
REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLOGICO
DEL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

Contribución al estudio
fisiológico y sistemático de algunas
Chlamydobacteriales

(con 5 figuras y 9 láminas)

Por MARIA S. CATALDI (*)

INTRODUCCIÓN

Aun cuando la idea primitiva que originó la presente contribución era la de efectuar exclusivamente el estudio sistemático de algunas *Chlamydobacteriales*, bien pronto se pudo ver que al evidente desorden de su sistemática se sumaba la falta de precisión de su discutida fisiología.

Fué por ello preciso encauzar el trabajo hacia la elucidación de estos fundamentales interrogantes.

(*) La autora cumple un deber en expresar aquí su agradecimiento al Profesor Dr. ALFREDO SORDELLI por las grandes facilidades que tuvo a bien acordarle en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene para la realización de las experiencias, el interés con que ha seguido la marcha de las mismas y el constante aliento que han significado sus numerosos consejos. Al Profesor Ing. Agr. SANTOS SORIANO, por la elección del tema, su asistencia en la dirección y ejecución del trabajo y la enseñanza de los métodos y técnicas que permitieron conseguir los resultados obtenidos. Queda también agradecida al Dr. S. LAJMANOVICH y al Dr. C. NOGUÉS por haber colaborado en la revisión y corrección del texto original.

Entregado para publicarse en junio de 1939.

En efecto, a la mayoría de ellas se las ha ubicado en el grupo de las bacterias *autótrofas*, es decir, capaces de obtener energía para su metabolismo de ciertas sustancias inorgánicas, sin que hasta el presente existan pruebas decisivas para justificar plenamente (para muchas de ellas) ni siquiera su inclusión como bacterias *autótrofas facultativas*.

La ausencia de poder patógeno y la falta de toda aplicación industrial ha contribuido para que este grupo de bacterias, a pesar de que su descubrimiento data de la primera mitad del siglo pasado, se haya estudiado muy poco, hasta tal punto, que en los momentos actuales aún no se posee un medio eficaz de enriquecimiento para cultivarlas « in vitro » y llegar así a la obtención de cultivos puros, indispensables para poder intentar con algunas probabilidades de éxito la solución de esta interesante cuestión.

Cabe hacer notar, sin embargo, el impulso dado en los últimos años al estudio de algunas *Chlamydobacteriales* como precipitadoras del hierro por creerlas agentes principales de la formación de concreciones en las cañerías de aguas corrientes. Con tal motivo se publicaron una serie de trabajos pero ninguno aclara el oscuro problema de su fisiología.

En esta investigación se ha encarado el estudio de las *Chlamydobacteriales* desde un punto de vista puramente general cual conviene a la Bacteriología como disciplina de las Ciencias Naturales, y para cumplir dicho propósito se ha procedido de acuerdo al siguiente plan:



- 1°) Encontrar un medio de cultivo que permita enriquecer de una manera rápida y segura los cultivos de estas bacterias.
- 2°) Buscar un método para la obtención de cultivos puros.
- 3°) Estudiar en detalle las cepas aisladas, describirlas e intentar su clasificación.
- 4°) Establecer cuáles son las características que bastan para la misma.
- 5°) Demostrar el rol que juega el hierro y el manganeso en el metabolismo de estas bacterias.
- 6°) Determinar sus principales características fisiológicas y comprobar su capacidad autotrófica.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

KÜTZING⁽¹⁵⁾ (1833) describió una forma bacteriana filamentosa a la que dió el nombre de *Sphaerotilus natans*. Más tarde agregó a ese género dos nuevas especies: *Sphaerotilus thermalis* y *Sphaerotilus lacteus*.

EHRENBERG⁽¹³⁾ (1836) describió un organismo con el nombre de *Gaillonella ferruginea* que incluyó en el grupo de los infusorios con envoltura silíceas, es decir, dentro de las *Diatomeas*. Según él, este microorganismo se encuentra en forma de filamentos entrelazados que se colorean de color ocre por el hidróxido de hierro. Más tarde, el nombre genérico de *Gaillonella* fué sustituido por el de *Gaillonella*, que actualmente es el que está más generalizado.

KÜTZING⁽¹⁶⁾ (1843) en su « *Phycologia generalis* » describió una bacteria filamentosa que creyó era una alga y le dió el nombre de *Leptothrix ochracea*. Este género en esa época pertenecía a la algología.

Actualmente se sabe que este microorganismo es una rarísima bacteria que suele asociarse en largas cadenas presentando la particularidad de poseer una vaina mucilaginosa que rodea a los filamentos celulares y que está impregnada por hidróxido férrico.

COHN⁽⁸⁾ (1870) da el nombre de *Crenothrix polyspora* a un organismo descrito por él en forma de filamentos muy desarrollados que al estado joven son incoloros y al envejecer coloréanse de color herrumbre. De sus estudios, COHN dedujo que este color herrumbre era debido al hidróxido férrico que se deposita en sus vainas como producto de su metabolismo, a semejanza de lo que ocurre en las *Meloheciaceas* con el carbonato cálcico.

Este mismo autor en 1875⁽⁹⁾ describió una bacteria filamentosa con el nombre de *Cladothrix dichotoma*, caracterizada por sus falsas dicotomías y sus vainas incoloras; vive en aguas de pantano pegadas a las algas y es muy semejante a las *Leptothrix* incoloras.

ZOFF⁽³⁶⁾ (1882), estudiando la *Crenothrix polyspora*, rebatió los resultados de COHN llegando a la conclusión de que la coloración de las vainas es debido a la deposición mecánica de las sales de hierro disueltas en el agua igual que lo que ocurre con la gelatina cuando se la une artificialmente con soluciones colorantes.

WINOGRADSKY⁽³¹⁾ (1888) estudió por primera vez en forma com-

pleta a estos organismos y les dió el nombre de *ferrobacterias* o *bacterias del hierro*, por su marcada afinidad con este metal.

Comparándolas con las bacterias del azufre observó WINOGRADSKY que son capaces de vivir en ausencia absoluta de materia orgánica. Posteriormente en 1891 ⁽³²⁾ descubrió las bacterias de la nitrificación que exigen las mismas condiciones que las anteriores y las agrupó bajo la denominación conjunta de *bacterias autótrofas*, es decir, « bacterias que efectúan la síntesis de la materia carbonada de su protoplasma a partir del anhídrido carbónico del aire utilizando como fuente de energía la oxidación de sustancias inorgánicas ».

Con este grupo de bacterias WINOGRADSKY inicia un interesante y discutido capítulo en Bacteriología. Utilizó para sus estudios *Leptothrix ochracea*, la más difundida de las bacterias de este grupo. Las cultivó en un medio de enriquecimiento a base de heno hervido e hidróxido férrico con el que obtuvo desarrollo de filamentos de bacterias del hierro en gran cantidad.

Colocando estos filamentos entre porta y cubreobjetos y haciéndoles circular corrientes de líquidos con diversas sales en solución, encontró que estas bacterias eran capaces de vivir y desarrollarse a expensas de carbonato ferroso. Observó también la relación que hay entre la oxidación del hierro y la vida de la célula. Para esto tomó vainas jóvenes ya coloreadas, las decoloró por acción del anhídrido carbónico, luego agregó agua con carbonato ferroso en solución y vió que sólo se coloreaban las partes de las vainas en cuyo interior se encontraban aún células vivas.

Por la propiedad de oxidar sustancias agrupó en 1922 ⁽³³⁾ estas bacterias con las del azufre y las de la nitrificación que igualmente la poseen, bajo el nombre de « *anorgoxidantes* ».

BÜSGEN ⁽⁷⁾ (1894) cultivó y aisló *Cladothrix dichotoma* en un medio líquido compuesto por extracto de carne y agua, solidificado con poca cantidad de agar.

MACÉ ⁽²⁰⁾ (1897) estudió los caracteres morfológicos de *Cladothrix dichotoma*, pero sus conclusiones no son muy aceptadas, pues confunden la compleja nomenclatura de este grupo de gérmenes.

SCHORLER ⁽²⁷⁾ (1904) describió una bacteria filamentosa con falsas ramificaciones cuyos filamentos son fijos en su base, sus vainas están constantemente impregnadas de sales de hierro y manganeso y se reproducen mediante gonidios móviles. La denominó *Clonothrix fusca*.

RÖSSLER ⁽²⁶⁾ (1906) aconsejó cultivar la *Crenothrix polyspora* en un medio formado por: trocitos de tejas de un centímetro y medio de superficie, esterilizados, y sumergidos en una solución de sulfato

ferroso muy diluída (1:5000) igualmente estéril. Este autor manifiesta que el desarrollo comienza después de unos días de haber sembrado al agua a investigar y a las pocas semanas cubre completamente los trozos.

ADLER ⁽¹⁾ (1909) describió a *Cladothrix dichotoma* y *Leptothrix ochracea* cultivadas en un medio de citrato de hierro y amonio al 0,05 %.

MOLISCH ⁽²²⁾ (1910), estudiando las bacterias del hierro, consiguió aislar la *Leptothrix ochracea*, al estado puro, utilizando para ello un medio absolutamente orgánico a base de mangano-peptona, agua de turba y gelatina. Cultivó además esta bacteria con solución muy concentrada de peptona y sin sales de hierro ni manganeso.

De estos resultados dedujo MOLISCH que tales bacterias pueden utilizar para la síntesis de su protoplasma materia orgánica a igual que todas las demás bacterias y que por lo tanto la utilización de las sales de hierro no es absolutamente indispensable.

Objetó la teoría de WINOGRADSKY respecto a la oxidación de sustancias inorgánicas y manifestó que *Leptothrix ochracea* es un organismo especialmente exigente en peptona. Además observó que son igualmente capaces de oxidar las sales manganosas o mangánicas, siendo este resultado de suma importancia puesto que las sales manganosas son relativamente más estables que las ferrosas.

A pesar de estos estudios, LIESKE ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ (1911-1919) publicó dos trabajos cuyos resultados se muestran abiertamente a favor de la teoría de WINOGRADSKY. Sin embargo LIESKE, al igual que MOLISCH, obtuvo desarrollo con agua de peptona y sin hierro, pero al intentar obtener cultivos puros con el medio de MOLISCH (manganopeptona, agua de turba y gelatina) consiguió un solo cultivo puro de *Leptothrix ochracea*. Más tarde, y después de mucho insistir, no le fué posible obtener este resultado aún encargando la experiencia a otras personas para evitar toda influencia personal. LIESKE explicó tal fracaso con la hipótesis de que tal vez la *Leptothrix ochracea* sólo fuera capaz de reproducirse durante una fase especial de su crecimiento, la que probablemente no estuvo presente en los cultivos que no desarrollaron.

Después de numerosas y prolijas experiencias LIESKE consiguió un medio favorable al desarrollo de *Leptothrix ochracea* compuesto de agar agua y acetato de manganeso.

Para sus ensayos utilizó LIESKE material de fuentes ferruginosas naturales de la mayor pureza posible. No consiguiendo obtener cultivos puros usando medios de enriquecimientos, debido a las infecciones.

Con cultivos puros LIESKE estudió la fisiología de *Leptothrix ochracea* intentando cultivarla en medios minerales.

De estos ensayos obtuvo desarrollo sólo cuando partía de los tubos de agar. Al querer transplantar de un medio mineral a otro, los resultados eran negativos. LIESKE atribuía estos fracasos a una causa desconocida común a todos los ensayos hechos con cultivos puros. Estudió también la influencia del anhídrido carbónico en el metabolismo de estas bacterias llegando a la conclusión de que éste posiblemente juegue un rol importante en el crecimiento de estas bacterias, pero no alcanza a afirmar que pueda ser asimilado.

Consiguió aislar *Gallionella ferruginea* en un medio mineral y purificarla por trasplantes sucesivos hasta obtener, según él, cultivos puros con este método.

ZIKES⁽³⁵⁾ (1915) publicó una monografía sobre *Cladothrix dichotoma* y *Sphaerotilus natans*. Este autor considera ambos géneros como diferentes, y en su trabajo hace una descripción morfológica y fisiológica de los mismos. Sus conclusiones no son muy convincentes; además considera a *Cladothrix dichotoma* como una bacteria que puede almacenar hierro en sus vainas pero que no puede considerarse una típica bacteria del hierro.

Apoyando las conclusiones de WINOGRADSKY y objetando algunas de LIESKE, en 1926 apareció una monografía de CHOLODNY⁽¹⁰⁾, que es sobre todo un trabajo de recopilación sobre los conocimientos tenidos hasta esa época respecto a este grupo de bacterias. Es interesante hacer resaltar de dicha monografía, la parte que se refiere a *Gallionella ferruginea*, tenida hasta entonces como una bacteria filamentosa del orden de las *Chlamydobacteriales*. Este autor consigue demostrar que estos filamentos son productos de excreción y oxidación de una pequeña bacteria de forma arriñonada que se encuentra en la punta de los mismos.

Otros autores que se ocuparon de los estudios y descripción de las bacterias del hierro fueron: el mismo CHOLODNY, que describió *Leptothrix trichogenes*, SCHWERS, *Megalothrix discophora* (*Leptothrix crassa* de CHOLODNY), y MOLISCH, *Leptothrix sideropous*.

Tal es el estado en que se encuentra el estudio de las bacterias del hierro en el año 1928 cuando WINOGRADSKY⁽³⁴⁾ hace una publicación, la cual es una revisión de los trabajos publicados hasta esa fecha, criticando a los autores que como MOLISCH no aceptan la autotrofia de las bacterias del hierro.

BERGER⁽³⁾ (1936) describió una nueva especie, *Leptothrix echinata* caracterizada por su pronunciada capacidad de almacenar manganeso.

DORFF ⁽¹²⁾ (1934-1935) publica una monografía dividida en dos secciones: una de ellas se refiere a la sistemática de las bacterias del hierro, y la segunda a la distribución, acción e importancia de las mismas en la naturaleza. Las investigaciones personales de DORFF comprenden sobre todo observaciones microscópicas de algunas de las formas descritas y el estudio más detenido de ciertas formas que aun teniendo afinidad por el hierro no pertenece al orden de las *Chlamydobacterales*.

Merece citarse también un gran número de trabajos consultados, debidos a técnicos en bacteriología de agua, pero la mayoría de ellos no son más que descripciones confusas de estas bacterias, y se ocupan muy poco de su fisiología. El más completo de ellos es el de BEGER (1937), que es una recopilación de notas morfológicas, fisiológicas y sistemáticas de este grupo de bacterias.

CAPITULO II

METODOS DE ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO

1) MATERIAL

Para la realización de estas investigaciones bacteriológicas, se ha tratado de ensayar material proveniente de orígenes diversos para establecer, en lo posible, la relación entre la vida de estas bacterias y su « habitat ».

Las distintas muestras fueron tomadas en recipientes estériles y transportadas al laboratorio en cámaras frigoríficas, siempre que ha sido necesario, para evitar la pululación de otras formas bacterianas.

Sin excepción fueron analizadas todas las muestras el día de llegada al laboratorio, constando el análisis primeramente de un examen microscópico y macroscópico directo y luego se sembraron en diversos medios de cultivo.

La nómina de las muestras figura en el cuadro N° 7, agregado al apéndice, págs. 74 a 76.

2) ENRIQUECIMIENTO

Como en la mayoría de los materiales que se utilizaron, las bacterias filamentosas se encontraban en poca cantidad, fué necesario recurrir a los cultivos de enriquecimiento en medio líquido para poder intentar luego el aislamiento en medios sólidos. Los inconvenientes que presentaron dichos cultivos se detallarán a continuación:

Los primeros métodos intentados para el desarrollo en cultivos de enriquecimiento fueron el medio mineral de LIESKE ⁽¹⁸⁾, el de hidróxido férrico de WINOGRADSKY ⁽³¹⁾ y el medio de citrato de hierro y amonio de ADLER ⁽¹⁾, en sus fórmulas originales y con algunas variantes. De estos medios, el mineral de LIESKE fué abandonado, pues a pesar de los múltiples ensayos que se hicieron, nunca pudo obtenerse ni siquiera comienzo de desarrollo. En cuanto al medio con citrato de hierro y amonio se produjeron desarrollos escasos en las primeras veinticuatro horas, deteniéndose luego.

En el medio de WINOGRADSKY, a pesar de que al principio no se consiguió ningún resultado, se obtuvo después de insistir un tiempo,

desarrollo de *Leptothrix* y *Sphaerotilus*, dos géneros de *Chlamydo-bacteriales* que se encuentran muy difundidos en la naturaleza, distinguiéndose fácilmente porque las especies del primero de los nombrados utilizan para su metabolismo, según WINOGRADSKY, sales de hierro, razón por la cual sus vainas aparecen siempre coloreadas con óxido de ese metal, mientras que los representantes del género *Sphaerotilus* no parecen tener afinidad con dicho metal y sus vainas son siempre incoloras.

En los trasplantes de estos cultivos hechos sucesivamente para conservar el material de experiencia, desarrolló en gran cantidad *Sphaerotilus*, mientras que *Leptothrix* desapareció rápidamente.

Más tarde, y después de numerosos ensayos, pudo ponerse de manifiesto en esta investigación que el desarrollo de *Leptothrix* estaba relacionado con la cantidad de heno hervido, que osciló entre 10 y 20 ‰, el estado de maceración del mismo y la gran cantidad de agua con que se efectuaba la extracción ⁽¹⁾ de sustancias orgánicas solubles, cuya presencia constituye un exceso de materia orgánica que impide el desarrollo de *Leptothrix*.

También fué necesario determinar la temperatura, no debiendo ser ésta mayor de 30° C, siendo preferible la temperatura del laboratorio (alrededor de 25° C).

El hidróxido férrico que se utilizó se ha preparado en el momento de usarlo, y se obtuvo de la siguiente manera: a una solución de cloruro o sulfato ferroso se le agregó un álcali (hidróxido sódico o amónico) para precipitar el hidróxido férrico. Este precipitado, que se separó fácilmente por decantación, se lavó muchas veces hasta desaparecer el exceso de álcali agregado.

El hidróxido férrico así preparado conjuntamente con el heno hervido se colocaron en una probeta de unos 50 cm. de alto (según aconseja WINOGRADSKY) y se la llenó con el agua a analizar.

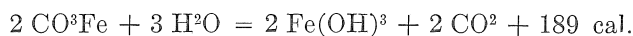
Por fermentación de la celulosa, o bien por la acción de bacterias proteolíticas que descomponen las materias orgánicas del heno, el hidróxido férrico en presencia del anhídrido carbónico es reducido a carbonato ferroso. Este carbonato ferroso, por la acción de las bacterias del hierro, es oxidado nuevamente a hidróxido férrico. Durante esta reacción, que es exotérmica, se libera una cantidad de energía que según WINOGRADSKY es precisamente la que utilizan estas bacterias para efectuar la síntesis de la materia carbonada de su proplasma.

⁽¹⁾ Es conveniente hervir el heno en la siguiente proporción: agua un litro, heno 0,5 g.

La obtención de energía fué calculada por LIESKE (7) teniendo en cuenta la siguiente ecuación:



O bien por los cálculos de E. NAUMANN (24), que son más modernos:



$$2 \times 186,5 + 3 \times 68,4 = 2 \times 95,6 + 2 \times 97 + 189 \text{ cal.}$$

$$389 + 205,2 = 191,2 + 194 + 189 \text{ cal.}$$

En estas condiciones, y después de seis días, el desarrollo de *Leptothrix* se efectuó en forma de velo rojo en la superficie o bien en forma de copos de color rojo, pegados a la pared del recipiente. En la misma forma desarrolló *Sphaerotilus* con sus filamentos blancos y además numerosas infecciones. Se trató de sustituir el hidróxido férrico por carbonato ferroso, pero como ésta es una sal que se oxida rápidamente, fué necesario disponer de un mecanismo que lo suministrara en forma continua. Para esto se ideó el dispositivo de la figura 1, que forma constantemente carbonato ferroso en el frasco que contiene agua más hierro reducido. Mediante el anhídrido carbónico que llega por el tubo c (1).

Los resultados obtenidos por este método fueron satisfactorios pero siempre en presencia de la cantidad de heno hervido detallada anteriormente. En los frascos que, conteniendo aguas sembradas con bacterias del hierro se les hizo llegar el carbonato ferroso, no se obtuvo ningún resultado, a pesar de que con este medio WINOGRADSKY dice haber obtenido buenos desarrollos.

