los trabajos de Donker y de McCoy y colaboradores han dado ya un paso decisivo en ese sentido, especialmente el primero, que ha instituído ya varias especies distintas, basándose en características fisiológicas.

En estos últimos tiempos, Carbone en Italia y Ruschmann y Bavendamm en Alemania ⁽⁶⁾, ⁽⁷⁾, ⁽⁸⁾, se han ocupado extensamente de las especies anaerobias que intervienen en el proceso de enriamiento por el método de sumersión. Como resumen de sus trabajos puede decirse que Carbone considera al *Bacillus*

(5) BREDEMANN G., *Bacillus amylobacter*. A. M. et Bredemann in *morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung.*, *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt. Bd., 23, p. 385, 1909.

(6) RUSCHMANN G., und BAVENDAMM W., *Zur Kenntnis der Röstereger Bac. felsineus Carbone und Plectridium pectinovorum (Bac. amylobacter A. M. et Bredemann).* *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt. Bd. 64, p. 340, 1925.

(7) IDEM., *Die Flachsröste mit Plectridium pectinovorum (Bac. amylobacter A. M. et Bredemann) und Bac. felsineus Carbone.* *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt. Bd. 65, p. 43, 1925.

(8) CARBONE D., *La macerazione industriale delle piante tessili col "Bacillus felsineus"*, 2ª ediz. Publ. per cura dell'Istit. Sierot. Milanese, 1926.

felsíneus, (nueva especie anaerobia descrita por él) como el único bacterio específico del enriamiento. Ruschmann y Bavendamm, atribuyen en cambio ese proceso en el lino, al *Plectridium pectinovorum*, forma I, considerada por ellos como una forma del *Bac. amylobacter* A. M. et Bredemann.

Como se verá por los datos que siguen, creemos que no está todavía agotada la lista de los bacterios anaerobios del enriamiento y que quedan aún muchas investigaciones que efectuar para completar los conocimientos de ese proceso, amén del trabajo que será indispensable desarrollar si es que quiere llegarse alguna vez a las aplicaciones industriales en gran escala a que el mismo se presta.

A fines del año 1926, ocupado en el estudio de las especies enriadoras del lino, y procediendo al aislamiento de la flora aerobia, he encontrado (como contaminación de una de las numerosas colonias de bacilos aerobios aisladas), un bacilo anaerobio absoluto, de forma plectridio al esporular, no coloreable por el yodo, que en cultivo puro se ha demostrado dotado de propiedades enriadoras, y distinto de todas las especies anaerobias enriadoras conocidas hasta el presente. En honor del Prof. Lucien Hauman, designamos este bacilo con el nombre de *Bacillus Haumanii* ⁽¹⁾.

La separación y el aislamiento de este bacilo en cultivo puro ha sido efectuado a mediados del año 1929 en ocasión de un estudio sobre el *Bacillus felsíneus* Carbone, uno de cuyos cultivos en forma de polvo, con el nombre de "Felsinozima" y conteniendo además según su autor, un "coco" y una levadura, me ha sido gentilmente entregada por el Dr. M. Conti, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Bs. Aires ⁽²⁾.

A continuación se detallan los métodos utilizados para el cultivo y las más importantes características del *Bac. Haumanii* ⁽³⁾.

(1) En una publicación anterior, este bacilo fué llamado provisoriamente "Plectridio amarillo". Véase S. Soriano, en el "Tomo conmemorativo del XXV aniversario de la fundación de la Facultad de Agronomía y Veterinaria". Buenos Aires; Imprenta de la Universidad. 1929.

(2) En este mismo número de la Revista aparece un trabajo de A. Sordelli y S. Soriano sobre el *Bac. felsíneus*.

(3) Las investigaciones llevadas a cabo sobre estos anaerobios enriadores, han sido efectuadas bajo la dirección del Prof. Dr. A. Sordelli en el Instituto bacteriológico del Dep. Nac. de Higiene.

MÉTODOS

En el trabajo de aislamiento se ha seguido en lo posible la técnica utilizada por Ruschmann y Bavendamm descripta en su publicación sobre el *Bac. felsineus* y el *Plectridium pectinovorum* (4). El aparato de anaerobios utilizado ha sido el de McYntosh y Fieldes.

Los aislamientos en medios sólidos fuera del aparato de anaerobios han sido efectuados utilizando el método de Liborius-Veillon en tubos con medio de cultivo repartido en alto estrato.

Para los cultivos en medios líquidos fueron empleados por una parte los tubos de Hall de bolita, los cuales dieron generalmente un excelente resultado. Han sido también utilizados tubos comunes con tapón de parafina líquida o sólida y además tubos simplemente repartidos con suficiente cantidad de líquido.