Mejores resultados se han obtenido cuando en lugar de sales de hierro se usó manganeso, aconsejada por MOLISCH (22). Se usó carbonato de manganeso, que siendo poco soluble se deposita en el fondo de los frascos y entra lentamente en solución al estado de bicarbonato de manganeso por acción del anhídrido carbónico del aire o bien por la descomposición de la materia orgánica.

Se ha podido también comprobar que el uso de recipientes altos no es necesario para el éxito de estas experiencias. Con frascos chicos se llegó también a los mismos resultados, y tienen la ventaja de ser más fáciles de manejar.

(1) El principio del método ha sido ideado por WINOGRADSKY.

Se ha comprobado igualmente que el número de infecciones está en proporción directa con la cantidad de materia orgánica; disminuyendo ésta disminuyen las infecciones, aunque en ningún caso fué posible eliminarlas totalmente. Sin embargo se ha conseguido disminuir la materia orgánica hasta 2 ‰ de heno hervido mediante el agregado de sulfato de amonio al 1 ‰ como fuente de nitrógeno.

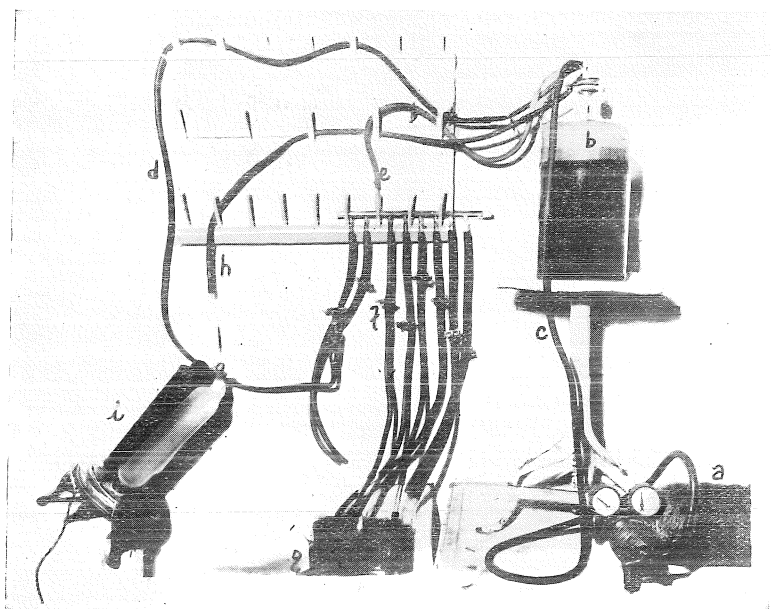


FIG. 1. — Aparato utilizado como fuente ferruginosa artificial (dispositivo original).

- a) Cilindro de anhídrido carbónico.
- b) Frasco con agua más hierro reducido, al cual llega el anhídrido carbónico mediante el tubo c y agua corriente por medio del tubo d.
- e) Tubo repartidor de agua con carbonato ferroso formado en b.
- f) Tubos ramales cuya corriente se regula por medio de pinzas de Hoffmann y que conducen el líquido a los frascos de cultivo g.
- h) Tubo regulador del nivel del frasco b.
- i) Estufa de velas, usada para elevar algo la temperatura de los frascos de cultivo.

En estas condiciones *Leptothrix* desarrolló muy bien aunque en poca cantidad pero las infecciones se redujeron al mínimo.

En un preparado microscópico a partir de estos cultivos se observaron filamentos de *Leptothrix* de color castaño intenso, mezclado con *Sphaerotilus* y muchas infecciones. Con lente de inmersión se observaron los bastoncitos dentro de las vainas o saliendo por el extremo de las mismas. Las vainas se presentaron a veces muy engro-

sadas a causa de la fuerte impregnación de hierro o manganeso. *Sphaerotilus* en cambio presentaba sus vainas muy tenues, que resultaron invisibles sin la ayuda de colorantes. Con respecto a los otros representantes de las *Chlamydobacteriales* nunca se han presentado en los numerosos cultivos que se hicieron. Una sola vez apareció un filamento de *Crenothrix* que no fué posible cultivar.

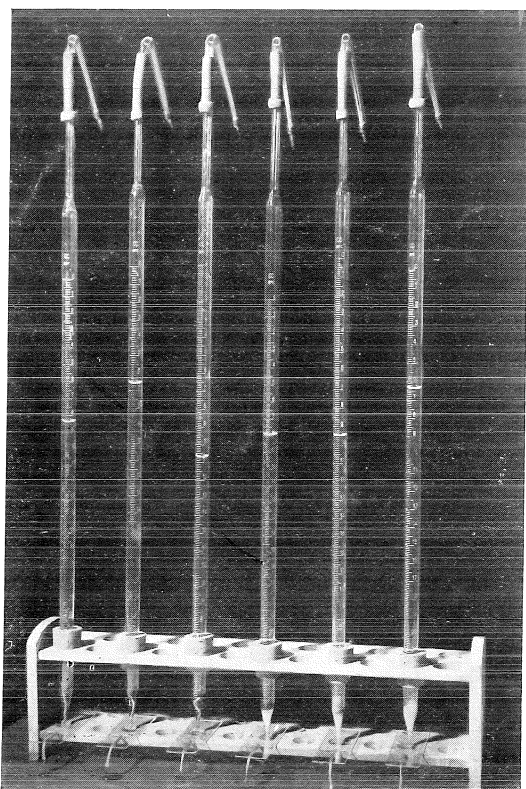


FIG. 2. — Aparato utilizado para el pasaje continuo de líquido entre porta y cubreobjeto (dispositivo original). En la parte superior de las pipetas se colocan válvulas reguladoras de aire, con un microcapilar de vidrio. El líquido sale por un hilo a través de la abertura inferior de las pipetas.

Otras sustancias que se utilizaron para sustituir el heno hervido no dieron resultado alguno.

También se probó en los cultivos de enriquecimiento el método de WINOGRADSKY colocando entre porta y cubreobjeto un copo de filamentos y haciéndole pasar una corriente de agua con diversas sustancias en solución.

Este método se llevó a cabo de dos maneras: una renovándole el líquido periódicamente, lo que no dió ningún resultado, y otra con

corriente continua de líquido utilizando para ello los aparatos de las figuras 2 y 3 en las cuales desarrollaron los preparados hechos con los siguientes medios de cultivos:

- a) Medio mineral de LIESKE.
- b) Citrato de hierro y amonio.
- c) Medio mineral de LIESKE con carbonato de manganeso.

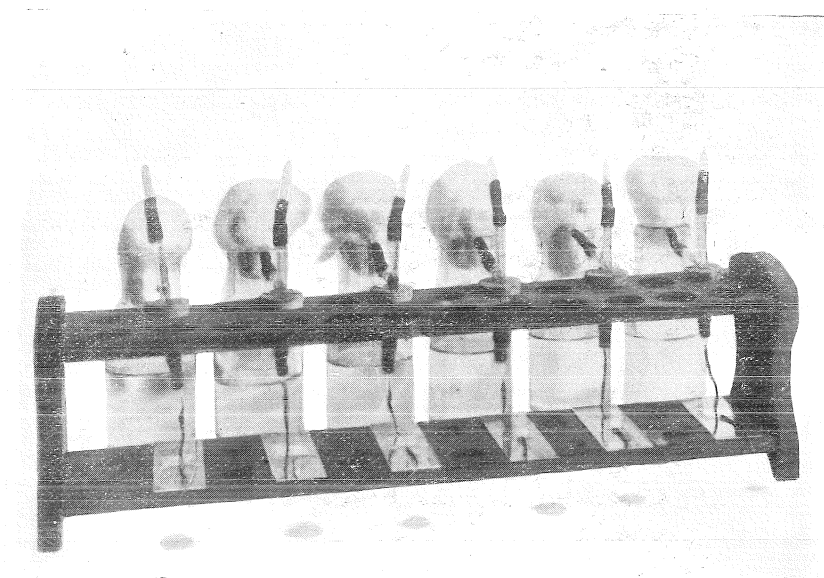


FIG. 3. — Modificación del aparato de la figura 2 utilizado para el pasaje continuo de líquido entre porta y cubreobjeto (dispositivo original). El pasaje del líquido del frasco al portaobjeto se efectúa por medio de un tubo sifón que se continúa por abajo con un hilo. Hacia arriba hay un tubo cerrado que se usa al comenzar la operación para poner en funcionamiento el sifón.

No desarrollaron con:

- d) Agua con carbonato ferroso.
- e) Agua con carbonato ferroso y sulfato de amonio.
- f) Agua con carbonato ferroso, sulfato de amonio y hierro reducido.
- g) Extracto de carne 0,5 ‰ con 10 ‰ de bicarbonato de manganeso ⁽¹⁾.
- h) Extracto de carne 0,25 ‰ con 10 ‰ de bicarbonato de manganeso.
- i) Extracto de carne 0,12 ‰ con 10 ‰ de bicarbonato de manganeso.

(1) El bicarbonato se prepara haciendo burbujear CO₂ en una suspensión de carbonato de manganeso en agua, luego se filtra por papel de filtro y del líquido resultante se agrega 10 cc para 100 cc de medio de cultivo.

Este método tal como lo indica el autor es aconsejable para observar el desarrollo de las bacterias en forma periódica y en cortos espacios de tiempo, cosa que no permiten los otros métodos.

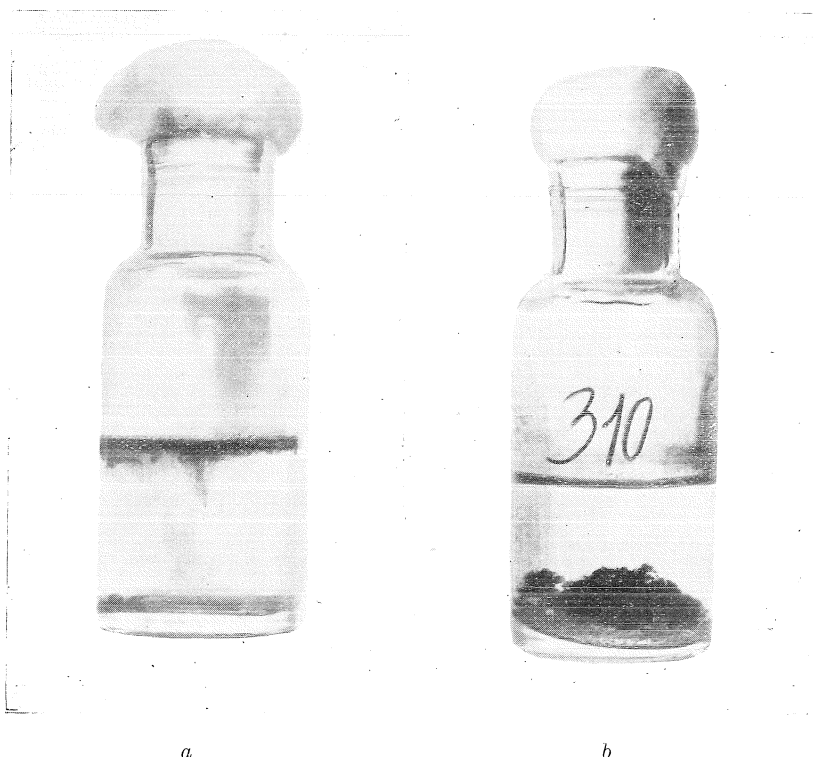


FIG. 4. — Aspecto que presentan los cultivos de enriquecimiento.

- a) Cultivo en heno hervido y carbonato de manganeso.
- b) Cultivo en mosto de malta con carbonato de manganeso.

Muy aconsejable es también el método que utilizó BEIJERINCK para cultivar las bacterias del agua (inclusive *Crenothrix*) y que con algunas modificaciones es igualmente aplicable para *Leptothrix*. El método consiste en echar en el fondo de un recipiente previamente calentado agar de mosto de malta fundido. Al solidificarse éste queda adherido al fondo del recipiente. Después se le agrega agua con carbonato de manganeso y se siembra. A las veinticuatro horas el desarrollo ya es visible y aumenta notablemente. El aspecto que presentó puede apreciarse en la figura 4.

Se han probado otros medios de cultivo para el desarrollo de este grupo de bacterias pero no con mejores resultados que los ya mencionados, cuya lista va a continuación:

- 1) Materia orgánica abundante (heno hervido 20 ‰) con carbonato de manganeso.

- 2) Medio mineral de LIESKE con materia orgánica.
- 3) Infusión de heno 0,5 ‰ con hojas de heno y carbonato de manganeso.
- 4) Heno estéril (0,3 a 1 ‰) con carbonato de manganeso.
- 5) Extracto de levadura (0,03 a 0,1 ‰) con carbonato de manganeso.
- 6) Extracto de levadura (0,03 a 0,1 ‰) con 10 ‰ de bicarbonato de manganeso.
- 7) Heno hervido (6 ‰) con 2,5 ‰ de infusión de heno y carbonato de manganeso.
- 8) Infusión de heno (1 ‰) con carbonato de manganeso.
- 9) Peptona (1 ‰) alcalinizada con carbonato de manganeso.
- 10) Extracto de levadura (0,1 ‰) con acetato de manganeso (0,1 ‰).
- 11) Extracto de levadura (0,1 ‰) con sulfato de manganeso (0,1 ‰).
- 12) Extracto de levadura (0,1 ‰) con sulfato de amonio (0,5 ‰) y carbonato de manganeso.

En todos estos medios de cultivos, además del ya indicado desarrollo de *Leptothrix* y de *Sphaerotilus*, desarrolló también en forma abundante el conocido protozooario *Antophisa vegetans*, cuyo pedicelo de color ocre suele formar velos tan espesos que llegan en algunos casos a entorpecer el desarrollo de las especies mencionadas.

3) AISLAMIENTO

Al intentar el aislamiento a partir de los cultivos de enriquecimiento, se tropezó con serios inconvenientes.

Si bien es cierto que *Sphaerotilus* pudo aislarse sin dificultad, en cambio el aislamiento de *Leptothrix* resultó tarea muy complicada al principio, por tratarse de una bacteria muy difícil de cultivar al estado puro y por no conocerse un medio que permitiera aislarla a partir de cultivos de enriquecimiento.

a) *Aislamiento de Leptothrix*. — Fué necesario determinar primeramente en qué medio sólido podía obtenerse un desarrollo satisfactorio. Se ensayaron diversos medios a base de agar que no dieron los resultados que se esperaban, pues en los mejores casos sólo se consiguió un débil desarrollo inicial detenido casi siempre en seguida por el gran número de infecciones presentes.

Más tarde, modificando el método de BUSGEN (utilizado por el autor para el aislamiento de *Sphaerotilus*), al cual se agregó carbonato

de manganeso (ver fórmula en el Apéndice, pág. 84). Sin embargo, como se trabajó en un principio con exceso de carbonato de manganeso, las cajas resultaban opacas y las infecciones no eran claramente visibles; este inconveniente fué reducido al mínimo regulando el tenor de manganeso hasta llegar a las cantidades citadas.

No fué posible suprimir totalmente esta sal porque además de favorecer algo el desarrollo de *Leptothrix* coloreaba las vainas de las bacterias facilitando así su identificación.

Las siembras se hicieron a partir de cultivos de enriquecimiento donde *Leptothrix* (como se ha dicho) se encuentra mezclada con un gran número de infecciones, siendo necesario recurrir al lavado de los filamentos para aislarla.

El lavado se hizo por varios pasajes en tubos de agua estéril, por medio de una pipeta PASTEUR por cada pasaje o bien decantando los filamentos por centrifugación. Los filamentos ya lavados y librados de la mayor cantidad de agua posible, se colocaron entre dos portaobjetos, esterilizados a la llama para, tratar de deshacer todo el material y liberar las bacterias de sus vainas.

Una ansa de este material se depositó sobre el agar nutritivo de las cajas (que conviene dejar con el agua de condensación), estriando luego con una espátula de BEIJERINCK ⁽¹⁾.

A las veinticuatro horas de la siembra el desarrollo fué visible con pequeños aumentos microscópicos pudiendo observarse colonias chicas incoloras o levemente coloreadas de amarillo, que se extendieron rápidamente por el agar.

Después de dos o tres días comenzó a aparecer un tinte amarillento y en ocho a quince días el color se intensificó, aumentando a la vez el tamaño de las colonias que aparecieron al cabo de ese tiempo, en forma de grandes copos oscuros en la superficie del agar.

Picando una de estas colonias con ayuda de un micromanipulador ⁽²⁰⁾ y llevándolas a tubos de agar acetato de manganeso según LIESKE ⁽¹⁸⁾, los cultivos que desarrollaron puros ofrecieron a las veinticuatro horas un color oscuro, casi negro (este color depende de la especie, como se verá más adelante). Los cultivos infectados con alguna otra forma microbiana que suelen desarrollar en mayor cantidad que *Leptothrix* se distinguen fácilmente de los primeros porque presentan un color castaño rojizo. Un gran porcentaje de los cultivos aislados en esta forma aparecieron al cabo de un mes de desarrollo, infectados con diversas bacterias extrañas, generalmente co-

(1) La espátula de BEIJERINCK consiste en un hilo de platino doblado en ángulo obtuso a 1 cm de la extremidad. En este caso sirvió igualmente bien la espátula de vidrio en ángulo de 120° hecha con una pipeta PASTEUR.

cos y bastoncitos, de los cuales es muy difícil librar los cultivos de *Leptothrix* porque se adhieren a la cápsula mucilaginosa de esta última.

Por trasplantes repetidos de colonia a colonia en caja de PETRI, efectuados a los pocos días del desarrollo, cuando aun las vainas no son muy abundantes, se logró al fin obtener cultivos puros.

También se consiguió la formación de colonias empleando el medio de LIESKE ⁽¹⁸⁾ (del acetato de manganeso), pero fué necesario modificarlo en parte, usando agua corriente en lugar de agua destilada y disminuyendo hasta 0,75 % la cantidad de agar en vez de 1 % que aconseja el autor. En este medio las siembras fueron hechas por el método de las diluciones en el interior del agar, pues en superficie, según lo indica el autor, nunca pudo obtenerse desarrollo a pesar de los numerosísimos intentos hechos al respecto, y sólo pudo conseguirse cuando las cepas ya estaban purificadas.

En este medio, modificado como se acaba de citar, las colonias aparecen como pequeños copos negros que detienen rápidamente su desarrollo. Se consiguió preparar posteriormente un medio cuyo resultado supera a los anteriores, compuesto por una solución de citrato de hierro y amonio (sal aconsejada por ADLER para cultivos de enriquecimiento de *Leptothrix* y *Sphaerotilus* en medios líquidos) solidificada con agar, cuya fórmula se cita en el Apéndice, pág. 85.

Las siembras se efectuaron como se indicó para el método del carbonato de manganeso, pero más conveniente resultó el método de las diluciones sucesivas. De este modo se obtuvo la formación de colonias bien desarrolladas que al ser observadas con aumento aparecen formadas por gruesos filamentos entrelazados. El desarrollo de las siembras hechas en superficie fué menos satisfactorio, aunque siempre superior al obtenido por el medio de extracto de carne y carbonato de manganeso.

El desarrollo de *Leptothrix* en el medio con citrato es relativamente abundante y continuo por un tiempo más o menos largo. Las infecciones, en cambio, aunque desarrollan al mismo tiempo, detienen rápidamente su crecimiento, permitiendo en esta forma el aislamiento de la primera con mayor facilidad. Siendo éste un medio perfectamente transparente las colonias pudieron ser observadas sin dificultad. Distinguiéndose fácilmente las puras de las infectadas, lo cual resulta imposible o muy dificultoso con el medio del carbonato de manganeso.

Las colonias se trasplantaron con ayuda de un micromanipulador y se llevaron a tubos con el mismo medio o bien a tubos con medio de LIESKE, obteniéndose cultivos que después de veinticuatro o cuarenta y ocho horas aparecieron en su mayoría puros. Estos cultivos

fueron nuevamente sembrados en cajas y se volvieron a picar colonias para tener seguridad absoluta de su pureza.

La facilidad de desarrollo y la seguridad absoluta de la pureza de los cultivos obtenidos en este medio, hizo que se usara sistemáticamente desechando los dos anteriormente mencionados.

b) *Aislamiento de Sphaerotilus*. — El aislamiento de *Sphaerotilus* fué mucho más simple que el de *Leptothrix* y para ello se empleó el método de BÜSGEN (7).

Sphaerotilus desarrolló en este medio formando colonias que se extendieron rápidamente por el agar acompañadas con infecciones, pero el aislamiento pudo intentarse con éxito.