Para los ensayos de fermentación así como para obtener fácilmente un buen desarrollo en los medios líquidos, se agregó a éstos 0,3 % de gelosa con lo cual en frío se obtiene un medio semi-sólido muy favorable para el cultivo de anaerobios.

Los medios de cultivo empleados han sido los siguientes:

1. Agar de zanahoria (1.8 % de agar) (medio de Rochaix modificado (1)).
2. Agar blando de zanahoria (0,3 % de agar).
3. Jugo de zanahoria (alcalinizado).
4. Líquido de Speakman modificado. (Mc.Coy, Fred, Peterson y Hastings) (2).
5. Agar blando al líquido de Speakman (0,3 % de agar).
6. Gelatina al mosto de malta (15 % de gelatina).
7. Puré de papa.
8. Trocitos de lino (esterilizados a 110°).
9. Agar común glucosado (1 % de glucosa; 2 % de agar).

(4) *Loc. cit.* C. f. B. Bd. 64.

(1) Véase: ROCHAIX, *C. R. de la Soc. de Biol.*, t. LXXIV, pág. 694, 1913. RUSCHMANN, *Faserforschung*, t. I, pág. 78, 1921. SORDELLI A., et SORIANO S., *C. R. de la Soc. de Biolg.*, t. XCIX, núm. 32, pág. 1515, 1928. Una manera fácil de preparar este medio está descripta en este mismo número de la Revista del Instituto, página

(2) MC.COY, E. FRED, E. B. PETERSON, W. H. and HASTINGS, E. G., *A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. The Jour. of Infect. Diseases.* Vol. 39, núm. 6, p. 457, 1926.

Este último medio se ha utilizado para asegurarse de la pureza de los cultivos. Como el bacilo estudiado no desarrolla en este medio de cultivo, pueden ponerse rápidamente de manifiesto las infecciones. Se ha usado en placas de Petri y en tubos de Veillon.

Todos los medios enumerados han sido invariablemente hervidos en baño de María durante 15 minutos a media hora, antes de la siembra, para expulsar el oxígeno, asegurando en esta forma un mejor desarrollo de los anaerobios.

El agar blando se ha preferido sembrarlo una vez solidificado, entrando con una pipeta fina hasta el fondo del tubo; en esta forma se evita que la parte sembrada suba a la superficie y no se obtenga regular crecimiento, que es lo que sucede si se siembra antes de haber solidificado el agar.

Los demás medios se siembran con las precauciones acostumbradas para los anaerobios. En los casos en que se ha utilizado levadura para asegurar el desarrollo del anaerobio, se ha hecho uso de un cultivo en agar glucosado en estría de una levadura de vino cuya pureza está asegurada por un aislamiento de una sola célula según el método de Lindner. Un ansa del cultivo en el agar mencionado, se deslíe en la parte superior del tubo anteriormente sembrado en el fondo con el anaerobio, y se mezcla muy suavemente.

Debe tenerse especial cuidado, al sembrar los tubos, en no introducir alguna burbuja de aire con la pipeta, puesto que en ese caso, el crecimiento es siempre problemático.

En cuanto a la cantidad y a la clase de siembra, se han obtenido en general buenos resultados sembrando aproximadamente en proporción de 1:50. Una menor cantidad de siembra puede dar también buenos resultados, pero no es conveniente por su inseguridad.

El mejor medio para ser utilizado como siembra es un cultivo de 24-48 horas en agar blando de zanahoria, aunque pueden utilizarse también con éxito otros, como por ejemplo un cultivo en puré de papa de 24 horas.

El cultivo en agar blando de zanahoria ha sido obtenido generalmente sembrando un cultivo en puré de papa con levaduras: después de sembrar se pasteuriza por 10 minutos a 80° con lo cual quedan eliminadas las levaduras, o mejor se pasteuriza en un tubo aparte el cultivo en puré de papa a utilizar y luego se siembra el agar blando. Puede utilizarse también con este fin un cultivo de tubo de lino enriado agitando previamente

o separando bien las fibras con una pipeta cerrada y sembrando luego una parte del líquido con las precauciones mencionadas.

Con el objeto de estudiar el comportamiento de los cultivos que se han tenido entre manos y poder establecer algún posible parentesco entre ellos, han sido sometidos, por indicación del doctor A. Sordelli, al estudio de reacciones serológicas, efectuando reacciones de aglutinación cruzada.

Con ese fin fueron preparados 6 conejos, 2 para cada cultivo, tratándolos con los siguientes gérmenes:

1. Un ejemplar de *Bac. amylobacter*.
2. *Bacillus felsineus*.
3. *Bac. Haumanii*.

Las inyecciones endovenosas fueron aplicadas en la vena marginal de la oreja, día por medio, distribuídas en la siguiente forma:

1ª inyección: 0,5 cm.³ de una suspensión de un cultivo en jugo de zanahoria previamente centrifugado.

2ª inyección: después de 48 horas: 2 cm.³

3ª inyección: nuevamente después de 48 horas, se inyectan 4,5 cm.³ en tres porciones de 1,5 cm.³, con intervalos de 1 hora.

Después de 5 días se hacen sangrías de prueba y si se obtienen sueros suficientemente aglutinados, es decir de un título satisfactorio, como ha sucedido en los casos estudiados, se sangran a blanco los conejos, se separa el suero de la sangre y se conserva estérilmente, pudiendo agregarse 0,3 % de tricresol.

Las reacciones de aglutinación han sido efectuadas de acuerdo a los puntos que siguen:

a) El antígeno o suspensión bacteriana estaba constituido por un cultivo de 48 horas en jugo de zanahoria centrifugado y suspendido en agua fisiológica estéril;

b) Las diluciones del suero marchaban en progresión geométrica de 1/50 a 1/1600.

c) Se usaron para cada tubito 0,5 cm.³ de dilución de suero + 0,5 cm.³ de suspensión bacteriana.

d) Como control fueron utilizados para cada caso, 1º diluciones de suero de conejo normal, no inmunizado + suspensión bacteriana, y 2º agua fisiológica + suspensión bacteriana.

La disposición usada puede verse en el cuadro de la página 754.

CARACTERÍSTICAS DEL BACILO ESTUDIADO

El bacilo que nos ocupa es un anaerobio absoluto. No crece en contacto directo del aire y es bastante exigente en cuanto a medios de cultivo se refiere. No desarrolla en los medios de cultivo comunes a base de carne y con reacción alcalina, ni aun en los mismos glucosados o azucarados.

Sus dimensiones son, al estado joven, en cultivos de 24 horas en líquido de zanahoria, de unos $0,6-0,8 \mu \times 4$ a 8μ , y en agar de zanahoria de unos $0,7-0,9 \mu \times 3$ a 12μ (término medio $0,7-0,8 \mu \times 4$ a 10μ).

En tubos de lino, afecta la forma típica de un plectridio, que es también la que se observa al estado natural. La forma del bastoncito, en esas condiciones, es siempre recta y sus dimensiones oscilan entre $0,8-1 \mu \times 6-12 \mu$.

La disposición en líquido de zanahoria es siempre de individuos aislados o bien reunidos en 2 ó 3 elementos, nunca formando largas cadenas. En agar blando de zanahoria pueden observarse generalmente reunión de varios individuos formando cadenas cortas (en las mismas condiciones el *Bacillus felsineus* de Carbone suele formar algunas extensas y hermosas cadenas). En puré de papa, en agar de zanahoria al 1,8 % y en lino, aparece generalmente aislado.

En la forma bacilar es activamente móvil. La movilidad puede notarse muy bien cuando se observan con pequeño aumento (unos treinta diámetros) trozos de agar con colonias entre porta y cubre : cuando el agar se rompe partiendo por el medio alguna de las colonias, en el pequeño espacio puede verse el hormigueo continuo de los bastoncitos, los cuales a mayor aumento, se demuestran dotados de una activa movilidad. También se observan muy bien los bacilos móviles en jugo de zanahoria o en agar del mismo al 0,3 por ciento.

La formación de esporos se efectúa de preferencia muy bien en lino y también en papa. Difícilmente aparecen esporos o no se observan del todo, en jugo de zanahoria y en agar blando de zanahoria.

La situación del espora, que es una cuestión importante para la sistemática, parece ser constantemente terminal.

Un examen atento de la morfología del plectridio en los cultivos en lino, especialmente en preparaciones directas con

nigrosina, demuestra la existencia de una especie de "protuberancia" en la punta del esporo. Esta parte aparece, en las preparaciones en fresco, con líquido entre porta y cubre, como fuertemente refringente, y sea en esas condiciones o en los preparados coloreados comunes, podría interpretarse la situación del esporo como subterminal. La referida "protuberancia" se separa con el esporo, y éstos, al estado libre afectan la forma que aparece en las figs. 3 y 4 de la lámina XXVII, de manera que puede tratarse muy bien de una forma especial de la membrana esporígena (como los esporos de *Puccinia*, por ejemplo), en cuyo caso la situación del esporo es netamente terminal. La comparación de esta formación especial en el esporo de este bacilo, con la "cápsula" descrita por Winogradsky para su *Clostridium pasteurianum*, deberá ser objeto de un estudio más atento para establecer si se trata en este caso del mismo asunto o para determinar las diferencias existentes.