Trasplantando con un micromanipulador las colonias se llevaron a tubos con medio líquido. En agar estriado no resultó conveniente trasplantarlas, pues la especie de *Sphaerotillus* estudiada desarrolla muy pegada al agar y es casi imposible despegarla con el ansa para hacer los trasplantes.

Las especies de este género pudieron también aislarse con éxito empleando los tres métodos citados para el aislamiento de las *Leptothrix*, siendo el resultado en todos ellos más o menos igual, dado que las especies del primero son mucho menos exigentes para su desarrollo que las del segundo.

En estos aislamientos, lo mismo que en el caso anterior, se repitieron los trasplantes de colonia a colonia para asegurar la pureza del cultivo. Además se efectuaron controles de pureza con caldo común.

En los aislamientos se usó también el método de las placas de sílico gel de WINOGRADSKY, ideado por el autor para el aislamiento de los nitrificadores, a las que se agregó previamente un medio absolutamente mineral. No fué posible obtener desarrollo en este medio (posiblemente debido a la ausencia de materia orgánica).

CAPITULO III

ESTUDIO DE LAS CHLAMYDOBACTERIALES AISLADAS

El estudio de las *Chlamydobacteriales* que se expone en la presente investigación se ha realizado en el curso de tres años consecutivos durante los cuales se ha podido aislar un total de 255 cepas de algunos géneros de este orden de las *Squizomycetes*, cuya lista se adjunta en el apéndice pag. 77 a 83.

A continuación se desarrolla la forma cómo se ha encarado el estudio morfológico y fisiológico.

Las técnicas usadas fueron en su mayoría las que aconseja la planilla bacteriológica y el « Manual of Methods for pure Culture Study of Bacteria » de la Society of American Bacteriologists; pero tratándose de un grupo tan especializado de bacterias fué necesario apartarse de las mencionadas técnicas, ensayando otras que se detallarán a continuación.

1) MORFOLOGÍA

Las primeras observaciones morfológicas se realizaron en los cultivos de enriquecimiento, por el método ya indicado de las corrientes salinas sobre los cultivos colocados entre porta y cubreobjetos (pág. 16) y por preparados directos.

En algunos casos fué preciso recurrir a la disolución del hidróxido de hierro o manganeso de las vainas, con ácido clorhídrico diluído.

Cuando se dispuso de cepas puras se estudiaron en la siguiente forma:

Preparados directos.

Preparados negativos.

Preparados coloreados.

Preparados en cámara húmeda { 1) Método de FORTNER. Modificado por SORIANO.
2) Cultivos de adhesión.

Caracteres de cultivo.

Preparados directos. — Se utilizaron cultivos jóvenes de 24 a 48 horas, provenientes de medios líquidos. En los medios solidificados con agar resulta muy difícil desprender los filamentos, debido a que el desarrollo se efectúa muy adherido a aquél.

El material de estudio se coloca entre porta y cubreobjeto. Durante las observaciones prolongadas, conviene, para evitar la desecación, bordear el cubre objeto con vaselina fundida.

Con este tipo de preparado, pudo conocerse el tamaño, la forma y la movilidad de las bacterias, sin ningún artificio que alterara sus condiciones naturales de vida.

Preparados negativos. — Se obtienen directamente tratando con una gota de nigrosina y una gota de material, haciendo luego un frotis sobre un portaobjeto bien desengrasado.

Tanto para estos preparados como para los coloreados, se utilizó material proveniente de cultivos en medios líquidos, sin sales de hierro ni manganeso.

En estos preparados, resaltan las bacterias incoloras, sobre las vainas que se tiñen ligeramente de violeta.

Preparados coloreados. — Se usaron los siguientes métodos, cuyo detalle se cita en el apéndice pag. 88 a 90.

a) Método de GRAM; modificación de HUCKER y de KOPELOFF y BEERMAN.

b) Método de coloración simple (fucsina o azul de metileno).

c) Método de ZIEHL NIELSEN (ácido resistencia).

Cuando alguna vez se utilizó material con vainas coloreadas, se lo sometió previamente al tratamiento con ácido clorhídrico diluido.

Estos métodos permitieron observar detalles que no se revelan en los preparados directos.

Preparados en cámara húmeda. — Se utilizaron los siguientes métodos, cuyo detalle se cita en el apéndice pag. 88 a 89.

a) Método de FORTNER (modificado por SORIANO ⁽³⁰⁾).

b) Método de LINDNER (cultivos de adhesión) ⁽¹⁹⁾.

Estos métodos permitieron el control microscópico del desarrollo en el transcurso del tiempo, y la obtención de fotografías con las características morfológicas de sus diversas fases (ver láminas al final).

Caracteres de cultivo. — Los representantes del género *Sphaerotilus* fueron estudiados en los siguientes medios:

Agar de BUSGEN (extracto de carne).

Agar al citrato de hierro y amonio.

Medio líquido de BUSGEN (extracto de carne).

Y los del género *Leptothrix* en:

Agar al citrato de hierro y amonio (en caja y en estría).

Agar al acetato de manganeso (medio de LIESKE modificado),
en caja y en estría.

Peptona y acetato de manganeso.

La composición y detalles de preparación de estos medios de cultivo figuran en el apéndice pag. 84 a 86.

Las observaciones se hicieron en todos los casos con cultivos de 24 horas por lo menos, prosiguiendo por varios días las observaciones.

2) FISIOLÓGIA

El estudio de la fisiología de estas bacterias planteó, como problema previo, el hallazgo de un medio que permitiera cultivar las cepas puras en suficiente cantidad como para llevar a cabo las experiencias sistemáticas y en serie, indispensables para poder comparar la influencia de diversos agentes sobre los gérmenes en estudio.

Las primeras dificultades del estudio de estas bacterias consideradas autótrofas y cuyo metabolismo se creía íntimamente vinculado a la presencia de sales de hierro y manganeso, aparecieron al notar la inexistencia en la bibliografía de datos precisos sobre la cantidad y calidad de las sales empleadas al cultivarlas y también sobre la posible influencia de sustancias orgánicas.

Fué por ello preciso apartarse de las técnicas de laboratorio usadas habitualmente y las que aconseja el Comité de Bacteriólogos Americanos, dado que estos microorganismos tienen facultades y exigencias de alimentación poco comunes y bastante mal conocidas e iniciar el estudio con ensayos de carácter general a fin de precisar la influencia que las sales de hierro y manganeso y diversas sustancias orgánicas (como asimismo sus respectivas concentraciones) tienen sobre su desarrollo.

Las experiencias se efectuaron en medios líquidos conteniendo una sal de hierro o manganeso y una sustancia orgánica compleja. Además para cada par « sustancia orgánica-sal » se efectuaron las siguientes diluciones:

Para las sales de hierro y manganeso:

gramos ‰ : 2,7-0,9-0,3-0,1-0,03-0,01-0,003-0,001-0.

Para las sustancias orgánicas:

gramos ‰ : 1,5-1,0-0,3-0,1-0,03-0,01-0,003-0,001-0,

lo que supone 81 ensayos diferentes para cada cepa (pues cada una de las diluciones de la sal debe ensayarse con cada una de las diluciones de materia orgánica y viceversa).

Aunque los resultados de estas experiencias no fueron realmente satisfactorios, permitieron sacar algunas conclusiones útiles y tuvieron algún valor como orientación en el curso posterior del trabajo.

Como sustancias orgánicas se ensayaron:

Infusión de heno, que no dió resultado.

Extracto de carne, con buen resultado.

Peptona, con buen resultado.

Y con referencia a las sales de hierro y manganeso, sólo el acetato de manganeso dió resultados satisfactorios.

Las siembras fueron efectuadas en tubos, en las mismas condiciones que para medios minerales, y los resultados se tomaron a partir de las 24 horas, hasta 10, 15 y 20 días después de efectuadas.

Las experiencias se realizaron con *Leptothrix ochracea*, que es entre las fijadoras del hierro y manganeso, las menos exigentes para desarrollar, luego con *Sphaerotilus* y demás cepas que parecían diferentes, apreciando los resultados obtenidos en forma comparativa.

Las primeras conclusiones a este respecto fueron:

1°) Entre las sustancias ensayadas, la peptona es la que más favorece el desarrollo de *Leptothrix*.

2°) *Sphaerotilus* desarrolla bien en casi todos los medios, particularmente en el de BUSGEN, con extracto de carne (sin sales de hierro ni manganeso).

3°) El acetato de manganeso es la sal que mejor parece *coadyuvar* al desarrollo de *Leptothrix* (intensa y abundante coloración de vainas). También da buenos resultados, aunque inferiores al acetato, el carbonato de manganeso.

4°) Todas las sales de manganeso solubles en concentración superior a 0,3 ‰ inhiben el desarrollo de *Leptothrix*, cualquiera sea la concentración de peptona.

5°) Cuando el medio tiene más de 1 ‰ de materia orgánica, las vainas de *Leptothrix* no se colorean aún en presencia de sales de hierro o manganeso.

6°) La materia orgánica influye en la disposición del desarrollo; así, con concentraciones del orden del 1 ‰ se obtiene desarrollo en superficie y a medida que ésta disminuye el crecimiento se efectúa sobre la pared del tubo, y finalmente tiene lugar sobre el fondo del mismo, cuando las cantidades de materia orgánica llegan a concentraciones mínimas.

7º) Las sales de hierro difícilmente colorean las vainas (esta observación sólo es válida para los cultivos puros).

8º) En los tubos que contienen peptona y hierro reducido, el desarrollo apareció al principio incoloro, tomando el tinte característico recién después de 20 días.

9º) Las sustancias y concentraciones más favorables para el desarrollo de estas bacterias resultaron ser:

Para el género Sphaerotilus:

Extracto de carne 0,5 a 1 ‰

Para el género Leptothrix:

Peptona 0,5 ‰

Acetato de manganeso 0,1 »

Y si se usa carbonato de manganeso:

Peptona 0,5 ‰

Carbonato de manganeso 0,06 »

El desarrollo tiene lugar hasta con concentraciones de 0,01 ‰ de peptona para algunas especies de *Leptothrix*.

En posesión de cultivos puros abundantes, se ha propuesto encarar concretamente el estudio de los siguientes puntos capitales de su fisiología:

1º) ¿Son capaces las bacterias del hierro de desarrollar en medios absolutamente minerales, tal como afirman WINOGRADSKY y LIESKE?

2º) En caso contrario, ¿juegan el hierro y el manganeso algún rol en el metabolismo de estos microorganismos?

a) *Desarrollo en medios minerales.* — Se usaron numerosos medios minerales para tratar de conseguir el desarrollo de estas bacterias, sembrando en todos los casos con una suspensión homogénea de gérmenes de 24 a 48 horas de desarrollo. Las experiencias se realizaron con cepas recientemente aisladas para evitar un acostumbamiento a los medios orgánicos del laboratorio, o bien la pérdida del poder autotrófico.

Se ha investigado también la influencia de la concentración del anhídrido carbónico (¹).

En ninguno de los medios minerales usados, inclusive el aconsejado por LIESKE y el usado por WINOGRADSKY, se pudo obtener ni aún comienzo de desarrollo a pesar de las precauciones tomadas.

Previendo que estos resultados negativos pudieran deberse a la posibilidad del ya mencionado acostumbramiento a la materia orgánica, se trató de « desacostumbrarla » por medio de pasajes sucesivos a medios cada vez más pobres en sustancias orgánicas. Sin embargo, al llegar a ciertas concentraciones mínimas, ya no hay desarrollo.

Las distintas fuentes de carbono y nitrógeno usadas, se ensayaron en varias concentraciones (generalmente 3, 1, 0,3 y 0,1 ‰) y con distintos cationes, por si éstos pudieran tener alguna influencia sobre la cantidad del desarrollo.

A pesar de todas las precauciones tomadas, los resultados fueron siempre negativos.

Las experiencias realizadas se agregan a continuación, sintetizadas en forma de cuadros.

(¹) El dispositivo utilizado consiste en un desecador en el cual se practica el vacío y luego se le inyecta una cantidad medida de CO₂, agregandole después el aire necesario para equilibrar la presión atmosférica.

CUADRO N° 1

Sustancias minerales ⁽¹⁾	Fuente de		Activadores ⁽²⁾	Fuente de energía	Desarrollo
	Carbono	Nitrógeno			
PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	CO ₂ 2 %	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
	CO ₂ 6 %	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
	CO ₂ 10 %	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
PO ₄ HK ₂ , SO ₄ Mg, ClNa, SO ₄ Fe	CO ₂ del aire	SO ₄ (NH ₄) ₂	CO ₃ Mn	Mn·· Mn····	Negativo ⁽³⁾
			SO ₄ Fe	Fe·· Fe···	Negativo ⁽³⁾
PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Bicarbonato	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo

⁽¹⁾ Las sustancias minerales se usaron al 0.1 %/oo.

⁽²⁾ Según la teoría de WINOGRADSKY.

⁽³⁾ En el medio mineral de WINOGRADSKY.

CUADRO N° 1 (Continuación)

Sustancias minerales	Fuente de		Activadores (1)	Fuente de energía	Desarrollo
	Carbono	Nitrógeno			
PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Oxalato	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
PO ₄ HK ₂ , SO ₂ Mg ClNa, SO ₄ Fe	Oxalato	SO ₄ (NH ₄) ₂	CO ₃ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			SO ₄ Fe	Fe·· Fe···	
PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Citrato	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
PO ₄ HK ₂ , SO ₄ Mg ClNa, SO ₄ Fe	Citrato	SO ₄ (NH ₄) ₂	CO ₃ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			SO ₄ Fe	Fe·· Fe···	Negativo
PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	SO ₄ (NH ₄) ₂	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
		ClNH ₄	(CO ₃ H) ₂ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			Fe reducido	Fe·· Fe···	Negativo
PO ₄ HK ₂ , SO ₄ Mg ClNa, SO ₄ Fe	Glucosa	SO ₄ (NH ₄) ₂	CO ₃ Mn	Mn·· Mn····	Negativo
			SO ₄ Fe	Fe·· Fe···	

(1) Según la teoría de WINOGRADSKY.

b) *Influencia de las sales de hierro y manganeso.* — Al establecer que las bacterias del hierro no son autótrofas absolutas, surge la necesidad de aclarar el rol desempeñado por las sales de hierro y manganeso en su metabolismo.

En vista de la imposibilidad de obtener desarrollo en medios absolutamente minerales, se abordó el estudio sistemático de la posible influencia de las sales ferrosas y manganosas en presencia de sustancias orgánicas de complejidad decreciente.

El curso de las experiencias está sintetizado para *Leptothrix* en el cuadro N° 2, y para *Sphaerotilus* en el N° 3.

Como sustancia mineral se usó en todos los casos fosfato bipotásico y sulfato de magnesio en concentración aproximada de 0,001 gramos por litro.

Las fuentes de carbono y nitrógeno se ensayaron en las concentraciones de 1, 0,3 y 0,1 ‰ cada una, haciendo en todos los casos las nueve combinaciones posibles. Además, con cada una de estas combinaciones se ensayaron tres series para estudiar la influencia del « activador »: una con hierro reducido, otra con carbonato de manganeso y otra sin sales de hierro ni manganeso.

La elección del hierro reducido como fuente de « sal ferrosa », se debe al hecho de que estas sales cuando están disueltas se oxidan fácil y espontáneamente.

En cuanto al carbonato de manganeso, fué preferido sobre el acetato (aconsejado por el resultado de las experiencias previas) para evitar la posible influencia del anión orgánico.

CUADRO N° 2. — Género *Leptothrix*

Expe- riencia N°	Sustancias minerales (2)	Fuente de		Activador del medio (1)	Desarrollo		
		Carbono	Nitrógeno		Cantidad	Color	Características
1	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	(+)	Incoloro	Poco desarroll., pegado a la pared
				CO ₃ Mn	+ +	Castaño	Des. en forma de manchas circulares a lo largo de la pared del tubo
				—	+ + +	Incoloro	Como el anterior.
2	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	Asparagina	Fe reducido	+ + (+)	Incoloro	Fil. tapizando la pared totalm. Bajo la sup. forma un anillo de intensif. de desarrollo.
				CO ₃ Mn	+ + (+)	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ + (+)	Incoloro	Como el anterior.
3	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	Extracto de agar	Fe reducido	+ + + (+)	Débil col. castaña	En forma de copos sueltos.
				CO ₃ Mn	+ + + (+)	Castaño	Como el anterior.
				—		Incoloro	Como el anterior.
4	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Citrato	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	+ +	Incoloro	En forma de copos aislado, pegados a la pared.
				CO ₃ Mn	+ +	Castaño	Como el anterior.
				—	+ + (+)	Incoloro	Como el anterior.

(1) Según la teoría de WINOGRADSKY.

(2) Las sustancias minerales se usaron al 0.1 ‰

CUADRO N° 2 — Género *Leptothrix* (continuación)

Experiencia N°	Sustancias minerales	Fuente de		Activador del medio	Desarrollo		
		Carbono	Nitrógeno		Cantidad	Color	Características
5	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Citrato	Asparagina	Fe reducido	+ +	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ +	Castaño	Copos que tapizan la pared; anillo sup. de intensif. de desarr.
				—	+ +	Incoloro	Copos aislados sobre un solo lado de la pared.
6	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Citrato	Extracto de agar	Fe reducido	+ + + (+)	Incoloro	En forma de copos sueltos.
				CO ₃ Mn	+ + + (+)	Castaño	Como el anterior.
				—	+ + + (+)	Incoloro	Como el anterior.
7	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Asparagina	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	+ +	Incoloro	Tapizada totalmente la pared. anillo superficial de concentración de desarrollo.
				CO ₃ Mn	+ +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ +	Incoloro	Como el anterior.
8	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Asparagina	Asparagina	Fe reducido	+ +	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ +	Incoloro	Como el anterior.
9	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Cistina	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	(+)	Incoloro	Filamentos pegados a la pared.
				CO ₃ Mn	+ +	Castaño	Como el anterior.
				—	(+)	Incoloro	Como el anterior.

CUADRO N° 2. — Género *Leptothrix* (conclusión)

Experiencia N°	Sustancias minerales	Fuente de		Activador del medio	Desarrollo		
		Carbono	Nitrógeno		Cantidad	Color	Características
10	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Cistina	Cistina	Fe reducido	(+)	Incoloro	Copos pegados a la pared.
				CO ₃ Mn	(+)	Castaño	Como el anterior.
				—	(+)	Coloreado	Como el anterior.
11	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Extracto de agar	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	+ + +	Incoloro	Copos sueltos.
				CO ₃ Mn	+ + +	Castaño	Como el anterior.
				—	+ + +	Incoloro	Como el anterior.
12	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Extracto de agar	Extracto de agar	Fe reducido	+ + +	Castaño m. débil	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ + +	Castaño	Como el anterior.
				—	+ + (+)	—	Como el anterior.
13	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Suero normal de caballo	Suero normal de caballo	Fe reducido	—	—	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	—	—	Como el anterior.
				—	—	—	Como el anterior.
14	—	Peptona	Peptona	Fe reducido	+ + + +	Incoloro	Copos sueltos.
				CO ₃ Mn	+ + + +	Castaño	Como el anterior.
				—	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.

CUADRO N° 3. — Género *Sphaerotilus*

Experiencia N°	Sustancias minerales (2)	Fuente de		Activador del medio (1)	Desarrollo		
		Carbono	Nitrógeno		Cantidad	Color	Características
1	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	+ + + +	Incoloro	Filamentos sueltos.
				CO ₃ Mn	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
2	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	Asparagina	Fe reducido	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
3	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Glucosa	Extracto de agar	Fe reducido	+ + +	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ + +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ + +	Incoloro	Como el anterior el (desarrollo aparece a las 24 horas).
4	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Citrato	SO ₄ (HN ₄) ₂	Fe reducido	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ + +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
5	PO ₄ HK ₂ y SO ₃ Mg	Citrato	Asparagina	Fe reducido	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₃ Mn	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.
				—	+ + + +	Incoloro	Como el anterior.

(1) Según la teoría de WINOGRADSKY.

(2) Las sustancias minerales se usaron al 0,1 ‰.