Nunca han sido observados esporos en posición central o subcentral, que es la situación más común citada para el *Bacillus amylobacter*. La porción del bacilo en que se encuentra el esporo queda siempre ensanchada por éste, de manera que el ancho del esporo es siempre superior al del resto del cuerpo del bacilo.

Las dimensiones del esporo, medido en cultivos de lino, son como término medio de muchas determinaciones, de $1,6 \mu \times 3 \mu$, oscilando en general entre unos $1,5-1,7 \mu \times 2,7-3,3 \mu$.

La coloración con yodo empleando líquido de Lugol, es también en este caso un asunto de la mayor importancia. Los cultivos observados en fresco sólo presentan gránulos coloreables en amarillo en el cuerpo del bacilo, y no se observan porciones teñidas en azul como han sido descritas para el *Granulobacter pectinovorum* y son comunes para el *Bacillus amylobacter*.

Los cultivos del *plectridio* que nos ocupa, tratados en idéntica forma que un cultivo de "amylobacter" y otro de *Bac. felsineus*, siempre en esas condiciones el "amylobacter" ha resultado teñido de azul completa o intermitentemente, así como aunque de manera distinta y en algunas condiciones especiales el de *Bacillus felsineus* (hecho que parecerá extraño por lo que de este bacilo se conoce y que nos ha llamado poderosamente la

atención) ⁽¹⁾, mientras que el *Bac. Haumanii* únicamente se ha coloreado en porciones amarillentas. En algunos cultivos jóvenes, en jugo de zanahoria se han observado uno o dos puntos solamente en todo el cuerpo bacilar como coloreados de azul débil, pero cambiando apenas el enfoque del microscopio desaparece la coloración para presentarse un gránulo refringente incoloro; sólo se trata, pues, posiblemente, de un defecto de observación.

La coloración por el método de Gram es otro asunto de difícil interpretación. En cultivos muy jóvenes aparece netamente como Gram positivo, pero en cultivos de varios días y en la forma plectridio aparece como Gram negativo. Puede observarse muy bien la coloración Gram positiva en cultivos muy jóvenes en agar de zanahoria, especialmente si se utiliza el método de Kopeloff. Ya en cultivos de 24 horas, en agar ácido de zanahoria ($\text{pH} \pm 6,5$), se encuentran muy pocos elementos Gram positivos. De manera idéntica a lo que sucede con los representantes del *Bac. amylobacter* y del *Bac. felsineus*, el plectridio estudiado creemos que debe ser considerado como Gram positivo.

El desarrollo en tubos de agar de zanahoria (agar al 1,8 %), es bien característico: antes de 24 horas ya pueden observarse en el agar y a partir de 1/2 a 1 centímetro más o menos de la superficie, puntitos aislados que constituyen las colonias. Alrededor de las 24 horas, la producción de gases llega a formar pequeñas burbujas lenticulares y en seguida el agar comienza a fragmentarse y a ser levantado en parte hasta la boca del tubo de ensayo donde generalmente hace saltar los tapones entre 24 y 48 horas según la intensidad del desarrollo.

No es raro encontrar los primeros tubos, de una serie de diluciones sucesivas, con los tapones saltados a las 24 horas, y los restantes en la misma forma a las 48. A los pocos días, a veces, aunque raramente desde el principio, se notan las colonias coloreadas de amarillo canario intenso, color que difunde a través del medio y le da un tono característico. El color amarillo puede notarse muy bien cuando el agar ha tocado el algo-

(1) No se trata, como podría parecer, de una infección de los cultivos con formas de *Bac. amylobacter*, pues las siembras en agar de zanahoria (medio muy favorable también a este último bacilo), nunca han permitido revelar la más mínima presencia de este germen, obteniéndose sólo colonias rosadas características de *Bac. felsineus*.

dón mojóndolo en parte, en cuyo caso éste se colorea de amarillo apareciendo como teñido en esas partes con una solución de ácido pícrico.

Cuando los tubos se conservan un tiempo, puede notarse que la coloración de las colonias se intensifica poco a poco y aparece en fin de color rojizo (muy diferente del color rosado que toman las colonias de *Bac. felsíneus* en este mismo medio de cultivo).

La forma de las colonias en agar de zanahoria es generalmente lenticular, de bordes netos, siendo las más frecuentes las que ilustran las láminas XXVI, fig. 1, y XXVIII, fig. 1. No es raro encontrar colonias de tipo ramificado, como las de *Bac. amylobacter*, especialmente cuando las siembras son abundantes (véase lámina XXVI, fig. 2), pero lo más frecuente, al menos en este medio de cultivo y cuando las colonias están bien separadas, es la forma de los bordes, generalmente bien delimitados. El color es, como hemos mencionado, amarillo canario en un principio y con el tiempo aparece de rojizo ladrillo.

En agar blando de zanahoria, se produce en 24 horas un fuerte enturbiamiento hasta una franja de unos milímetros de la superficie, y se verifica desprendimiento gaseoso lento pero continuo, que sigue por varios días (3 ó 4) y luego cesa poco a poco. En este medio de cultivo, en tubos conservados, puede observarse entre 1 y 2 semanas una hermosa coloración rojiza característica, debida posiblemente a una transformación del pigmento amarillo inicial. El *Bac. felsíneus* no forma en estas mismas condiciones sino una muy débil coloración rosada y el cultivo de unos días se aclara como por el efecto de una lisis.

En jugo de zanahoria neutralizado se produce en 24 horas enturbiamiento uniforme que aumenta algo a las 48 horas. La parte de líquido situada sobre la bolita de vidrio en los tubos de Hall no se enturbia en 24 horas como sucede con un cultivo de "*amylobacter*" o con *Bac. felsíneus*, los cuales por su desprendimiento gaseoso más intenso hacen posible también esa parte del líquido para el desarrollo de anaerobios.

Las burbujas de gas son pequeñas y no se forma espuma persistente, pudiéndose observar tan sólo una cámara de gas debajo de la bolita y una pequeña corona de burbujitas en la superficie del líquido enturbiado. A los pocos días cesa el desarrollo y el cultivo va aclarándose aunque con lentitud.

La acidez formada es mucho menos abundante que en los cultivos de "*amylobacter*" y de *felsíneus*.

El desarrollo en agar blando de Speakman glucosado es semejante al que se verifica en agar blando de zanahoria, aunque menos intenso.

En este medio no se produce la formación del pigmento amarillo, el cual puede ser observado en parte si en lugar de glucosa se utiliza lactosa con substancia hidrocarbonada.

En líquido de Speakman con un hidrato de C. favorable se produce enturbiamiento y desprendimiento de gases.

Para la fermentación de los hidratos de carbono y otras substancias carbonadas, se ha empleado agar blando de agua de levadura, con indicador, preparado con agua de levadura autolizada y fermentada con *Saccharomyces cerevisiæ* por 24 h. para destruir todo resto de substancia fermentesible, y agregando al filtrado límpido obtenido haciéndolo pasar por pasta de papel, 0,3 de agar y 0,016 ‰ de indicador. La reacción ha sido arreglada a pH 6,5 y el indicador usado fué el Cromo cresol púrpura. En estas condiciones, el *Bac. Haumanii* fermenta, con formación de ácido y gas, las siguientes substancias:

amigdalina	glucosa	sacarosa
salicina	leoulosa	maltosa
manita	manosa	lactosa
arabinosa	galactosa	y rhamnosa
xilosa		

y no fermenta:

arabita	rafinosa
dulcita	inulina
sorbita	y almidón.
inosita	

En el último medio mencionado, así como con rafinosa, se obtiene un cierto desarrollo algo mejor que el de los controles, pero pronto se interrumpe y no continúa. La reacción queda algo modificada. Consideramos este comportamiento como la resultante del contenido de pequeñas cantidades de otras substancias fermentescibles en las soluciones de rafinosa y almidón empleadas. Además de almidón soluble se ha probado también almidón común de arroz en engrudo, con idéntico resultado.

Los tubos controles sin azúcares, así como los negativos, han iniciado siempre un leve desarrollo, con formación de algunas burbujas de gas, pero bien pronto se ha interrumpido y no han alterado casi la reacción.

Los tubos fermentados viran netamente al amarillo el cromo cresol púrpura, y colorean de más o menos rojo el rojo de metilo (pH menos de 4,5).

En gelatina de mosto de malta, a temperatura del laboratorio, se verifica desarrollo lento que en unos días se denota por la formación de gases y fragmentación de la gelatina. No se produce licuación ni aun después de meses de observación.

A estufa a 37° la producción de gases es ya evidente en 24 horas; enfriando el cultivo, la gelatina vuelve a solidificar. Repitiendo esta operación después de varios días, cuando ya no se verifica desprendimiento gaseoso y cuando la gelatina se ha clarificado con formación de depósito, siempre se obtiene solidificación por el enfriamiento.

En las mismas condiciones el *Bac. felsineus* licúa la gelatina en 24 horas a 37° y en 48 a temperatura del laboratorio.

El desarrollo en tubos de puré de papa es muy característico, especialmente desde el punto de vista de la formación del pigmento amarillo. En 24 horas a 37° se produce buen desarrollo con desprendimiento gaseoso lento. La papa no es arrastrada a la superficie formando "sombrero" como en el caso del *felsineus*; en general queda depositada en la parte inferior del tubo. A las 24 horas puede observarse una leve coloración amarilla que resulta ya bien evidente a las 48 horas. Con el tiempo el color se intensifica un poco acercándose al anaranjado, pero nunca se forma como en agar blando de zanahoria el color rojizo ladrillo mencionado anteriormente.