CUADRO N° 3 — Género *Sphaerotilus* (conclusión)

Expe- riencia N°	Sustancias minerales	Fuente de		Activador del medio	Desarrollo		
		Carbono	Nitrógeno		Cantidad	Color	Características
6	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Citrato	Extracto de agar	Fe reducido	+	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₂ Mn	+	Incoloro	Como el anterior.
				—	+	Incoloro	Como el anterior.
7	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Asparagina	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	++++	Incoloro	Copos sueltos.
				CO ₂ Mn	++++	Incoloro	Copos sueltos.
				—	++++	Incoloro	Como el anterior.
8	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Asparagina	Asparagina	Fe reducido	++++	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₂ Mn	++++	Incoloro	Como el anterior.
				—	++++	Incoloro	Como el anterior.
9	PO ₄ HK ₂ y SO ₄ Mg	Extracto de agar	SO ₄ (NH ₄) ₂	Fe reducido	+++	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₂ Mn	+++	Incoloro	Como el anterior.
				—	+++	Incoloro	Como el anterior.
10		Extracto de agar	Extracto de agar	Fe reducido	+++	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₂ Mn	+++	Incoloro	Como el anterior.
				—	+++	Incoloro	Como el anterior.
11		Extracto de carne	Extracto de carne	Fe reducido	++++	Incoloro	Como el anterior.
				CO ₂ Mn	++++	Incoloro	Como el anterior.
				—	++++	Incoloro	Como el anterior.

En un ligero repaso a los cuadros 2 y 3 se nota rápidamente las grandes diferencias fisiológicas entre el género *Sphaerotilus* y el género *Leptothrix*.

En efecto, mientras las especies del primero de los géneros citados son incapaces de oxidar las sales ferrosas y manganosas, las del segundo lo hacen en forma casi constante (por lo menos con las del manganeso); además, con respecto a las distintas sustancias usadas y a la forma del desarrollo, se ve de inmediato que *Sphaerotilus* puede desarrollar satisfactoriamente con cualquiera de los medios de cultivo ensayados; en cambio, para *Leptothrix*, la cantidad y calidad de su desarrollo está íntimamente ligada a la composición del medio de cultivo.

La fórmula del medio de cultivo que dió mejores resultados para el género *Leptothrix*, figura con detalles en la pág. 35 y 36.

Observando el comportamiento de *Leptothrix* respecto a las sales manganosas y ferrosas, puede decirse que:

Si bien es cierto que el hierro o el manganeso favorecen en algunos casos el desarrollo de estas bacterias (experiencia N° 9), en la mayoría de ellos la acción es nula, y en otros (experiencias N° 1 y 4) parece que la acción fuera perjudicial.

Por lo tanto, aunque de estas experiencias no surja claramente que estas sales inhiban la multiplicación de las bacterias, los resultados de las mismas permiten asegurar por lo menos que su acción sobre la *cantidad de desarrollo* es totalmente secundaria.

Con respecto a la oxidación, puede observarse que en casi ninguna de estas experiencias el hierro ha sido oxidado (vainas incoloras), mientras que el manganeso lo es en todos los casos, excepto en presencia de asparagina.

Para demostrar si son las sustancias componentes del medio de cultivo las que crean factores inhibidores a la oxidación (tubos provenientes del medio con asparagina), se tomaron los que tenían abundante desarrollo incoloro pegado a la pared, se volcaron los contenidos, se lavaron con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio anterior y se les agregó una solución de acetato de manganeso en agua destilada. *Al cabo de 20 minutos los filamentos estaban totalmente coloreados.*

Conocidos los tiempos normales de desarrollo de estas bacterias (24-48 horas) y dada la ausencia total de materias nutritivas en los tubos de estas experiencias, puede descartarse la posibilidad de que tal efecto fuera debido a un ulterior desarrollo.

Repitiendo esta experiencia con todos los tubos de desarrollo incoloro, se obtuvo en todos los casos idéntico resultado. Se probó

también con otras sales de manganeso y en concentraciones más elevadas, y los resultados siguieron siendo los mismos. En cambio, al ensayar con sales de hierro (ferrosas) no se consiguió ninguna coloración.

La acción de los ácidos fuertes y débiles y la ruptura de las células destruyen el factor que produce la oxidación.

Sin embargo, es interesante el hecho de que la oxidación se produce en muy buenas condiciones con bacterias muertas; esto se ha comprobado matándolas por medio del vacío o bien colocando filamentos sobre un portaobjeto y dejándolo secar al aire (los controles realizados permiten asegurar la destrucción de la vida bacteriana) y agregándoles luego la solución de acetato de manganeso se observa que los filamentos *se colorean*.

Parecería, entonces, que la oxidación del manganeso, o no participa en el metabolismo de estas bacterias, o lo hace mediante una exoenzima acumulable en las vainas, y que por lo tanto puede actuar sobre las sales manganosas.

Haciendo la escala de pH 4-4,5-5-5,5-6-6,2-7-7,2-8-8,5-9, se nota que la coloración sólo aparece en medios cuyo pH es superior a 6,8.

Este hecho parece ilustrar en parte la razón por la cual las sales ferrosas no colorean las vainas, por cuanto los medios de cultivo tienen un pH superior a 6,8, al cual las sales ferrosas son tan inestables que prácticamente están convertidas en férricas *ya en el medio de cultivo*; y para que la coloración aparezca es lógicamente necesario que el proceso de oxidación tenga lugar dentro de las vainas.

Esto estaría corroborado por los estudios de WINOGRADSKY, quien obtenía cultivos coloreados con hidróxido férrico, *en cultivos impuros*, es decir en presencia posiblemente de gérmenes que reduciendo el hidróxido férrico, provocaban un equilibrio que permitía la llegada a las vainas de sales ferrosas.

Cuál es la naturaleza del mecanismo de la oxidación producida en las vainas, y cuál es el rol que la misma tiene en el metabolismo de las bacterias del hierro, es el problema que plantea la presente investigación y que posiblemente sea tema de un estudio posterior.

Sin embargo, los hechos acumulados en este estudio, a saber:

- 1) Que nunca se ha conseguido cultivar estas bacterias en medios absolutamente minerales;
- 2) que la presencia o ausencia de sales de hierro o manganeso parece no influir sobre la cantidad de desarrollo;
- 3) que la oxidación de las sales de manganeso tiene lugar aún con bacterias muertas;

- 4) que utilizan perfectamente sustancias complejas como la peptona;
- 5) que sólo se encuentran en cantidades masivas en la naturaleza en medios donde el agua y las hojas de las plantas constituyen un « substratum » rico en materias orgánicas,

indican la posibilidad de que estas bacterias no sean ni siquiera autótrofas facultativas.

Por otra parte, esta opinión coincide con las dudas que sobre la autotrofia de estas bacterias tienen L. G. BAAS BECKING y G. S. PARKS, como consecuencia de los datos energéticos cuantitativos que obtuvieron al estudiar el metabolismo de las bacterias llamadas autótrofas (*Physiological Reviews*. 7: 1927, 85-106).

c) *Otras características fisiológicas.* — Paralelamente a la investigación de las relaciones entre el metabolismo de las bacterias del hierro y las sales ferrosas y manganosas, se estudió la influencia sobre las mismas de la luz, la temperatura, pH del medio, oxígeno, anhídrido carbónico, como así también sus caracteres químico-fisiológicos (poder de esporulación, reducción de nitratos, formación de hidrógeno sulfurado, indol y acetil-metil-carbinol).

A continuación se expresan los métodos usados, y al describir las distintas especies, se detallarán los resultados obtenidos en cada caso.

Influencia del anhídrido carbónico. — Las experiencias se hicieron en forma análoga a la ya descripta en el caso de los medios minerales, usando concentraciones de 2, 6, y 10 % en volumen de anhídrido carbónico. Se ensayaron todas las especies, dejando en cada caso tubos de control en contacto con la atmósfera ambiente.

Influencia de la temperatura. — La determinación de la temperatura óptima, máxima y mínima, se hizo sembrando suspensiones homogéneas de gérmenes en dos series de tubos: la primera contenía agar al citrato de hierro y amonio, y la segunda peptona con acetato de manganeso. Cada una de las series fué incubada luego a las temperaturas de 0°, 15°, ambiente (alrededor de 25°), 32°, 37°, 40°, 45°, 50°, 55° y 60° centígrados. El desarrollo se observó a partir de las 24 horas y en forma comparativa.

Influencia del oxígeno. — Se prepararon tres series de tubos de agar-punción al 0,5 %. La primera adicionada de extracto de carne, para *Sphaerotilus* y la segunda y tercera para *Leptothrix*, adicionadas respectivamente de acetato de manganeso y citrato de hierro y

amonio. Los tubos se hirvieron durante una hora para eliminar todo el oxígeno posible, se entibió a 45° C, y luego se sembró en forma homogénea en todo el tubo. Después se dejó solidificar y se incubó a la temperatura óptima para cada especie. Los resultados se tomaron a partir de las 24 horas.

El método dió buen resultado con *Sphaerotilus*, pero en cuanto a *Leptothrix*, hubo casos en los cuales no se llegó a ninguna conclusión

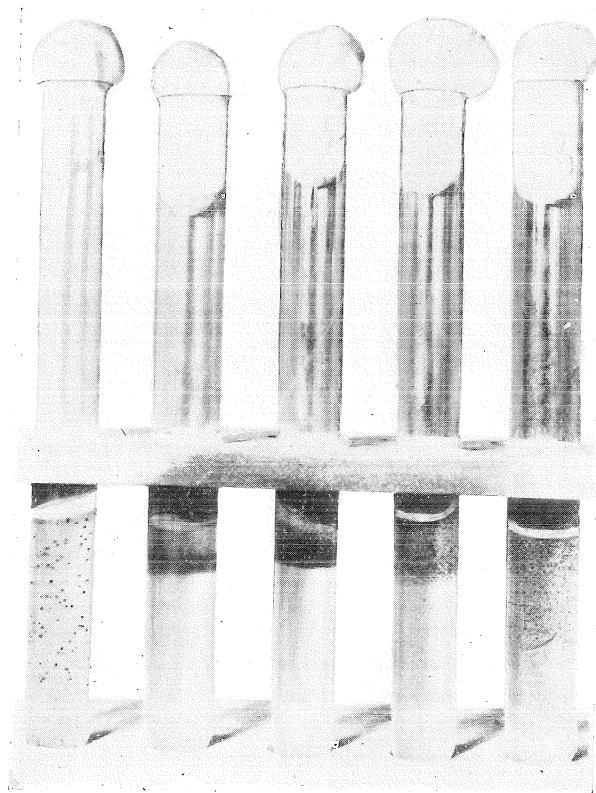


FIG. 5.

por cuanto el desarrollo era uniforme y uniformemente coloreado desde la superficie hasta el fondo del tubo; y como la coloración es consecuencia de la oxidación, este hecho resulta incompatible con la hipótesis de que se había extraído por ebullición el oxígeno del interior del tubo.

Para subsanar esta imprecisión del método, se usaron luego tubos de HALL para anaerobiosis (¹).

En la fotografía N° 5, se ven algunos aspectos del desarrollo en los tubos con agar previamente hervidos; el primero pertenece al grupo ya mencionado de los de desarrollo con coloración homogénea.

Influencia del pH del medio. — Los medios de cultivo usados para estas experiencias fueron caldo de extracto de carne para *Sphaerotilus* y peptona con acetato de manganeso para *Leptothrix*.

Mediante la adición de cantidades previamente calculadas de HCl e Na(OH) N/10 y N/100, se prepararon series de tubos con los siguientes pH: 3-3,5-4-4,5-5-5,4-6,2-6,6-4-6,8-7-7,4-7,6-8-8,5-9-9,8.

El pH de cada tubo fué controlado colorimétricamente, como asimismo su esterilidad (mediante incubación de 24 horas a 30°-32°). Luego se sembró cada tubo con una suspensión de gérmenes en agua destilada estéril.

Reducción de nitratos. — El medio usado fué agua de peptona nitrada. La presencia de nitritos se investigó al cabo de 1, 2, 3, 5, y 10 días, con los reactivos de PETER GRIESS y TROMSDORF.

En los casos en que la presencia de nitratos fué negativa, se ratificó la presencia de los mismos mediante una reducción previa con polvo de zinc e inmediata investigación de nitritos con los reactivos ya mencionados.

Investigación del poder de formación de SH₂. — Se utilizaron los métodos de KLIGER y de WILSON, con la salvedad de que en lugar de extracto de carne, se usó agar-agua, porque en este medio los gérmenes desarrollan mejor.

Poder de formación de acetil-metil-carbinol. — Se investigó con la reacción de VOGES PROSKAUER. También en este caso se empleó agar-agua en lugar del medio original.

Poder de formación de indol. — Se investigó por la reacción de EHRLICH-KOVACS, y por la modificación del método según GORÉ.

(¹) El medio usado en los tubos de HALL fué peptona con acetato de manganeso

Poder de esporulación. — Para poner de manifiesto la presencia de esporas (observadas por algunos autores), se dejaron envejecer los cultivos de 6 a 9 meses, se hicieron suspensiones en agua estéril y se hirvieron durante un minuto. Luego se sembraron en medios adecuados para constatar el desarrollo.

Influencia de la luz. — Con cada una de las cepas en estudio se sembraron tres tubos de peptona con acetato de manganeso. El primero se incubó a la luz normal del laboratorio, el segundo frente a una ventana muy iluminada, y el tercero envuelto en papel negro y grueso que formaba una verdadera cámara oscura.

CAPITULO IV

AGRUPACION DE LOS CULTIVOS ESTUDIADOS

Las 255 cepas de *Chlamydobacteriales* aisladas en estado puro, pudieron agruparse, de acuerdo a ciertas características morfológicas y fisiológicas comunes, en tres grupos que a continuación se describen:

GRUPO I

Las 39 cepas pertenecientes a este grupo, ofrecieron las siguientes características comunes:

Morfología en cámara húmeda. — En los preparados hechos con medio de BUSGEN, se ven filamentos pegados al vidrio por medio de un ensanchamiento que tiene la célula terminal. Suelen encontrarse bastoncitos sueltos a los costados de los filamentos, formando verdaderos enjambres. Las vainas sólo se hacen visibles en los lugares donde las cadenas están interrumpidas.

Desarrollo en caldo de extracto de carne (medio de BUSGEN). — Es abundante y tiene forma de filamentos sedosos en la superficie; al agitar el tubo caen al fondo en forma de ondas. Al envejecer, los cultivos pierden su brillo sedoso.

Colonias en agar-extracto de carne. — De acuerdo a la forma de las colonias en este medio, se diferencian dos grupos:

a) Colonias muy filamentosas, de crecimiento rápido en superficie, sus extremos terminan constantemente en espiral. Vistas al microscopio, sus células son grandes y casi isodiamétricas, con granulaciones pequeñas y muy abundantes.

b) Colonias extendidas, poco filamentosas, nunca terminan en espiral, presentan manchas aceitosas en su interior, en forma semejante a las colonias incolores de *Leptothrix*. Al microscopio, sus células se presentan más alargadas que las de a) y con granulaciones pequeñas y abundantes.

GRUPO II

A este grupo, cuya característica común es la capacidad de colorear sus vainas en presencia de sales ferrosas y manganosas, pertenecen 149 cepas, que de acuerdo a sus formas de desarrollo en cámara húmeda, agar citrato de hierro y amonio, y caldo de peptona con acetato de manganeso, se han clasificado en tres subgrupos: a), b) y c).

a) Los cultivos en cámara húmeda, se presentan como bacterias unidas en largos filamentos rodeados de una vaina continua rugosa y coloreada. Los bastoncitos tienen casi un micrón de ancho y en su interior presentan granulaciones redondeadas. En su terminación las vainas tienen forma de cilindros rectos por cuyo eje pasan los filamentos bacterianos.

Las colonias en agar-citrato de hierro y amonio, son filamentosas, de rápido crecimiento en superficie, y extremos siempre espiralados.

En caldo de peptona y acetato de manganeso, desarrollan en forma de copos sueltos, sedosos y abundantes, que en la parte superior suelen formar un anillo.

b) Presentan en cámaras húmedas filamentos cortos, terminados en puntas finas. Las vainas suelen impregnarse de hierro o manganeso, ensanchándose hasta 16 micrones.

Las colonias en agar citrato de hierro y amonio son de filamentos escasos y coloreados, con manchas aceitosas dentro de la colonia.

En caldo de peptona y acetato de manganeso, desarrollan en forma de copos pequeños, menos abundantes que a), y formando un anillo superficial pegado a la pared.

c) En cámara húmeda desarrollan en forma de filamento fijado al vidrio por medio de un disco de adhesión que siempre es de color herrumbre. Los filamentos son incoloros y rara vez recubiertos con vaina; cuando ésta existe es muy rugosa y fuertemente coloreada.

En caldo de peptona y acetato de manganeso, los bastoncitos se agrupan formando una lámina de aspecto metálico.

En agar citrato de hierro y amonio las colonias son poco filamentosas, los filamentos incoloros, y manchas de color castaño oscuro a su alrededor.

GRUPO III

Las cepas de este grupo presentan como carácter común su semejanza morfológica y fisiológica con *Sphaerotilus*, pero son capaces de colorear sus vainas por oxidación de sales manganosas, y algunas veces de sales ferrosas.

En cámara húmeda desarrollan largos filamentos, de rápido desarrollo, que se extienden y cubren toda la superficie del medio de cultivo. Siempre tienen vaina, habitualmente lisa y coloreada.

En caldo de peptona y acetato de manganeso, presentan largos filamentos que en parte se entrecruzan formando copos de aspecto algodonoso.

En todos los medios sólidos presentan filamentos largos, que se extienden sobre el agar.

Al microscopio las células son alargadas y las granulaciones muy abundantes y dispuestas en una sola hilera.

La lista completa de los cultivos estudiados, se agrega en el Apéndice al final del trabajo, págs. 77 a 83, separados en los grupos anteriores correspondientes.

CAPITULO V

SISTEMATICAS DE LAS CHLAMYDOBACTERIALES

1) DIAGNOSIS

Las *Chlamydobacteriales* pertenecen a un grupo de bacterias que presentan la particularidad de ser filamentosas y estar cubiertas por una delicada vaina mucilaginosa impregnada en algunas especies con óxidos de hierro.

Son conocidas desde la época de EHREMBERG y por su característica de ser filamentosas fueron consideradas primeramente como algas, más tarde muchas especies de espiroquetas y actinomyces filamentosas fueron incluídas en algunos de los géneros que hoy constituyen este orden, no faltando autores que confundiendo estos filamentos con estreptobacterias del género *Bacillus* terminaron incluyéndolas en él.

A continuación se ha tratado de sintetizar las distintas denominaciones que se asignaron, según BUCHANAN⁽⁶⁾, a los diferentes géneros de este orden de las *Squizomicetes*, transcribiendo algunas definiciones originales que se creyeron de importancia.

La diagnosis de cada género se hará por separado.

a) Género *Leptothrix*

Leptothrix: género propuesto por KUTZING en 1843 para un grupo de algas con la siguiente diagnosis: « *Trichomata simplicia tenuissima monogonomica, turgida, continua, vel obsolete articulata, in stratum vel caespitosum vel compactum, continuum, plerumque late expansum, complicata* ». Incluye cuatro especies: *Leptothrix ochracea* (Lyngbya ochracea LEIBL), *L. aeuruginea*, *L. lutescens* (*Hygrocrocis ochracea* Ag. *Calothrix lutescens* MENEGHINI) y *L. fontana* (*Hygrocrocis olivacea* Kg. *Bangia tenuis* Kg.). La primera especie descrita puede ser considerada como tipo, cuya descripción original se transcribe a continuación: *L. fluctuans, natans, ochraceae; trichomatibus curvatis, intricatis, subtilissimus* (diám. 1/1500-1/200'''), *articulis globosis vel oblongis. In Eisenquellen, besonders auf sumpfigen Wiesen und in seichten Gräben.*

Las siguientes referencias que se tienen del género *Leptothrix* son para designar germen completamente distintos del descripto por KÜTZING.

ROBIN (1847), WINTER (1884), DE TONI y TREVISAN (1889) y SCHROETER (1886) describen un organismo que se encuentra en los dientes de caballo denominándolo *Leptothrix buccalis*. (« Algu-filiforme de la bouche »).

ROBIN (1853) describe *Leptothrix buccalis* y encuentra *Leptothrix insectorum* en el recto de varios animales, especialmente los de vida acuática.

KÜTZING (1847) describe nueve *Leptothrix*, todas algas y de agua dulce. Dos años más tarde describe y cataloga un total de 17 especies de este género. Ocho de ellas las agrupa en la primera división bajo el nombre de « *Species basi adnatae* ». Todas estas algas son generalmente coloreadas, pero algunas son incoloras. Bajo el nombre de « *Species trichomatibus liberis, vel intracatis et stratum formatibus* » agrupa las otras 19 especies. La primera de ellas es *Leptothrix ochracea*. Todas estas especies viven en agua y su mayoría son coloreadas de verde. *Leptothrix buccalis* no es reconocida por este autor.