Los cultivos en puré de papa son bien característicos tanto para el *B. felsineus* (véanse los trabajos de Carbone, de Ruschmann, etc.) como para el *B. Haumanii* y pueden servir sin lugar a dudas para diferenciar netamente estos dos gémenes de una manera rápida.

Sembrando los tubos de papa en simbiosis con levadura, el desarrollo es más manifiesto y vigoroso, el enturbiamiento más fuerte, y la formación de pigmento algo más acentuada.

La siembra de este bacilo en fragmentos de lino esterilizado, conjuntamente con levaduras, por la comodidad de trabajar en contacto del aire, produce en 24 horas la formación de burbujas gaseosas bajo la epidermis del tallo, las cuales aparecen levantándola en algunos puntos. Los trozos de tallo son levantados por estas burbujas flotando en el seno del líquido. Se verifica además un lento desprendimiento gaseoso por pequeñas burbujitas que llegan a la superficie del agua.

A las 48 horas a 37° si se examina uno de estos tallitos desde el punto de vista de la separación de la fibra, se encuentra que éstas pueden desprenderse sin dificultad a lo largo del tallo: el cemento péctico ha sido atacado y las fibras no oponen ya resistencia a su separación (fig. 3, lám. XXVI). Queriendo trabajar en cultivos absolutamente puros, para descartar la acción de la levadura que por otra parte puede ser establecida con distintos controles, es necesario entonces hacerlo al abrigo del aire, en aparato de anaerobiosis.

En unos 3 días se completa la acción de disolución sobre las fibras, dependiendo el mayor o menor tiempo y la mayor o menor perfección del trabajo, de múltiples factores, como la cantidad de siembra, la relación del agua a la parte sólida, la temperatura, la reacción del medio, etc., factores todos estos que requieren un examen minucioso y que deben ser objeto de ensayos especiales para poder resolver con éxito el problema de la posible aplicación industrial de este bacilo.

Como se ve, el poder enriador, es decir la facultad de separar las fibras de los vegetales textiles, queda para este pleotridio anaerobio, claramente establecido por su acción, en cultivo puro (o asociado con levadura), sobre los tallos de lino, según se acaba de mencionar. Es importante mencionar por otra parte, que, a semejanza de los demás bacilos enriadores, este germen no es activo sobre la celulosa, no atacando la integridad de las fibras.

La propiedad de no presentar desarrollo en el agar común glucosado ha podido servir en diversas ocasiones durante todo el curso de esta investigación, para establecer la pureza de los cultivos empleados. En los ensayos más importantes o bien cuando se sospechaba alguna infección, se han preparado paralelamente tubos de Veillon de agar de zanahoria y de agar común glucosado y además placas de Petri con este último medio de cultivo. La presencia de desarrollo en los tubos o en las placas de agar glucosado ponían de manifiesto rápidamente alguna posible contaminación exterior, ya sea de un germen anaerobio o aerobio respectivamente, cultivable en este medio.

En esta forma ha sido posible mantenerse a cubierto, en todos los cultivos, de los errores causados por introducción de algún otro germen extraño.

Las reacciones de aglutinación que han sido efectuadas para tratar de diferenciar el *Bac. Haumanii* del *Bac. felsineus* y de un ejemplar de *Bac. amylobacter*, han dado resultados po-

sitivos. En el cuadro adjunto, se inserta el ensayo de uno de los sueros obtenidos.

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

Suero de conejo núm. 1095, tratado con *Bacillus Haumanii*

	Tubos con S. aglutinante					Controles	
						S. nor.	Fisiol.
Dilue. del suero	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/50	—
Cantidad usada cm. ³	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Suspens. bacteriana cm. ³ . . .	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dilución final, resultante	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/100	—

2 horas estufa a 37°

Resultados — Aglutinación

Con susp. de <i>Bac. Haumanii</i>	++++	++++	++++	+++	++	—	—
» » » <i>amylobact</i> . . .	—	—	—	—	—	—	—
» » » <i>felsineus</i>	—	—	—	—	—	—	—

NOTA — El suero de conejo normal, como control, se usa a la dilución de 1/50.
— Las indicaciones siguientes significan: +++++: aglutinación muy fuerte; ++++: aglutinación fuerte; ++: buena aglutinación; +: aglutinación visible; —: no se observa aglutinación.

CONCLUSIONES

Según se ha visto en el primer capítulo de este trabajo al pasar revista a los distintos bacilos señalados en la bibliografía como causantes de la separación de las fibras vegetales, quedando siempre en el grupo de los anaerobios, éstos aparecen representados, por una parte por especies del grupo del *Bac. amylobacter*, coloreables en azul con el yodo, tales son el bacilo de Winogradsky-Fribes, el *Granulobacter pectinovorum* de Beijerinck y van Delden, el “*Clostridio*” de Behrens, el *Plectridium pectinovorum* de Störmer y el *Bac. amylobacter* licuante de la gelatina mencionado por Ruschmann y Bavendamm. Por otra parte figura el *Bacillus felsineus* de Carbone con distintas características.

En el presente trabajo ha sido posible disponer de un cultivo puro de *Bac. felsineus* aislado de “Felsinozima” en el laboratorio del doctor Sordelli, seguramente libre de la presencia del “coco” (cosa que según manifestaciones del mismo Carbone

aun no ha podido realizar), y en consecuencia han podido establecerse entre ese bacilo y el *Bac. Haumanii* estudiado, una serie de comparaciones colocándolos en condiciones idénticas, llegando a establecer entre ambos una perfecta diferenciación, que hace considerarlos como especies seguramente distintas. Las más importantes diferencias entre estos dos bacilos pueden anotarse como sigue:

1º. Morfológicamente, las dimensiones de los bacilos esporulados, así como las de los esporos y la forma del esporo libre, puede ser utilizado como un buen índice para la diferenciación.

2º. El *Bac. felsineus* Carbone es productor de un pigmento anaranjado y se desarrolla generalmente en forma de zooglea mucosa, características ambas bien relevables en los cultivos en puré de papa, mientras que el *Bac. Haumanii* produce un pigmento amarillo difusible (característico en agar de zanahoria y especialmente en papa) y da un desarrollo sin consistencia mucosa.

3º. La forma de la colonia del primero, en tubos profundos de agar de zanahoria, es esférica y algodonosa (y de color rosado), siendo la del segundo de tipo lenticular, con bordes netos o irregulares (y de color amarillo canario) en el mismo medio de cultivo.

4º. El *Bac. felsineus* licúa rápidamente la gelatina de malta mientras que el *Bac. Haumanii* no es licuante de la gelatina.

5º. Serológicamente, tanto el *Bac. felsineus* como el *Bac. Haumanii* no son recíprocamente aglutinables.

En cuanto a los enriadores del grupo del *Bac. amylobacter*, pueden establecerse las semejanzas y diferencias que se anotan a continuación, comparando sus descripciones (en lo posible las originales), con las características del bacilo que nos ocupa:

1º. La forma típicamente plectridio es una característica común para ambos.

2º. La coloración con el yodo parece faltar para el *Bac. Haumanii*.

3º. La licuación de la gelatina es negativa para el bacilo estudiado y positiva, según las afirmaciones de Beijerinck y van Delden y de Ruschmann, para el grupo del "*amylobacter*" dotado de poder enriador.

4º. La presencia de un pigmento amarillo difusible es únicamente aparente en el *Bac. Haumanii*.

Los resultados de los ensayos serológicos que se han efectuado con el fin de establecer las semejanzas o el grado de diferencia entre los dos bacilos enriadores que se han tenido entre manos (el *Bac. felsineus* y el *Bac. Haumanii*), y un ejemplar del grupo del *Bac. amylobacter*, quedan evidenciados en el cuadro ya mencionado.

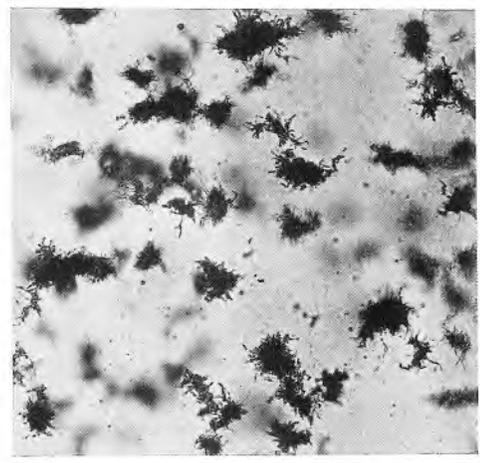
Según indica claramente el ensayo transcrito, el suero de un conejo inmunizado con cultivos de *Bac. Haumanii* sólo resulta aglutinante para este bacilo y no aglutina, paralelamente, ni al *Bac. felsineus* ni a un ejemplar de "*amylobacter*".

Por otra parte, los sueros de conejos inmunizados con *Bac. felsineus*, no aglutinan en lo más mínimo al *Bac. Haumanii*, comportándose en idéntica forma los sueros de conejos preparados con el ejemplar de "*amylobacter*".