RABENHORST (1865) incluye el género en la tribu de las *Nematogenae* y BILLROTH (1874) usa el término *Leptothrix* para designar una forma de crecimiento de su *Coccobacteria septica* pleomorfa, en la cual el organismo parece un delgado filamento y sin articulaciones visibles.

COHN (1875), incluye este género en la tribu de las *Nematogenes* colocando en ellas todos aquellos organismos que son en forma de delgados filamentos y con articulaciones indistintas, no coloreadas y sin ramificaciones.

TREVISAN (1879) limita el género *Leptothrix* como exclusivo de las algas y crea un nuevo género *Leptotrichia* con la sola especie *Leptothrix buccalis*.

LUERSSEN (1879) acepta todas las formas libres y las formas parásitas que viven en el agua como miembros de este género.

MAGNIN (1880) hace resaltar que las especies del género *Leptothrix* difieren de las del género *Bacillus* por sus filamentos largos muy delgados, adherentes e indistintamente articulados.

WINTER (1880) incluye dos especies solamente en este género, *Leptothrix buccalis* y *Leptothrix parasitica*. Este autor sostiene que los hongos que se asignaron como miembros del género *Leptothrix* son de muy dudoso valor específico y la mayoría de las verdaderas *Leptothrix* son típicas bacterias que contienen phycocromo, y manifiesta la necesidad de designar con otro nombre los organismos incoloros y agruparlos con las bacterias.

ZOPF (1885) sostiene: « Faden bescheidet oder unbescheidet. Theilungen sehr weit gehend ». Desde esa época el término *Leptothrix* es frecuentemente usado como una designación morfológica para filamentos finos, largos, no ramificados.

SCHROETER (1886) describe al género *Leptothrix* como filamentos muy delicados, provistos de una vaina fina. Incluye en el género tres especies: *L. ochracea*, *L. parasitica* y *L. buccalis*. Con esta definición quedan definitivamente excluidas de este género las verdaderas algas. Este autor recalca la posible relación entre *Leptothrix ochracea* y *Gallionella ferruginea*.

DE TONI y TREVISAN (1889) colocan a *Leptothrix buccalis* en un nuevo género: *Rasmussenia*. El género *Leptotrichia* lo reservan para algunas especies del cual excluyen a *L. ochracea*. Esta especie, junto con otras dos más la incluyen en el género *Detoniella*.

ELLIS (1907) emplea el término *Leptothrix ochracea* para designar la especie tipo de este género y los define como organismos con membrana endurecida y rígida. Generalmente los asocia con *Gallionella ferruginea*.

ORLA-JENSEN, (1909) incluye a las *Leptothrix* como el 5° género de las *Trichobacterias*, cuya característica es: células desunidas, no espiral adas, no ramificadas, sin granulaciones de azufre y filamentosas. Este autor cree que *Gallionella* y *Spirophilum* son formas de crecimiento de este género.

La legitimidad de *Leptothrix ochracea* como nombre de especie es discutida por MOLISCH, que reduce esa designación a un sinónimo del género *Chlamydothrix*.

De esta ligera reseña puede notarse que el género *Leptothrix* se ha usado para designar cuatro formas distintas, a saber:

- 1°) *Leptothrix* como género típico de las algas, que puede o no incluir a *Leptothrix ochracea*.
- 2°) *Leptothrix* como género típico de las bacterias del hierro.
- 3°) *Leptothrix* como género de bacterias alargadas, generalmente de la boca. Especie tipo: *Leptothrix buccalis*.
- 4°) *Leptothrix* organismos alargados en forma de bastón.

Parecería lógico reconocer la *Leptothrix ochracea* como especie tipo por ser la primera designada con ese nombre. Esto limitaría el género a las bacterias del hierro (hoy *Chlamydobacteriales*).

b) Género *Cladothrix*

Cladothrix es un nombre dado por DE CANDOLLES, PRODROMUS (1849) para un género de fanerógamas de la familia de las *Amarantáceas*. Es desde entonces generalmente reconocido y válido para los botánicos.

COHN (1875) usa este nombre para un género de bacterias con una sola especie, *Cladothrix dichotoma*, que vive en aguas impuras. Incoloras, una parte flota en las aguas y la otra parte del filamento está fija a algas muertas. Los filamentos son muy delicados, aparentemente nsegmentados, rectos y algo encorvados como una *Leptothrix* incolora, diferenciándose porque estas últimas no tienen ramificados los filamentos, mientras que *Cladothrix* sí, y con repetida regularidad. Sin embargo no son verdaderas dicotomías, sino falsas ramificaciones.

TREVISAN (1879) incluye este género en la familia de las *Bacteriaceae*, y MAGNIN (1880) sigue la descripción de COHN.

WINTER (1880) describe el género como parecido a *Leptothrix*, delgados filamentos fijos, rectos, falsa dicotomía y con puntas terminadas en espirales. Establece, sin embargo, que es incapaz de distinguir el género *Cladothrix* del *Sphaerotilus*, y concluye diciendo que ambos géneros son semejantes.

SCHROETER (1886) revisó la diagnosis del género *Cladothrix* y *Sphaerotilus* y los consideró como géneros distintos.

MIGULA (1895) definió el género con grandes detalles, como filamentos con vainas, células cilíndricas, falsas ramificaciones, pseudo-dicotomía, multiplicación por gonidios teniendo éstos un manojito de flagelos colocados cerca de un polo.

FISCHER (1897), MIGULA (1900), CHESTER (1897, 1901), HEWLETT (1898), SMITH (1902), FISCHER (1903), JORDAN (1908), ORLA-JENSEN (1909), ELLIS (1909) y HEIM (1911), son autores todos éstos que han seguido la definición de MIGULA. MIGULA decidió que el género *Cladothrix* es sinónimo de *Sphaerotilus*; sin embargo, BUCHANAN cree que las definiciones originales de *Sphaerotilus* y *Cladothrix* son suficientes para garantizar la separación de ambos géneros.

MACE (1897), no acepta el género *Cladothrix* pero sus conclusiones no son aceptadas; sus relatos son muy confusos y tienden a perturbar más aún la nomenclatura de este género.

BUCHANAN (1918) no acepta este género por pertenecer a las fanerógamas.

Parecería que el género *Cladothrix* COHN debe conservarse como un sinónimo de *Sphaerotilus*.

c) Género *Sphaerotilus*

Sphaerotilus es un género descrito por KUTZING (1833) con una sola especie, *Sphaerotilus natans*. Más tarde el mismo autor incluye el género en su *Phycologia generalis* en 1843 con tres especies: *S. natans*, *S. thermalis* y *S. lacteus*. La descripción es la siguiente: « *Stratum floccosum ex globulis minutissimis aggregatis compositum* ». La descripción de la especie *S. natans* es: « *S. natans fuscescens; floccis fugacissimis* ».

Evidentemente es el mismo organismo que describió COHN (1875) bajo el nombre de *Cladothrix*.

DE TONI y TREVISAN (1889) reconocen los dos géneros, y LUDWIG también los reconoce. Muchos autores incluyen el género *Sphaerotilus* en la lista de los géneros abandonados.

ORLA-JENSEN considera en 1909 el género *Sphaerotilus* como sinónimo de *Cladothrix*, y MOLISCH en 1910 considera *Cladothrix* como la correcta designación del género.

El nombre *Cladothrix* es más usado que *Sphaerotilus*, aunque, no obstante, el segundo de los nombrados tiene prioridad.

BUCHANAN (1918) da una definición del género y reconoce únicamente *Sphaerotilus natans* como tipo. BERGEY, en 1923, usa también la misma descripción.

d) Género *Crenothrix*

Este género de bacterias del hierro fué propuesto por COHN en el año 1872 para la especie *Crenothrix polyspora* COHN.

TREVISAN, en 1879, lo incluye en la tribu de las Euvibrionieae.

Este género ha sido reconocido por varios otros autores como WINTER (1880) y GORVE (1884), haciendo resaltar en su definición la forma de clava, con ensanchamiento hacia arriba, y la reproducción por esporas formadas dentro de la vaina por subdivisión de las bacterias. Otros autores que reconocieron este género son: VAN TIEGHEN (1884), ZOPF (1885), FLUGGE (1886), SCHROETER (1886), HANSGIRG (1888), TREVISAN (1889), DE TONI y TREVISAN (1889) y HUEPPE (1885).

MIGULA (1894) da una descripción del género *Crenothrix* que es la que prácticamente usa MOLISCH en 1910.

e) Género *Clonothrix*

Este género de bacterias del hierro fué descrito por SCHORLER (1904), incluyendo una sola especie, *Clonothrix fusca*, con la siguiente diagnosis: « Filamentos dicotómicos o con ramificaciones irregulares fijos, con base y punta diferenciada, terminando en punta por el extremo libre. Vaina constantemente presente en los filamentos jóvenes, luego son más gruesas e impregnadas con óxido de hierro ó manganeso. Multiplicación por medio de conidios pequeños, esféricos e inmóviles, los cuales proceden de la célula vegetativa.

Esta especie produce masas de color gris oscuro, castaño y negro, semejantes a las de *Crenothrix*, y está frecuentemente asociada con ella.

El género es reconocido por ELLIS en 1909 y por MOLISCH en 1910, y BUCHANAN en 1918 da una definición de este género muy semejante a la de SCHORLER y reconoce la especie *Clonothrix fusca* como especie tipo.

BERGEY, en 1923, incluye este género en la familia *Chlamydobacteriaceae*.

Estos géneros están actualmente reunidos en la familia de las *Chlamydobacteriaceae*, nombre propuesto por MIGULA en 1894, para incluir a las bacterias que están caracterizadas por poseer una membrana o vaina, rodeando los filamentos. Los filamentos pueden ser o no ramificados. La familia primeramente descripta contenía los siguientes géneros:

Streptothrix COHN

Phragmidiothrix ENGLER

Crenothrix COHN

Cladothrix COHN

Thiothrix WINOGRADSKY

Este nombre de familia es usado sin alterar su definición por los siguientes autores: SCHMIDT y WEIS (1892), CHESTER (1901), SMITH (1902), KENDALL (1902), MIGULA (1904), SMITH (1905), ELLIS (1909), CLEMENTS (1909) y FROST (1911).

BUCHANAN, en 1918, incluye esta familia en el orden *Chlamydobacteriales* creado por él en 1917.

El nombre de *Chlamydobacteriales* es aceptado por WINSLOW *et al* (Committee Society of American Bacteriologists 1917) y por BERGEY en 1923. La clave dada por BUCHANAN en 1917 es la siguiente:

CLASE SCHIZOMYCETES.

Orden Chlamydobacteriales. — Típicamente producen filamentos como formas regulares de crecimiento. Pueden formarse conidios, pero nunca endosporos. Parecidos a algas, típicas formas acuáticas. Pueden tener falsas pero no verdaderas ramificaciones. Vaina en general evidente, usualmente impregnada con hierro.

Familia Chlamydobacteriaceae:

- 1º) Filamentos generalmente no fijos.
 - a) Filamentos rectos o por lo menos no retorcidos. Género *Leptothrix*
 - b) Filamentos retorcidos. Género *Didymohelix*
- 2º) Filamentos fijos.
 - a) Filamentos no ramificados. Género *Crenothrix*
 - b) Filamentos con pseudo dicotomía o falsa ramificación.
 - (1) Forman células móviles (conidios). Generalmente sin depósito de hierro en las vainas. Género *Sphaerotilus*
 - (2) Conidios estéricos no móviles. Generalmente con hierro. Género *Clonothrix*

BERGEY, en 1923-1934, sigue exactamente la clave de BUCHANAN (*).

2) IDENTIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS ESTUDIADOS

La identificación de las cepas aisladas presentó, como en la mayoría de los casos de sistemática, un problema de difícil solución.

La determinación del género *Leptothrix* no ofreció mayores dificultades, sucediendo lo contrario al procurar identificar sus especies.

La opinión heterogénea de los diversos autores y la falta de algunas descripciones originales contribuyeron a aumentar el número de estas dificultades, y si se tiene todavía en cuenta que estas especies no tienen aún descripciones en cultivo puro, el problema de su sistemática toma un aspecto particularmente complejo.

Las claves que se utilizaron para orientar la clasificación de las cepas aisladas fueron las de BERGEY, NAUMANN y CHOLODNY ⁽⁴⁾ ⁽²³⁾ ⁽¹⁰⁾.

La clave de NAUMANN, muy incompleta para la época actual, sólo se refiere a dos de las nueve especies conocidas del género *Leptothrix*. El carácter que emplea para identificar este género, a saber: « fila-

(*) Con respecto a la última edición del BERGEY (1939), véase págs. 68 a 69.

mentos no incluídos en depósitos de mineralización posterior », es impreciso, pues las especies de este género están en todos los casos incluídas en vainas mucilaginosas, cuya impregnación por hidróxidos de hierro o manganeso, puede interpretarse como una « mineralización posterior ».

La clasificación de CHOLODNY (1926) describe 5 especies de este género, siendo tres de ellas originales. Además algunas de sus descripciones son incompletas, como en el caso de *Leptothrix volubilis*, cuyo único dato específico es que « dicho filamento aparece enroscado en forma de espiral a los filamentos de algas ». Este dato carece lógicamente de valor en cultivo puro, puesto que en él no hay algas, y además es tendencia muy común en los géneros *Leptothrix* y *Sphaerotilus* el presentarse en forma de rulo o enroscados unos filamentos en otros.

En la clave de BERGEY, encontramos cuatro especies correspondientes al género *Leptothrix*, de las cuales, salvo *Leptothrix ochracea*, las restantes no parecen identificarse con las ya descritas por CHOLODNY; por otra parte, BERGEY no reconoce *Leptothrix crassa* y *Leptothrix trichogenes* de CHOLODNY, ni *Leptothrix sideropous* de MOLISCH.

En cuanto a la sistemática de *Sphaerotilus*, la opinión de los autores se divide en dos tendencias: una, acepta el género *Cladothrix* como sinónimo de *Sphaerotilus*, otra considera independiente ambos géneros.

KÜTZING, en 1833, describe una bacteria filamentosa con el nombre de *Sphaerotilus natans*; en 1875, COHN describe otra bacteria filamentosa, con falsas dicotomías, a la que da el nombre de *Cladothrix dichotoma*. Este fué el punto de partida de las controversias, pues DE TONI y TREVISAN ⁽¹¹⁾ (1899); ZIKES ⁽³⁵⁾ (1915); NAUMANN ⁽³⁵⁾ (1933) y otros, los clasifican como especies correspondientes a dos géneros distintos, a saber: género *Sphaerotilus* y género *Cladothrix*; mientras que MIGULA ⁽²¹⁾ (1909); MOLISCH ⁽²²⁾ (1910); BUCHANAN ⁽⁵⁾ (1918) y otros, los identifican en un solo género, al que MOLISCH designa como *Cladothrix* y BUCHANAN como *Sphaerotilus*.

En este trabajo se ha seguido la nomenclatura de BUCHANAN, aceptada por BERGEY, que establece la identidad de ambos géneros y la denominación de *Sphaerotilus*.

Recapacitando sobre las principales características de cada uno de los tres grupos de gérmenes estudiados, y comparándolas con las descripciones ya existentes en la literatura, con el objeto de establecer su posición en la sistemática, llegamos a las siguientes conclusiones:

GRUPO I

Se identifican estas bacterias, como representantes del género *Sphaerotilus* de KÜTZING (1833).

En efecto, la presencia de vainas incoloras, la presencia de pseudo-dicotomías, la facilidad de desarrollar en todos los medios de cultivo ensayados, su afinidad nula con el hierro y el manganeso, el gran tamaño de sus colonias en medios sólidos, sus exigencias respecto a la cantidad de materia orgánica (mayor de 0,05 %), son todas características típicas de este grupo de microorganismos.

GRUPO II

Se identifican estas cepas, como representantes del género *Leptothrix* de KÜTZING (1843).

En efecto, la presencia de vainas coloreadas, la gran afinidad con el hierro y el manganeso, sus exigencias respecto a la calidad y cantidad de materia orgánica, las características morfológicas de sus células y sus colonias, son caracteres propios de este género.

GRUPO III

Este grupo tiene caracteres comunes a ambos géneros: el tamaño y forma de sus colonias, sus exigencias respecto a la cantidad de materia orgánica, coinciden con las del género *Sphaerotilus*; en cuanto al tamaño y forma de sus células, su capacidad de oxidar el hierro y el manganeso, la forma y coloración de su vaina, son propias del género *Leptothrix*.

Considerando la capacidad de oxidación del hierro y el manganeso como características determinantes del género *Leptothrix*, se decide incluir a estas cepas del tercer grupo, en una nueva especie de dicho género.

Si bien es cierto que los resultados no son totalmente comparables, pues las descripciones existentes en la literatura, no se refieren a cultivos puros (salvo el caso de *Sphaerotilus dichotoma* y *Leptothrix ochracea*), puede llegarse a la conclusión que:

Las cepas del grupo I pertenecen todas a la especie *Sphaerotilus dichotomus* (COHN) MIGULA.

Las cepas del grupo II, a las especies *Leptothrix ochracea* (LEIBLEIN) KÜTZING; *Leptothrix sideropous* MOLISCH; *Leptothrix crassa* CHOLODNY.

Las cepas del grupo III, a una nueva especie: *Leptothrix winogradskii* n. sp.

A continuación, se agrega la descripción completa de los géneros y especies encontrados en el curso de la presente investigación.

3) DESCRIPCIÓN DE GÉNEROS Y ESPECIES

Género *Sphaerotilus* KÜTZING. 1833

KÜTZING 1833, Linnaea VIII, 385.

Sinonimia. — *Cladothrix* COHN: *Beitr. z. Biol. de Pfl.*, Bd. 1-1875, pág. 185.

Características

Está formado por células reunidas en largas cadenas y rodeada por una delicada vaina mucilaginosa, siempre presente y que sólo se hace visible con ayuda de colorantes. La vaina es incolora por la afinidad nula que tienen las células con las sales del hierro y del manganeso.

Sus filamentos presentan pseudo-dicotomías. Las células son más o menos redondeadas, casi isodiamétricas, y cambian de forma con suma facilidad aún dentro de la vaina.

Dentro de las células se observan abundantes granulaciones muy pequeñas y en desorden.

Se reproducen por división celular dentro y fuera de la vaina, siendo las células muy móviles al principio y fijándose luego.

En la literatura se citan las siguientes especies:

Sphaerotilus natans KÜTZING.

Sphaerotilus dichotomus (COHN) MIGULA.

Sphaerotilus fluitans (MIGULA) SCHIKORA.

Sphaerotilus reticularis (NAUMANN) n. comb.

Sphaerotilus dichotomus (COHN) MIGULA, 1900

Sinonimia. — *Cladothrix dichotoma*: 1875. Untersuchungen über Bakterien II. *Beitr. z. Biol. d. Pfl.* Bd. 1-1875, pág. 185. MIGULA, *Syst. d. Bakt.*, 1900-2-1033.

Caracteres de cultivo

Agar-extracto de carne. — Colonias muy filamentosas de color blanco brillante. Los filamentos suelen asociarse unos al lado de los otros, formando gruesas cintas que terminan constantemente en

espirales. A las 48 horas de haberse efectuado la siembra, la superficie del agar queda totalmente tapizada por el desarrollo; después de las 48 horas los filamentos se desorganizan y quedan los bastoncitos sueltos.

Agar-citrato de hierro y amonio. — Colonias filamentosas iguales a las del caso anterior.

Caldo de extracto de carne. — Filamentos sedosos y brillantes que desarrollan en forma de velo debajo de la superficie del líquido. Agitando el tubo el velo se rompe y los filamentos caen en forma de ondas brillantes, dando un aspecto singular, y depositándose luego en el fondo del tubo.

Morfología

En cámara húmeda. — El cultivo se presenta en forma de filamentos muy largos y terminados en espiral, con pseudo-dicotomías. Los filamentos son fijos por un extremo, dando en algunos casos al preparado un curioso aspecto por la cantidad y forma de fijarse. Los bastoncitos suelen estar también sueltos, agrupándose alrededor de los filamentos, en montones desordenados. Son móviles y conservan su movilidad durante mucho tiempo.

Se ha podido observar en preparados en película de agar, bastoncitos que aun dentro de la vaina van perdiendo su forma, redondeándose hasta formar verdaderos cocos gigantes. Después de redondearse, aumentan de tamaño hasta adquirir un diámetro 3 ó 4 veces mayor, tomando un aspecto muy semejante a levaduras redondas.

Las granulaciones de las células, son muy numerosas e irregulares, adquieren movimiento desordenado y una velocidad vertiginosa; por su tamaño y forma, se asemejan a células cocoides muy refringentes.

La movilidad dura hasta 24 horas; y a las 48 horas del desarrollo, la mayoría de las células están deformadas.

Este aspecto, que no se produce en todos los preparados, pero que es muy común, merecería un estudio especial para establecer si es un efecto debido al medio ambiente, o si las células deformadas pertenecen a un ciclo de evolución de las bacterias.

Esta última hipótesis tendría en su apoyo, el hecho de que las colonias en agar, después de 2 ó 3 días, parecen perder sus vainas, quedando los bastoncitos sueltos de formas muy diferentes a las primitivas y mucho más grandes.

Estos hechos fueron reproducidos en dibujos en cámara clara, que se adjuntan al final del trabajo, lam. N° 6.

Las células gigantes; se aislaron con el micromanipulador de PETERFI (Zeiss) y fueron puestas en película de agar en cámara húmeda, con el fin de poder vigilar su desarrollo con el microscopio pero, de todas las células aisladas, ninguna fué capaz de reproducirse.

El tamaño de las células normales es de 1,5 micrón de ancho.

Coloraciones. — GRAM y ácidorresistencia: *Negativas*.

Fisiología

Materia orgánica. — Desarrollan en presencia de cantidades de materia orgánica mayores que el género *Leptothrix*. Las cantidades óptimas están entre 0,5 y 1 ‰; después de 0,5 ‰ se produce desarrollo muy escaso.

Asimilan nitrógeno de amoníaco, desarrollan con glucosa, citrato y asparagina. Con extracto de agar no desarrollan bien y con suero normal de caballo (dializado) no lo hacen en absoluto.

Oxidación del hierro y del manganeso. — No oxidan estos metales en ninguno de los medios ensayados.

Relación con el oxígeno. — Aerobios absolutos.

Temperatura óptima. — 37° C.

Temperatura mínima de desarrollo. — 15 ° C.

Relación con el pH del medio. — Desarrollan con igual intensidad desde pH 5 hasta 9,8. No es posible elegir dentro de este intervalo el pH óptimo.

Cromogénesis. — Blanco brillante en todos los medios.

Producción de indol. — Negativa.

Reducción de nitratos. — Reducen los nitratos hasta el estado de nitritos.

Formación de acetil-metil-carbinol. — Negativa.

Licuefacción de gelatina. — Licúa tardíamente.

Influencia de la luz. — Nula.

Formación de hidrógeno sulfurado. — Negativa.

Las láminas correspondientes a esta especie llevan los números 1 y 6.

Género *Leptothrix* KÜTZING. 1843

KÜTZING, 1843, *Phycologica Generalis*, pág. 198.

Este autor usa el nombre de este género, que en esa época pertenecía a la algología, para designar una bacteria filamentosa que confundiera con una alga. Su nombre significa: *Lepto*, fino; *Thrix*, pelo.

Sinonimia. — *Chlamydothrix* MIGULA, 1900, *System der Bakterien*. (*Chlamydo*, túnica). A pesar de que el nombre dado por MIGULA

es más exacto, pues se adapta más a la morfología de estos gérmenes, se siguió usando el nombre de *Leptothrix* por razones de prioridad.

Características

A este género pertenecen células reunidas en filamentos cilíndricos, más bien largos, rodeados por una vaina mucilaginosa impregnada en la mayoría de los casos, con sales de hierro y manganeso.

La reproducción se hace por división de las células dentro y fuera de la vaina. Las células jóvenes son muy móviles y atraviesan el campo del microscopio con mucha velocidad; luego se fijan por uno de sus extremos y forman el nuevo filamento.

En la literatura se citan las siguientes especies:

- Leptothrix ochracea* (LEIBLEIN) KÜTZING.
- Leptothrix epiphitica* (MIGULA) BERGEY.
- Leptothrix fluitans* (MIGULA) BERGEY.
- Leptothrix hyalina* (MIGULA) BERGEY.
- Leptothrix sideropous* MOLISCH.
- Leptothrix crassa* CHOLODNY.
- Leptothrix trichogenes* CHOLODNY.
- Leptothrix lopholea* DORFF.
- Leptothrix pseudovaculata* (PERFILIEV) DORFF.
- Leptothrix echinata* HERBER.
- Leptothrix winogradskii* n. sp.

Leptothrix ochracea KÜTZING. 1843

KÜTZING, *Phycologica Generalis*, 1843, pág. 198.

Sinonimia. — *Lyngbya ochracea* THURET, *Ann. Sci. Nat. Bot.*, VI, 1, 1875, 279. *Chlamydotrix ochracea* MIGULA, *Sistem der Bakterien*, 1900, 2-1031.

Su nombre específico se debe a que sus vainas están constantemente coloreadas de ocre.

Caracteres de cultivo

Agar-citrato de hierro y amonio. — Colonias filamentosas muy extendidas, de tamaño muy grande y con extremos terminados en espirales, visibles a simple vista desde las 24 horas. Incoloras al principio, se colorean luego de color ocre claro, nunca llegan a castaño oscuro.

En los trasplantes sucesivos pierden la facultad de formar fila-

mentos, dando lugar a la formación de colonias no filamentosas, casi redondas, levemente coloreadas de ocre.

Agar-acetato de manganeso. — Colonias incoloras al principio, luego toman tinte castaño, filamentosas, no muy extendidas.

Estría en citrato de hierro y amonio. — Desarrollo abundante que cubre rápidamente la superficie de la estría, formando un velo iridiscente, debido tal vez a la vaina incolora de los bastoncitos. Precipita poco hierro, razón por la cual sus vainas son incoloras en algunos casos.

Estría en acetato de manganeso. — Desarrollan en forma de filamentos muy largos pegados al agar, o flotan en el agua de condensación del tubo.

Caldo de peptona y acetato de manganeso. — Desarrollo abundante, en forma de copos castaño-rojizos, muy sedosos y brillantes que se depositan en el fondo del tubo. En la parte superficial del líquido se forma un anillo pegado a la pared del tubo, que por la abundancia de desarrollo coloreado, le da un aspecto metálico.

Morfología

En cámara húmeda. — Desarrollan en forma de filamentos, con vainas presentes en todos los casos, lisas e incoloras al principio, y después toman color ocre. Los bastoncitos forman cadenas sol-dadas, siendo difícil distinguir la separación de las células, dando un aspecto de filamento continuo sin tabique.

Dentro de los bastoncitos hay granulaciones del mismo ancho que las células, y se ordenan una a continuación de la otra. Son muy refringentes, semejantes a esporas.

Los filamentos son fijos. Nunca se han observado verdaderos conidios. La reproducción se efectúa por división transversal. Los bastoncitos se desprenden de la vaina, luego se fijan y forman un nuevo filamento.

Son móviles; el movimiento comienza algo después de haberse desprendido del filamento, y es muy rápido al principio, luego más lento y de trayectoria ondulada. Termina por fijarse al vidrio por uno de sus extremos que toma el aspecto de una verdadera ventosa. Al microscopio se ve la parte fijada como un círculo incoloro, de cuyo centro parte el filamento, el que después de 8 días se colorea por el manganeso del medio de cultivo. Nunca se observan bastoncitos sueltos.

Las células miden de 0,8 a 1 micrón de ancho, y la vaina, 2 micrones.

Coloraciones. — GRAM y ácidorresistencia: Negativas.

Fisiología

Materia orgánica. — Desarrollan hasta con vestigios de peptona (0,0015 ‰). Desarrollan bien con glucosa, asparagina, citratos y oxalato. No desarrollan casi con fuentes de nitrógeno amoniacales, tampoco con cistina ni suero normal de caballo dializado. Desarrolla con hemoglobina, coloreándose con el hierro de ésta.

Oxidación del hierro y del manganeso. — En cultivo puro son oxidantes del manganeso en todas las sales ensayadas. Oxidan poco el citrato de hierro y amonio. No se colorean con sulfato ferroso ni con hierro reducido, ni con hierro metálico (al estado de cultivo puro).

Relación con el anhídrido carbónico. — Favorecen algo el desarrollo.

Relación con el oxígeno. — No desarrollan en anaerobiosis en los tubos de HALL. En los tubos de agar punción desarrollan en toda la columna de agar hasta el fondo del tubo. El desarrollo puede ser también superficial, o sólo hasta un centímetro por debajo de la superficie del agar.

Temperatura óptima. — 28° C.

Temperatura mínima compatible con el desarrollo. — 15° C.

Relación con el pH del medio. — Desarrollan desde pH 6,6 hasta pH 10, siendo el punto óptimo alrededor de 8.

Cromogénesis. — Amarillo muy claro en citrato de hierro y amonio, castaño rojizo en agar-acetato de manganeso.

Producción de indol. — Negativa.

Reducción de nitratos. — Reducen nitratos hasta el estado de nitritos.

Producción de acetil-metil-carbinol. — Negativa.

Licuação de gelatina. — Negativa.

Influencia de la luz. — Nula.

Formación de hidrógeno sulfurado. — Negativa.

Ilustran esta especie las láminas 2 y 7.

Leptothrix crassa CHOLODNY. 1926

CHOLODNY, 1926. *Die Eisenbakterien* G. FISCHER. Jena, pág. 14.

Sinonimia:

Megalothrix discophora SCHW. SCHWERS, H. 1912. *Megalothrix discophora*, eine neue eisenbakterie Zentralblatt f. Bakt. II. Abt. Bd. 33, pág. 273.

Leptothrix Meyeri ELL. 1913. On the identity of *Leptothrix Meyeri* (ELLIS) and of *Megalothrix discophora* (SCHWERS) with *Crenothrix polysphora* (COHN). Zbl. f. Bakt. II Abt. Bd. 38.

Caracteres de cultivo

Agar-citrato de hierro y amonio. — Colonias más o menos redondeadas, de borde filamentosas, con manchas aceitosas dentro de las colonias, de aspecto brillante. Con lentes de inmersión, las manchas aceitosas, parecen estar formadas por bastoncitos sueltos y no coloreados.

Agar-acetato de manganeso. — Colonias de filamentos gruesos y cortos, con pseudo-dicotomía y terminados en punta.

Agar estría-citrato de hierro y amonio. — El desarrollo se efectúa en forma abundante en el agua de condensación del tubo; suelen desarrollar también en la estría, en cuyo caso el desarrollo es muy extendido; rara vez forman colonias.

Agar estría-acetato de manganeso. — El desarrollo se efectúa en la estría y entre el agar y el vidrio, en forma de manchas circulares de color castaño rojizo.

Caldo de peptona y acetato de manganeso. — Desarrollan en forma de finísimos copos sueltos que se depositan en el fondo del tubo. En la superficie del líquido forman un anillo fuertemente coloreado y pegado a la pared del tubo. Pueden desarrollar también pegados a la pared, formando manchas alargadas.

Morfología

En cámara húmeda. — Filamentos cortos, incoloros cuando jóvenes, que se colorean después de las 24 horas, tomando en este caso un grosor que llega hasta 16 micrones de ancho. Los filamentos terminan en punta y presentan pseudo-dicotomías en algunos casos.

Los bastoncitos miden, de ancho, de 0,5 a 0,8 micrones, y las vainas hasta 16 micrones.

Coloraciones. — GRAM y *ácido*resistencia: Negativas.

Fisiología

Materia orgánica. — El desarrollo se efectúa hasta una cantidad de materia orgánica superior a 0,05 ‰, siendo indiferente que se le agregue o no acetato de manganeso.

Desarrollan bien con glucosa, oxalato, citrato y asparagina. No desarrollan bien con nitrógeno de fuentes amoniacales, con cistina ni con suero normal de caballo dializado.

Relación con el anhídrido carbónico. — No favorece el desarrollo.

Oxidación del hierro y el manganeso. — Oxidan las sales de hierro y manganeso, pero con menor intensidad que *Leptothrix ochracea*.

Temperatura óptima. — Entre 25° y 28° C.

Temperatura mínima. — 15° C.

Relación con el pH del medio. — Desarrollan entre pH 7 y 10, siendo el óptimo pH 8,5.

Relación con el oxígeno. — Son aerobias, en agar punción desarrollan hasta un centímetro por debajo de la superficie.

Cromogénesis. — De color ocre amarillento en citrato de hierro y amonio. Castaño oscuro en acetato de manganeso.

Producción de indol. — Negativa.

Producción de nitratos. — Reducen nitratos hasta nitritos.

Formación de acetyl-metil-carbinol. — Negativa.

Licuefacción de gelatina. — Negativa.

Acción de la luz. — Nula.

Formación de hidrógeno sulfurado. — Negativa.

Las láminas que ilustran esta especie llevan los números 3 y 7.

Leptothrix sideropous (MOLISCH.) CHOLODNY 1926

Sinonimia. — *Chlamydothrix sideropous* MOLISCH. 1910. Die Eisenbakterien. Jena.

Caracteres de cultivo

Agar-citrato de hierro y amonio. — Colonias filamentosas, con filamentos incoloros y manchas de color ocre fuera de los filamentos y de las colonias, que dan el aspecto de filamentos incoloros salpicados con estrellas de color herrumbre.

Con objetivos de inmersión las manchas estrelladas aparecen formadas por grupos de bastoncitos con vainas muy engrosadas por la precipitación del hierro.

Las colonias no son visibles a simple vista hasta transcurridos por lo menos 6 días de la siembra.

Agar-acetato de manganeso. — Colonias de gran tamaño, muy filamentosas y fuertemente coloreadas.

Estría-citrato de hierro y amonio. — Desarrollan en toda la superficie de la estría en forma de colonias aisladas, pero cuando el desarrollo es muy abundante, las colonias llegan a tocarse, cubriendo toda la superficie pero conservando su individualidad.

Estría-acetato de manganeso. — El desarrollo se produce en la estría, en la pared del tubo y entre el agar y el vidrio, en forma de una película continua de aspecto metálico y color castaño rojizo.

Caldo de peptona y acetato de manganeso. — Desarrolla en forma de velo superficial muy delgado y resistente, de aspecto metálico y color castaño rojizo.

Morfología

En cámara húmeda. — Visto con lentes de poco aumento, el campo aparece salpicado con numerosos puntos oscuros.

Visto con mayor aumento, cada uno de esos puntos aparece como el nacimiento de un filamento corto e incoloro cuya base es un trozo de vaina fuertemente impregnado y que en algunos casos toma forma casi circular. Entre mezcladas con las manchas, aparecen los bastoncitos en gran número y formando una verdadera trama.

Después de varios días, las vainas comienzan a impregnarse con manganeso. Toman entonces un aspecto rugoso, debido a que la precipitación del manganeso no es continua.

Los filamentos terminan siempre en punta y crecen siempre de un solo lado.

También se ven bastoncitos sueltos que forman grupos no muy numerosos. Las granulaciones de los bastoncitos son muy visibles aunque pequeñas. Los bastoncitos cuando jóvenes son móviles y se desprenden del resto de la cadena con un movimiento brusco.

Los bastoncitos miden de 0,5 a 0,8 micrones de ancho, y la vaina impregnada, 2 micrones.

Coloraciones. — GRAM y ácidorreacciones: negativas.

Fisiología

Materia orgánica. — Desarrollan con un mínimo de 0,015 % de peptona, es decir, necesitan mayores cantidades que *Leptothrix ochracea*. Desarrollan con glucosa, citrato, oxalato y asparagina. No asimilan bien nitrógeno amoniacal ni desarrollan con cistina ni suero normal de caballo.

Relación con el anhídrido carbónico. — No favorece el desarrollo.

Relación con el oxígeno. — En tubos de HALL no desarrollan. En tubos de agar punción desarrollan sólo hasta un centímetro por debajo de la superficie.

Temperatura óptima. — Desarrollan muy bien entre 25 y 28° C.

Temperatura mínima. — 15° C.

Relación con el pH del medio. — Desarrollan desde pH 6 hasta pH 10, siendo el pH óptimo alrededor de pH 8.

Cromogénesis. — Son de color castaño rojizo en agar acetato de manganeso y en citrato de hierro y amonio.

Producción de indol. — Negativa.

Reducción de nitratos. — Reducen nitratos a nitritos.

Formación de acetil-metil-carbinol. — Negativa.

Licuación de gelatina. — Negativa.

Influencia de la luz. — Nula.

Formación de hidrógeno sulfurado. — Negativa.

Las láminas que ilustran esta especie llevan los números 4 y 8.

Leptothrix winogradskii n. sp.

Caracteres de cultivo

Agar citrato de hierro y amonio. — Colonias muy extendidas, los filamentos se asocian unos con otros, formando gruesas cintas, nunca terminan en espiral.

No se colorean por el citrato de hierro y amonio, siendo de color blanco mate en este medio.

Las colonias son visibles a simple vista desde las 24 horas de la siembra.

Agar-acetato de manganeso. — Colonias filamentosas, de filamentos muy extendidos y coloreados en ocre claro.

Estría citrato de hierro y amonio. — Desarrollo abundante en la superficie en forma de grandes colonias de color blanco mate.

Estría acetato de manganeso. — Desarrollan en el líquido en forma de filamentos, abundantes, algodonosos y opacos, de color castaño terroso muy característico.

Caldo de peptona y acetato de manganeso. — Desarrollo abundante en forma de filamentos muy largos, nunca pegados a la pared del tubo, algodonosos, de color castaño terroso.

Morfología

En cámara húmeda. — El preparado presenta un aspecto límpido, sin manchas oscuras ni bastoncitos sueltos.

La vaina es rígida, sin rugosidades, muy fina y débilmente impregnada de manganeso.

Los bastoncitos forman cadenas muy estables, las granulaciones internas de las células son redondeadas y muy refringentes, dando a los filamentos aspecto de estreptococo.

Los bastoncitos jóvenes son móviles. Miden 0,9 micrones de ancho y la vaina 1,5 micrones.

Coloraciones. — GRAM y ácidorresistencia: negativas.

Fisiología

Materia orgánica. — Sus exigencias respecto a la materia orgánica son similares a las de *Sphaerotilus*, es decir, necesitan un mínimo de 0,5 ‰ de peptona o extracto de carne para desarrollar.

Cabe destacar, que, de todas las especies estudiadas, tanto del género *Leptothrix* como *Sphaerotilus*, ésta es la única capaz de asimilar nitrógeno de fuentes inorgánicas, v. g., sulfato de amonio.

Fué posible, mediante el agregado de sulfato de amonio al 1 %, reducir el mínimo de materia orgánica hasta 0,2 ‰.

Para comprobar la asimilación de nitrógeno inorgánico, se prepararon medios en los que la materia orgánica era glucosa, citrato de sodio u oxalatos alcalinos y sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno. En estos medios se obtuvo abundantes desarrollos de *Leptothrix winogradskii*.

Oxidación del hierro y del manganeso. — Oxidan el manganeso en cualquiera de las sales ensayadas, tomando un color castaño opaco, que se distingue fácilmente del adquirido por las demás especies.

No oxidan el citrato del hierro y amonio, ni el hierro de la hemoglobina, como lo hacen las demás especies.

Relación con el anhidrido carbónico. — Es la única especie de *Leptothrix* cuyo desarrollo es favorecido por el anhídrido carbónico.

Relación con el oxígeno. — Son aerobias absolutas.

Temperatura óptima. — 37° C.

Temperatura mínima. — 15° C.

Relación con el pH del medio. — Desarrollan con igual intensidad entre pH 5 y pH 9,8; sin que sea posible decir que haya un punto óptimo. En este carácter son semejantes a *Sphaerotilus*.

Cromogénesis. — En presencia de sales de manganeso son de color castaño terroso. En los medios con sales de hierro el color es blanco.

Producción de indol. — Negativa.

Reducción de nitratos. — Reducen nitratos a nitritos.

Formación de acetil-metil-carbinol. — Negativa.

Licuefacción de gelatina. — Negativa.

Formación de hidrógeno sulfurado. — Negativa.

Las láminas que ilustran esta especie llevan los números 5 y 8.

4) RESUMEN DE LOS CARACTERES DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

En los cuadros Nos. 4, 5 y 6, que siguen a continuación, están reunidas en forma resumida las características de cultivo y fisiológicas de las cinco especies de *Chlamydobacterales* estudiadas en este trabajo, con el objeto de facilitar su comparación.