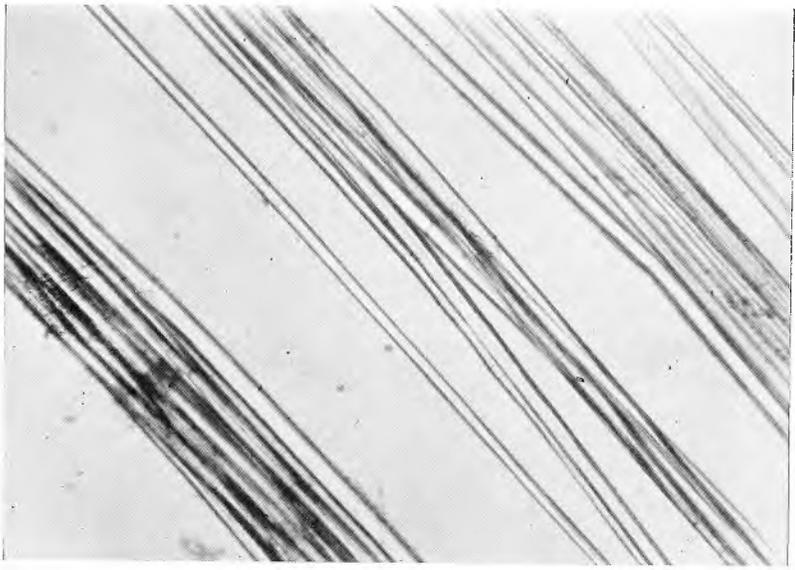
Como se vé, el plectridio estudiado queda serológicamente separado con nitidez de los otros dos gérmenes con los cuales se lo ha comparado. Desde el punto de vista de las reacciones serológicas pueden hacerse interesantes comentarios referentes a la sistemática del grupo del *Bacillus amylobacter* tal cual ha sido establecido por Bredemann, extensivas probablemente a todos los fermentos butíricos, pero el carácter de este trabajo, especialmente referido como comunicación de un bacilo determinado, aconseja dejarlo para una mejor ocasión donde pueda tratarse con mayor abundancia de material demostrativo.



1



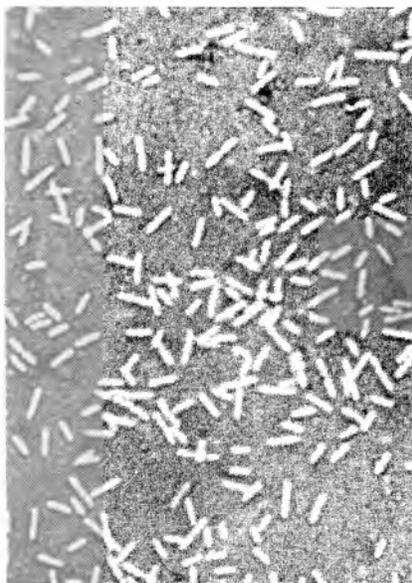
2



3



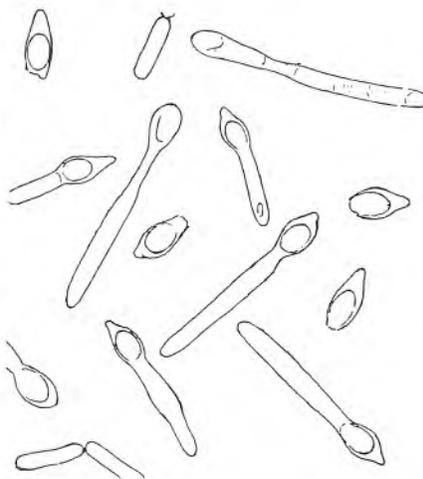
1



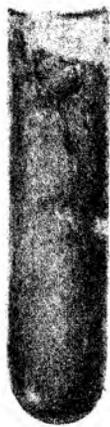
2



3



4



J. BASTANIER, PINX.

HEBER, SCP.

EXPLICACION DE LAS LAMINAS

LÁMINA XXVI.

- Figs. 1, colonias de *B. Haumanii* en agar de zanahoria, (X 50).
„ 2, ídem en el mismo medio muy fuertemente sembrado.
„ 3, fibras de lino separadas por acción del *B. Haumanii*.

LÁMINA XXVII.

- Figs. 1, cultivo de *B. Haumanii* de 2 días en agar de zanahoria, coloración de Gram, (X 1.400).
„ 2, ídem, sin coloración, con fondo de nigrosina (mismo aumento).
„ 3, plectridios y esporos sueltos, de un cultivo en lino, (preparación con fondo de nigrosina), (X 1.100).
„ 4, detalle de los mismos, dibujados con cámara clara, (X 2.500).

LÁMINA XXVIII.

- Figs. 1, colonias de *B. Haumanii* en agar de zanahoria.
„ 2, cultivo de *B. Haumanii* en papa.