CUADRO N° 4. — *Caracteres de cultivo*

	Colonia en agar		Estría en agar de		Caldo de peptona y acetato de Mn
	Citrato de Fe y NH ₄	Acetato de Mn	Citrato de Fe y NH ₄	Acetato de Mn	
<i>Leptothrix ochracea</i>	Colonia muy filamento- sa extendida y bordes terminados en espira- les.	Colonia no muy grande, filamentosa.	Desarrollo muy abun- dante, tapiza toda la estría. Iridiscente.		Abundante desarrollo en forma de copos suel- tos.
<i>Leptothrix crassa</i>	Colonias más o menos redondas, con man- chas aceitosas dentro de la colonia. Bordes filamentosos.	Filamentosa. De fila- mentos muy engrosa- dos y con pseudicoto- mía.	Desarrollo sólo en el agua de condensación del tubo, rara vez en la estría.		Abundante desarrollo en forma de copos suel- tos.
<i>Leptothrix sideropous</i>	Colonia muy filamento- sa. Filamentos incolo- ros y manchas colo- readas rodeando los filamentos y colonias.	Colonia muy grande y muy filamentosa. Fi- lamentos fuertemente coloreados.	Desarrollan sobre la es- tría en forma de colo- nias aisladas, muy co- loreadas.	Desarrollo muy abun- dante, pegado a la es- tría, pero sólo hasta donde llega el agua de condensación del tubo.	Velo superficial muy re- sistente, de aspecto y brillo metálico.
<i>Leptothrix winogradskii</i>	Colonias muy filamento- sas; terminaciones sin espirales. De color blando mate (no pre- cipitan Fe)	Colonia muy filamento- sa, coloreada de casta- ño claro.	Colonias muy grandes y separadas, de color blanco mate.	Filamentos muy largos, algodonosos y colo- reados de castaño cla- ro.	Filamentos muy largos, algodonosos.
	Extracto de agar	Citrato de Fe y NH ₄			Caldo extracto de carne
<i>Sphaerotilus dichotomus</i>	Filamentosa muy exten- dida; tapiza rápida- mente la superficie del agar. Color blanco bri- llante.	Colonia igual que en ex- tracto de carne aun que es menos abun- dante el desarrollo.			Filamentos muy abun- dantes, que desarro- llan en la superficie del líquido. Al agitar- lo cae en forma de on- das. Blanco sedoso.

CUADRO N° 5

Morfología

	Agrupación	Tamaño		Movilidad de la bacteria	Filamentos		
		Bacteria	Vaina		Fijos	Disco de adhesión	Extremos
<i>Leptothrix ochracea</i>	Filamentos muy largos	0.8-1 μ	2 μ	+	Rara vez	Ausentes	Cortados
<i>Leptothrix crassa</i>	Filamentos cortos	0.5-0.8 μ	2-16 μ	+	Rara vez	Ausentes	Afinados
<i>Leptothrix sideropous</i> . . .	Filamentos muy cortos, incoloros	0.5-0.8 μ	2 μ	+	Siempre	Presentes	Afinados
<i>Leptothrix winogradskii</i> . .	Filamentos muy largos	0,9 μ	1,5 μ	+	Nunca	Ausentes	Cortados
<i>Sphaerotilus dichotomus</i> . .	Filamentos muy largos	1,3 μ	—	+	Siempre	Ausentes	Cortados

CUADRO N° 6

Fisiología

	Mínimo de materia orgánica tolerada por el desarrollo	Relación con el CO ₂	Relación con el O	pH	Temperatura óptima	Producción Indol	Reducción de nitratos	Reacción Voges Proskauer	Formación de SH ₂	Licuefacción de gelatina
<i>Leptothrix ochracea</i>	0.0015 ‰	Favorece el desarrollo	Aer. absolutas	8	28° C	—	+	—	—	—
<i>Leptothrix crassa</i>	0.015 ‰	No fav. el desarrollo	Aer. absolutas	8.5	25°-28° C	—	+	—	—	—
<i>Leptothrix sideropous</i>	0.015 ‰	No fav. el desarrollo	Aer. absolutas	8	25-28° C	—	+	—	—	—
<i>Leptothrix winogradskii</i> . . .	1.5 hasta 0.5 ‰	Favorece el desarrollo	Aer. absolutas	5-9.8	37° C	—	+	—	—	—
<i>Sphaerotilus dichotomus</i> . . .	1.5 hasta 0.5 ‰	—	Aer. absolutas	5-9.8	37° C	—	+	—	—	+

5) ADDENDA.

Estando este trabajo en prensa, apareció la 5ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1939), en la cual se ha modificado la clave de pág. 52 y siguientes y agregado algunas sinonimias, en la forma que se transcribe más abajo.

I. — *Diagnosis del Orden y Clave para la determinación de los géneros de las CHLAMYDOBACTERIALES:*

ORDEN III CHLAMYDOBACTERIALES BUCHANAN

(*Jour. Bact.*, 2, 1917, 162)

Bacterias filamentosas, parecidas a las algas, típicas formas acuáticas, con vainas. Pueden no ser ramificadas, o presentar verdaderas o falsas ramificaciones. Es posible que las especies que presentan verdaderas ramificaciones se demuestren eventualmente como especies acuáticas de *Actinomycetales*. Las falsas ramificaciones provienen del desplazamiento lateral de las células del filamento en la vaina, que da lugar a un nuevo filamento de manera que la vaina está ramificada mientras que los filamentos están separados. La vaina puede componerse enteramente de hidróxido de hierro o de una matriz orgánica impregnada con hierro o puede ser enteramente orgánica. Pueden formar conidios móviles pero nunca endosporos. No contienen granulaciones de azufre ni bacteriopurina. Las células maduras o los filamentos no se parecen a protozoarios.

Este orden comprende una sola familia:

Familia I CHLAMYDOBACTERIACEAE MIGULA

(Art. a. d. Bact. Inst. d. techn. Hochschule zu Karlsruhe 1, 184, 273).

Los caracteres de la familia son los mismos que los del orden.

Clave para la determinación de los géneros de la familia

CHLAMYDOBACTERIACEAE

I) Típicas falsas ramificaciones.

A. — Vainas enteramente orgánicas, no impregnadas con hierro.

Género I *Sphaerotilus*

B. — Vainas impregnadas con hierro.

Género II *Clonothrix*

II) Sin ramificaciones, o con ramificaciones verdaderas.

A. — Las células de los filamentos se dividen sólo en forma transversal.

Género III *Leptothrix*

B. — Las células de los filamentos se dividen en tres planos.

Género IV *Crenothrix*

II. — *Sinonimias*: Además de las que figuran en este trabajo, se han agregado las siguientes:

- 1) *Sphaerotilus dichotomus* (Cohn) Migula.

Sinonimia: *Shpaerotilus natans* var. *cladothrix* Butcher Trans. Brit. Myc. Soc., 17 1932, 112.

- 2) Género III LEPTOTHRIX Kützing.

Sinonimia *Leptothrichia* Trevisan (Reale Ist. Lombardo di Sci. e Lettere, Ser. 2. 12, 1879, 138; *Detoniella* De Toni Trevisan en Saccardo Sylloge Fungorum, 8, 1889, 929; *Comidiothrix* Benecke, Bau, u, Leben d. Bakt., 1912, 489; *Megalothrix* Schwers. Cent. f. Bakt. II Abt. 33, 1912, 273; *Syncrotis* Enderlein, Sitzsber. Gessell. Naturf. Freunde Berlin 1917, 312.

- 3) *Leptothrix discophora* (Schwers) Dorff.

Sinonimia: *Leptothrix crassa* Cholodny, Cent. f. Bakt. II Abt. 61. 1924, 292; *Chlamydothrix discophora* Naumann Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 46, 1928, 141; Dorff, Die Eisenorganismen Pflanzenforschung Heft 16, 1934, 31.

- 4) *Leptothrix sideropous* (Molisch) Cholodny.

Sinonimia: *Gallionella sideropous* Naumann, Kungl. Svensk. Vetenskap. sakad., 62, 1931, 33; Cholodny, Die Eisenbakterien, Pflanzenforschung Heft 4, 1926, 25.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Las experiencias realizadas en la presente investigación han permitido deducir las siguientes conclusiones:

1. — El medio de WINOGRADSKY compuesto de heno hervido e hidróxido férrico dió buen resultado para la obtención de cultivos de enriquecimiento de *Leptothrix ochracea*. Además se encontró útil la sustitución del hidróxido férrico por el carbonato de manganeso aconsejado por MOLISCH.

2. — Se ha conseguido aislar las especies de *Leptothrix*, en cultivo puro, por el empleo de diversos medios de cultivo sólidos que se describen en el trabajo. Uno de ellos formado por agar, agua y citrato de hierro y amonio, dió los mejores resultados.

3. — También fué aislada *Sphaerotilus dichotomus* en el medio de BUSGEN con 0,5 ‰ de extracto de carne.

4. — Los métodos en cámara húmeda, cultivos de adhesión y película de agar, han dado resultados satisfactorios para el estudio morfológico de este grupo de bacterias.

5. — El estudio fisiológico ha permitido comprobar que las cepas estudiadas son incapaces de desarrollar en medios absolutamente minerales, que la presencia o ausencia de hierro o manganeso parece no influir sobre la cantidad y calidad de desarrollo, que la oxidación de las sales de manganeso tiene lugar aún con células muertas y que utilizan para su metabolismo sustancias complejas, entre las cuales preferentemente la peptona.

6. — Estos resultados permiten dudar fundamentalmente aún de la autotrofia facultativa de este grupo de bacterias.

7. — El estudio morfológico y fisiológico de las 255 cepas aisladas ha permitido agruparlas en cinco especies que se describen en el trabajo.

CAPITULO VII

RESUMEN

En este trabajo se relata el resultado del estudio fisiológico de algunas *Chlamydobacteriales* orden de las SCHIZOMYCETES, cuya característica principal es la de poseer una vaina que rodea a los elementos celulares.

Representantes de este grupo fueron descriptos por KÜTZING en 1833 y en 1843; COHN en 1870; ZOPF en 1882 y otros.

WINOGRADSKY, en 1888, estudió algunos representantes de este orden y les dió el nombre de bacterias del hierro o ferrobacterias debido a la afinidad con este metal.

En su estudio experimental, dedujo que, a semejanza de las plantas verdes, podían vivir y desarrollarse en ausencia de materia orgánica, efectuando la síntesis de la materia carbonada a partir del anhídrido carbónico del aire. Consiguió cultivarlas con heno hervido e hidróxido férrico.

BÜSGEN, en 1894, cultiva y aísla *Sphaerotilus dichotomus*; MOLISCH, en 1910, y LIESKE, en 1911, obtienen los primeros cultivos puros con material de fuentes ferruginosas naturales en medios puramente orgánicos. Comprobó además MOLISCH que la presencia o ausencia de manganeso no era indispensable para el desarrollo de estas bacterias, siendo estas dos razones las que condujeron a este autor a oponerse a la teoría de WINOGRADSKY.

El material usado en estas investigaciones ha consistido en muestras provenientes de diversos orígenes para poder establecer la posible relación entre la vida de estas bacterias y su « habitat ».

Todas las muestras (100 en total) llegadas al laboratorio en frascos estériles, fueron primeramente sometidas a un examen microscópico y luego se sembraron en diversos medios de cultivo.

De los cultivos de enriquecimiento ensayados, el que ha dado mejores resultados ha sido el del heno hervido en una concentración de 10 a 20 ‰ más carbonato de manganeso; habiendo determinado previamente que el heno debe tener un grado de maceración avanzado y hervirse en una gran cantidad de agua (más o menos 0,5 ‰).

El aislamiento de los representantes de este grupo de bacterias especialmente los del género *Leptothrix* resultó una tarea muy complicada al principio por no conocerse un medio seguro para aislarlas en cultivo puro.

Después de numerosos ensayos con numerosos medios de cultivo se consiguió modificar el medio de BÜSGEN para el aislamiento de *Sphaerotilus dichotoma* mediante el agregado de carbonato de manganeso.

El medio de LIESKE sólo pudo usarse para obtener desarrollo modificando la fórmula original.

Más tarde, con un medio de citrato de hierro y amonio y agar se consiguió aislar las distintas especies del género *Leptothrix* de una manera rápida y segura. La fórmula empleada es la siguiente:

Citrato de hierro y amonio	0,75 gr.
Agar	10 »
Agua corriente	1 litro

Sphaerotilus dichotoma pudo aislarse también con facilidad en el medio anteriormente citado y en el agar de BÜSGEN siguiente:

Extracto de carne	0,5 gr.
Agar	10 »
Agua	1 litro

El material ensayado ha permitido aislar un total de 255 cepas identificadas más tarde como:

Sphaerotilus dictomus (COHN) MIGULA 1900.

Leptothrix ochracea KÜTZING 1843.

Leptothrix sideropous MOLISCH 1910.

Leptothrix crassa CHOLODNY 1926.

Leptothrix winogradskii n. sp.

El estudio de las cepas aisladas está basado en observaciones morfológicas, en preparados directos, en cultivos en cámara húmeda, en preparados coloreados; los caracteres de cultivo fueron observados en siembras hechas en agar en caja de PETRI, en agar estría, en agua de peptona más acetato de manganeso y en el medio de BÜSGEN.

El estudio fisiológico de las mismas planteó como problema previo el hallazgo de un medio que permitiera cultivarlas en estado puro y en suficiente cantidad como para llevar a cabo las experiencias sistemáticas y en serie indispensables para poder comprobar la influencia de diversos agentes sobre los gérmenes en estudio. Conjuntamente se investigó también la capacidad de desarrollo en medios minerales y, según la teoría de WINOGRADSKY, la influencia de las sales de hierro y manganeso en el metabolismo de las mismas.

Con respecto al primer problema los resultados obtenidos han sido los siguientes:

Leptothrix desarrolla preferentemente en peptona como materia

orgánica y acetato de manganeso, como sal de manganeso en las proporciones siguientes:

Peptona	0,5 gr.
Acetato de manganeso.	0,1 »
Agua corriente	1 litro

Sphaerotilus dichotoma desarrolla muy bien en extracto de carne al 0,5 ‰ (medio de BÜSGEN).

Los ensayos hechos con medios minerales dieron todos resultados negativos a pesar de haber ensayado el medio mineral de LIESKE para *Leptothrix ochracea* y aún previendo todas las posibles causas de error.

De las sales de hierro y manganeso puede decirse que en algunos casos favorecen el desarrollo de estas bacterias, en otros la acción es completamente nula y en algunos parecería perjudicial (ver detalle en el cuadro n° 3).

Se ha podido observar además que en ninguna de las experiencias efectuadas en cultivos puros, el hierro ha sido oxidado por estas bacterias mientras que el manganeso lo ha sido en la mayoría de los casos; pudiéndose comprobar que en los casos en que el manganeso no es oxidado ello es debido a la composición del medio de cultivo, mientras que en el caso del hierro éste no es oxidado por efectuarse la oxidación a un pH mayor que 6,8. En ese punto las sales ferrosas son tan inestables que prácticamente son convertidas a férricas. Además la oxidación puede producirse con células muertas.

Estos resultados conducirían a sospechar la posibilidad de que estas bacterias no fueran autótrofas facultativas. Hecho éste que estaría corroborado con las dudas que sobre la autotrofia de estas bacterias han expresado ya BAAS-BAKING y PARK.

Las otras investigaciones fisiológicas consistieron en determinar la influencia del anhídrido carbónico, temperatura, relación con el oxígeno, reacción del medio, poder de reducción de nitratos, formación de hidrógeno sulfurado, de acetil-metil-carbinol, de indol, licuación de gelatina, poder de esporulación e influencia de la luz.

En capítulo aparte se agrupan los resultados de estas investigaciones, que permitieron identificar las cepas antes mencionadas.

La parte sistemática está precedida por la diagnosis de los distintos géneros de las *Chlamydobacteriales* y un breve comentario acerca del género *Leptothrix* y *Sphaerotilus* que son los estudiados en esta investigación.

Además han sido descriptos los géneros y especies por separado, ilustrándolos con fotografías y con dibujos obtenidos con cámara clara.

APENDICE

1) LISTAS DE LAS MUESTRAS DEL MATERIAL Y DE LOS CULTIVOS ESTUDIADOS

CUADRO N° 7. — *Lista de las muestras*

N° de la muestra	Origen	Características	Géneros encontrados	Fecha
1	Tacho herrumbrado	Filamentos pegados a la pared del tacho	<i>Sphaerotilus</i>	1936
2	» »	Agua estancada	»	1936
3	Caño agua corriente obturado	» roja	<i>Leptothrix</i>	1936
4	Tacho herrumbrado	» estancada	<i>Sphaerotilus</i>	1936
5	Tanque de O. S. N.	» coagulante	<i>Leptothrix</i> y <i>Sphaerotilus</i>	1936
6	Caño de agua	» ferruginosa	» » »	1936
7 a 20	» » distribución de agua	Numerosas concreciones	Negativo	1936
21 » 26	Agua del río de la Plata	No ferruginosa	<i>Leptothrix</i>	1936
27 » 32	Tanques O. S. N.	Agua con coagulante	»	1936
33 » 38	» » » »	» después del coagulante	Negativo	1936
39 » 44	Filtros » » »	» con arena de los filtros	<i>Leptothrix</i>	1936
45 » 50	Tanques O. S. N.	» después de los filtros	Negativo	1936
51 » 56	» » » »	» del tratamiento con cloro y antes de entrar a las cañerías	»	1936
57	Canilla del laboratorio	Agua turbia	<i>Leptothrix</i>	1936
58	» de agua de tanque	Turbia rojiza	<i>Sphaerotilus</i>	1936
59	Bujía después de filtrar agua corriente	Sedimento rojo	<i>Leptothrix</i>	1937
60	Agua corriente	Límpida	<i>Sphaerotilus</i>	1937
61	» canilla N° 1	»	Negativo	1937
62	» » » 2	»	»	1937
63	» » » 3	»	»	1937
64	» de tanque canilla N° 4	»	»	1937

CUADRO N° 7. — Lista de las muestras (continuación)

N° de la muestra	Origen	Características	Géneros encontrados	Fecha
65	Agua de tanque canilla N° 5	Límpida	Negativo	1937
66	» » » » » 6	»	»	1937
67	» de arroyito N° 1 (Pcia. Bs. As.) . .	Color roja	<i>Leptothrix</i> y <i>Sphaerotilus</i>	1937
68	» » » » 2 » » » . .	» »	<i>Leptothrix</i>	1937
69	» » arroyo N° 3 (Pcia. Bs. As.) . .	Corriente. Color roja	»	1937
70	» » » » 4 » » » . .	Sucia	Negativo	1937
71	» » laguna Magdalena (Pcia. Bs. As.)	Agua estancada y sucia	<i>Leptothrix</i>	1937
72	» » zanja	Estancada	»	1937
73	Tierra del Delta (Pcia. Bs. As.)		»	1937
74	Tierra de jardín (Cap. Federal)		<i>Leptothrix</i>	1937
75	Agua de «El Chocoy» (Pcia. de La Rioja) ⁽¹⁾	Ferruginosa	»	1937
76	» del río 1° (Prov. Córdoba)		»	1937
77	» » » 2° » »		»	1937
78	» de La Toma (Cosquín, Córdoba) . .		<i>Leptothrix</i> y <i>Sphaerotilus</i>	1937
79	» del arroyo Hudson (Pcia. Bs. As.) .	Copos de <i>Chlamydo bacteriales</i>	» » »	1937
80	Tierra y raíces	Con manchas de hierro	<i>Leptothrix</i>	1937
81	Agua del río de la Plata (Hudson, Bs. As.)		Negativo	1937
82 y 83	Tierras del Delta		»	1937
84	Tierra de Concordia (Pcia. E. Ríos) . .	Ferruginosa colorada	<i>Leptothrix</i>	1937
85	Agua del canal Arias (R. de Plata) . .		»	1937
86	» de charco a orillas del Paraná Miní		<i>Leptothrix</i> y <i>Sphaerotilus</i>	1937
87	Paraná Las Palmas y Canal Arias . . .	Filtrada del suelo ferruginoso	<i>Leptothrix</i>	1937

(1) La autora se complace en agradecer aquí al Sr. A. Mendez administrador del I. B. del D. N. de H. por cuya gentileza le fué posible conseguir las dos únicas muestras de aguas ferruginosas de fuentes naturales estudiadas en este trabajo.

CUADRO N.º 7. — *Lista de las muestras (conclusión)*

N.º de la muestra	Origen	Características	Géneros encontrados	Fecha
88	Tierra de la orilla del Canal La Serna . .	Ferruginosa	Negativo	1937
89	Orillas del río Miní		<i>Leptothrix</i> y <i>Sphaerotilus</i>	1937
90	Agua de charco a orillas del Paraná Miní .	Estancada con filamentos de <i>Chlamydo-</i> <i>bacteriales</i>	» »	1938
91	Charco N.º 1 San Isidro.		<i>Leptothrix</i>	1938
92	» » 2 » »		<i>Leptothrix</i> y <i>Sphaerotilus</i>	1938
93	» » 3 » »		<i>Leptothrix</i>	1938
94	» » 4 » »		»	1938
95	» » 5 » »		»	1938
96	Fuente «El Chocoy» (Peia. La Rioja). .	Ferruginosa	»	1938
97	Agua del río Carapachay	Con filamentos de <i>Chlamydobacteriales</i> . .	»	1938
98	Barro a orillas del río Carapachay . . .		»	1938
99	Agua estancada en zanja	Los filamentos de <i>Chlamydobacteriales</i> for- man un espeso velo	»	1938
100	» de zanja			1938

CUADRO N° 8. — *Lista de los cultivos estudiados**Grupo I*

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
1	2S- 1-1	Agua de tacho herrumbrado	29-VI-936
2	2S- 2-1	» » » »	»
3	2S- 2-2	» » » »	»
4	2S- 4-1	» » » »	»
5	2S- 4-2	» » » »	»
6	2S- 4-3	» » » »	»
7	2S- 5-1	» » » »	»
8	2S- 6-1	» » » »	»
9	2S- 6-2	» » » »	»
10	2S- 7-1	» » » »	»
11	2S- 8-1	» » » »	»
12	2S- 8-2	» » » »	»
13	2S- 9-1	» » » »	»
14	2S- 9-6	» » » »	»
15	60-12-1	Charco orillas río (San Isidro)	5-II-938
16	60-12-2	» » » » »	»
17	60-12-3	» » » » »	»
18	60-12-4	» » » » »	»
19	60-12-5	» » » » »	»
20	60-12-6	» » » » »	»
21	60-16-1	» » » » »	»
22	60-16-2	» » » » »	»
23	60-16-3	» » » » »	»
24	60-16-4	» » » » »	»
25	60-16-5	» » » » »	»
26	60-18-1	» » » » »	»
27	60-18-2	» » » » »	»
28	60-18-3	» » » » »	»
29	60-18-4	» » » » »	»
30	60-20-1	» » » » »	»
31	60-20-2	» » » » »	»
32	60-20-3	» » » » »	»
33	60-20-4	» » » » »	»
34	60-20-5	» » » » »	»

CUADRO N° 8. — *Lisis de los cultivos estudiados (Continuación)*
Grupo II

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
35	10-2- 3-2	Agua estancada	IX-936
36	10-2- 3-4	» »	»
37	30-5- 5-1	Tierra	»
38	30-5- 8-2	»	»
39	30-5-10-2	»	»
40	33- 6-4	Agua río (Hudson)	V-937
41	34- 1-2	» charco (Hudson)	»
42	34- 1-3	» » »	»
43	34- 1-4	» » »	»
44	34- 1-5	» » »	»
45	34- 1-6	» » »	»
46	34- 1-8	» » »	»
47	35- 5-3	Tierras ferruginosas (Corrientes) . . .	VI-937
48	37- 1-1	» » »	»
49	37- 1-2	» » »	»
50	37- 1-3	» » »	»
51	37- 1-4	» » »	»
52	37- 1-5	» » »	»
53	37- 2-1	» » »	»
54	37- 2-2	» » »	»
55	37- 2-4	» » »	»
56	37- 7-4	» » »	»
57	38- 3-1	Agua estancada	VII-937
58	38- 3-2	» »	»
59	38- 3-3	» »	»
60	38- 3-4	» »	»
61	38- 4-1	» »	»
62	38- 4-2	» »	»
63	38- 4-4	» »	»
64	38- 4-5	» »	»
65	38- 5-1	» »	»
66	38- 5-2	» »	»
67	38- 5-3	» »	»
68	38- 5-4	» »	»
69	38- 5-5	» »	»
70	39- 4-2	» »	»
71	39- 4-3	» »	»
72	39- 4-4	» »	»
73	39- 4-5	» »	»
74	39- 4-6	» »	»
75	39- 5-1	» »	»
76	39- 5-2	» »	»

CUADRO N° 8. — *Lista de los cultivos estudiados. (Continuación)*
Grupo II (Continuación)

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
77	39- 5-3	Agua estancada	VII-937
78	39- 5-4	» »	»
79	39- 5-5	» »	»
80	39- 5-6	» »	»
81	39- 5-7	» »	»
82	39- 7-1	» »	»
83	39- 7-2	» »	»
84	39- 7-3	» »	»
85	39- 7-5	» »	»
86	39- 7-3	» »	»
87	40- 1-2	Tierra ferruginosa	VII-937
88	40- 1-4	» »	»
89	40- 1-5	» »	»
90	40- 2-2	» »	»
91	40- 2-3	» »	»
92	40- 2-4	» »	»
93	40- 2-5	» »	»
94	40- 5-1	» »	»
95	40- 5-2	» »	»
96	40- 5-3	» »	»
97	40- 5-4	» »	»
98	40- 5-5	» »	»
99	40- 8-1	» »	»
100	40- 8-2	» »	»
101	40- 8-3	» »	»
102	40- 8-4	» »	»
103	40- 8-5	» »	»
104	48- 8-6	Agua ferruginosa	VII-937
105	40- 8-7	» »	»
106	40- 9-1	» »	»
107	40- 9-2	» »	»
108	40- 9-3	» »	»
109	40- 9-4	» »	»
110	40- 9-5	» »	»
111	42- 5-3	» »	»
112	42- 5-5	» »	»
113	42- 5-6	» »	»
114	42- 5-7	» »	»
115	42- 6-2	» »	»
116	42- 6-4	» »	»
117	42- 6-6	» »	»
118	42- 8-4	» »	»

CUADRO N° 8. — *Lista de los cultivos estudiados (Continuación)*
Grupo II (continuación)

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
119	43- 3-1	Agua ferruginosa	VII-937
120	43- 5-1	» »	»
121	43- 5-3	» »	»
122	44- 2-3	» »	»
123	44- 3-2	» »	»
124	44- 3-3	» »	»
125	44- 3-4	» »	»
126	44- 4-1	» »	»
127	44- 4-3	» »	»
128	44- 4-4	» »	»
129	44- 4-5	» »	»
130	44- 5-1	» »	»
131	44- 5-2	» »	»
132	44- 5-3	» »	»
133	44- 6-3	» »	»
134	45- 2-3	» »	»
135	45- 3-1	» »	»
136	45- 3-2	» »	»
137	45- 3-4	» »	»
138	47- 1-1	» »	»
139	47- 1-2	» »	»
140	47- 1-4	» »	»
141	47- 8-1	Agua fuente ferruginosa	8-VIII-937
142	47- 8-3	» » »	»
143	47- 8-5	» » »	»
144	51- 6-1	Agua estancada orilla río (Delta) . . .	5-X-937
145	51- 6-3	» » » »	»
146	52- 3-1	» filt. del suelo. Orilla río	»
147	52- 5-1	» » » » »	»
148	52- 6-1	» » » » »	»
149	52- 6-4	» » » » »	»
150	52- 7-1	» » » » »	»
151	52- 7-2	» » » » »	»
152	52- 9-1	» » » » »	»
153	52- 0-4	» » » » »	»
154	53- 1-5	» estancada orilla río	»
155	55- 1-2	» » » »	»
156	55- 2-1	» » » »	»
157	55- 2-2	» » » »	»
158	55- 2-3	» » » »	»
159	57- 6-1	» de arroyo (Delta)	»

CUADRO N° 8. — *Lista de los cultivos estudiados (Continuación)*
Grupo II (continuación)

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
160	60- 2-2	Charco orilla río (San Isidro)	5-II-938
161	60- 2-3	» » » » »	»
162	60- 2-4	» » » » »	»
163	60- 5-2	« « « » »	»
164	60- 5-4	» » » » »	»
165	60-13-2	» » » » »	»
166	60-15-1	» » » » »	»
167	60-15-2	» » » » »	»
168	60-15-3	» » » » »	»
169	60-15-4	» » » » »	»
170	60-21-1	» » » » »	»
171	60-21-2	» » » » »	»
172	60-21-3	» » » » »	»
173	60-21-4	» » » » »	»
174	60-21-5	» » » » »	»
175	60-21-6	» » » » »	»
176	60-21-7	» » » » »	»
177	60-21-8	» » » » »	»
178	60-21-9	» » » » »	»
179	60-21-10	» » » » »	»
180	61-11-1	Agua charco N° 2.	»
181	61-11-2	» » » » »	»
182	61-12-2	» » » 2.	»
183	61-12-3	» » » »	»
184	61-12-4	» » » »	»
185	61-12-5	» » » 2.	»
186	61-14-1	» » » »	»
187	61-14-2	» » » 2.	»
188	62- 4-1	Barro ferruginoso	»
189	62- 4-3	» »	»
190	62- 9-1	»	»
191	62- 9-3	» »	»
192	62- 9-4	» »	»
193	62- 9-5	» »	»
194	62- 9-6	» »	»
195	62- 9-7	» »	»
196	62- 9-9	» »	»
197	62-10-2	» »	»
198	62-10-3	» »	»
199	62-10-4	» »	»
200	62-10-6	» »	»
201	62-13-1	» »	»

CUADRO N° 8. — *Lista de los cultivos estudiados (Continuación)*
Grupo II (continuación)

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
202	63-10-1	Agua ferruginosa	9-II-938
203	63-10-2	» »	»
204	63-10-3	» »	»
205	63-10-4	» »	»
206	63-10-5	» »	»
207	63-10-8	» »	»
208	63-10-9	» »	»
209	63-10-10	» »	»
210	63-10-12	» »	»
211	63-11-12	» »	»
212	63-11-3	» »	»
213	63-11-4	» »	»
214	63-12-1	» »	»
215	63-12-2	» »	»
216	63-12-3	» »	»
217	63-12-4	» »	»
218	63-12-5	» »	»
219	63-13-2	» »	»
220	63-13-1	» »	»
221	63-16-1	» »	»
222	63-16-4	» »	»
223	63-16-5	» »	»
224	63-17-2	» »	»
225	63-17-3	» »	»
226	63-17-4	» »	»

CUADRO N° 8. — *Lista de los cultivos estudiados (Conclusión)**Grupo III*

N° de orden	Denominación	Origen	Fecha de aislamiento
227	36-1-1	Tierra de jardín.	VI-937
228	36-1-2	» » »	»
229	36-1-4	» » »	»
230	36-1-5	» » »	»
231	36-1-6	» » »	»
232	36-3-5	» » »	»
233	36-3-2	» » »	»
234	36-3-4	» » »	»
235	36-3-5	» » »	»
236	36-4-1	» ferruginosa (Corrientes)	»
237	36-4-2	» » »	»
238	36-4-3	» » »	»
239	36-4-4	» » »	»
240	36-4-5	» » »	»
241	36-4-6	» » »	»
242	36-5-1	Tierra ferruginosa (Corrientes)	VI-938
243	36-5-2	» » »	»
244	36-5-3	» » »	»
245	36-5-4	» » »	»
246	36-5-5	» » »	»
247	36-6-1	» » »	»
248	36-6-2	» » »	»
249	36-6-3	» » »	»
250	36-6-4	» » »	»
251	36-6-5	» » »	»
252	36-7-3	» » »	»
253	36-7-4	» » »	»
254	36-7-5	» » »	»
255	36-7-6	» » »	»

2) MEDIOS DE CULTIVO, MÉTODO Y TÉCNICAS EMPLEADAS

MEDIOS DE CULTIVO

Mosto de malta: Se ha preparado modificando algo la fórmula original de HENNEBERG ⁽¹⁴⁾:

Harina de malta (secada y libre de raíces, molida)	250 gr.
Agua corriente	1.000 cc.

Se calienta el agua a 59° C, se le agrega la malta y se mantiene a baño maría 45° C durante media hora con el fin de poner las diastasas en libertad; se aumenta luego la temperatura hasta 58° C o 60° C, tardando para esto media hora. Se mantiene esta temperatura durante dos o tres horas para que se efectúe la sacarificación del almidón. Al cabo de este tiempo se prueba la reacción con iodo; si todo el almidón se ha transformado, no dará coloración azul; de lo contrario, se prolonga por un rato más a esa temperatura hasta que todo el almidón se haya sacarificado. Al final se pasa todo por un lienzo para separar la parte sólida del líquido, se le agrega luego una clara de huevo batida con un volumen igual de agua y se lo lleva al autoclave durante una hora a 100° C para precipitar. Se filtra por papel y se toma la densidad con un escarímetro, diluyéndose luego a 10° Brix. Se le agrega 2 % de agar llevándose nuevamente al autoclave a 100° C para fundir el agar. Se filtra por papel, se distribuye en tubos y se tindaliza durante tres días a 100° C.

Medio de BUSGEN:

Extracto de carne	0,5 gr.
Agua	1.000 cc.

Disolver en caliente el extracto de carne, filtrar por papel y repartir en tubos de ensayo. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos.

Al caldo preparado de acuerdo al método anterior se le agrega 10 gr. de agar cortado en pedazos pequeños. Fundir en el autoclave a 120° C durante 15 minutos. Filtrar por algodón, repartir en tubos como para punción y esterilizar a 120° C por 15 minutos.

Medio de BUSGEN con carbonato de manganeso: Al medio anterior se le agrega 0,5 gr. de carbonato de manganeso por litro de medio. Entubar agitando cada vez para evitar que precipite el manganeso. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos.

Medio de acetato de manganeso: Se ha preparado modificando la fórmula original de LIESKE:

Acetato de manganeso	0,1 gr.
Agar	10 »
Agua corriente	1.000 »

Fundir el agar en autoclave a 120° C y luego se agrega el acetato de manganeso. Filtrar por algodón y distribuir en tubos por estría. Esterilizar a 120° C. Solidificarlo en forma de pico de flaura. Una vez solidificado es aconsejable agregar a cada tubo 1 ó 2 cc. de agua estéril para favorecer el desarrollo de los gérmenes. Colocar en estufa durante dos, tres o cuatro días para control de esterilidad. Los

tubos destinados a caja deben ser preparados con una cantidad menor de agar (0,75 %).

Medio de citrato de hierro y amonio:

Citrato de hierro y amonio	0,75 gr.
Agar	10 »
Agua corriente	1.000 »

Se funde el agar en autoclave a 120° C por espacio de 15 minutos. Se filtra por algodón y se reparte a razón de 10 cc. por tubo. Se esteriliza a 120° C durante 15 minutos.

Aparte se prepara una solución de citrato de hierro y amonio al 0,75 % que se esteriliza a 110° C por 20 minutos.

En el momento de usar los tubos se le agrega 1 cc. de la solución de citrato de hierro y amonio y la cantidad de hidróxido sódico N/10, esteril, previamente calculada para que el pH sea alrededor de 8.

Puede agregarse el citrato de hierro y amonio después de fundir el agar, lo mismo que el álcali necesario, pero como el citrato de hierro y amonio es una sal férrica que contiene no mucha cantidad de hierro ferroso, al alcalinizar éste se oxida rápidamente a férrico. Sin embargo por razones de comodidad puede hacerse, pero en tal caso conviene tindalizar a 100° C durante tres días. Los tubos destinados a estrías, una vez solidificados, debe agregárseles una cierta cantidad de agua como en el medio del acetato de manganeso.

Caldo común de extracto de carne (28):

Extracto de carne	3 gr.
Peptona	5 »
Agua destilada	1.000 cc.

Disolver el extracto de carne y la peptona a temperatura de ebullición. Arreglar la reacción del medio a pH 6,8. Precipitar en autoclave a 120° C durante 15 minutos. Filtrar por papel y distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos.

Agar de extracto de carne (28): Al caldo de extracto de carne y peptona se le agrega 1,2 % de agar en polvo ó 1,5 % de agar comercial (en rama). Fundir en autoclave a 120° C y repartir en tubos destinados a punción y estría. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos.

Medio de peptona y acetato de manganeso:

Peptona (Parke Davis)	0,5 gr.
Acetato de manganeso	0,1 »
Agua corriente	1.000 cc.

Disolver en caliente la peptona, agregar el acetato de manganeso, verificar la reacción, que generalmente no hay necesidad de arreglar porque el acetato de manganeso alcaliniza lo suficiente el medio para que el desarrollo se produzca en buenas condiciones. Distribuir en tubos y esterilizar a 120° C por 15 minutos.

Extracto de agar:

Agar (en rama)	20 gr.
Agua corriente	1.000 cc.

Cortar el agar en pedazos pequeños; fundir en autoclave. Colocar en un recipiente para que se solidifique. Una vez solidificado, cortarlo en pedazos del menor tamaño posible. Agregarle 1.000 cc. de agua corriente y colocarlo en la heladera durante varios días para que no desarrollen gérmenes y pasen todas las sustancias solubles del agar al agua. Se filtra por papel, se reparte en tubos y se esteriliza a 120° C durante 15 minutos.

Medio mineral de LIESKE (18):

Bicarbonato de manganeso (Sol. saturada)	100 cc.
» sódico	0,1 gr.
Sulfato amónico	0,1 »
Fosfato bipotásico	vestigios
Sulfato magnésico	»
Agua destilada	900 cc.

El bicarbonato de manganeso se obtiene haciendo burbujear anhídrido carbónico en una suspensión de carbonato de manganeso. Luego se filtra y se agrega al medio. Se esteriliza a 120° C.

Medio mineral de WINOGRADSKY (32):

Sulfato amónico	1 gr.
Fosfato bipotásico	1 »
Cloruro sódico	2 »
Sulfato magnésico	0,5 »
» ferroso	vestigios
Carbonato magnésico	exceso
Agua destilada	1 litro

El carbonato de magnesio se esteriliza aparte a 180° C.

El medio líquido se esteriliza a 120° C.

REDUCCIÓN DE NITRATOS

Medio de peptona nitrada:

Peptona	0,5 gr.
Nitrato potásico	1 »
Agua destilada	1 litro

Disolver la peptona en caliente, agregar el nitrato potásico, arreglar la reacción a pH 8 y esterilizar. Después de 1-2-3-4-7 y 10 días de incubación se observa la formación de burbuja y se investiga nitratos.

Reactivo de PETER-GRIESS modificado por ILOSVAY VON ILOVA (28):

Solución A

Acido sulfanílico	8 gr.
» acético	300 cc.
Agua destilada	1 litro

Solución B

Alfa-naftil-amina	5 gr.
Acido acético	300 cc.
Agua destilada	1 litro

Para efectuar la reacción se agrega igual número de gotas de la solución A y B. Un color rojo intenso indica la presencia de nitritos.

Reactivo de TROMSDORFF:

Solución de cloruro de zinc al 20 % . . .	100 cc.
Almidón	4 gr.
Ioduro de zinc	2 »
Agua destilada hasta 1 litro.	

Agregar la solución de cloruro de zinc hirviendo sobre el almidón agitando constantemente; después que todo el almidón se haya disuelto, se diluye con un poco de agua destilada. Añadir el ioduro de zinc y continuar diluyendo con agua hasta llegar a un litro.

La reacción se efectúa agregando una gota de ácido sulfúrico diluido al tercio, sobre una placa de prueba, tres gotas de reactivo y una gota de cultivo. La coloración azul indica la presencia de nitritos y es debida al iodo puesto en libertad por los nitritos.

FORMACIÓN DE HIDRÓGENO SULFURADO

Método de KLIGLER (modificado):

Medio de cultivo: Preparar agar-agua y repartir en tubos a razón de 5 cc. cada uno. Esterilizar a 120° C. En el momento de usarlo, se licúa y entibia el agar y se le agrega 2,5 cc. de una solución de glucosa al 0,4 % tindalizada previamente e igual cantidad de una solución de acetato de plomo (básico) al 0,2 % también tindalizada. Se hacen solidificar de nuevo los tubos después de mezclar bien el contenido. Se siembra con un hilo de platino, cargado con el material a sembrar en tres zonas distintas del tubo entre el agar y el vidrio. Después de incubar 1-2-3 o más días se observa una coloración negruzca en caso de que las bacterias hayan producido hidrógeno sulfurado.

Método de WILSON (modificado):

Técnica: A 100 cc. de agar-agua-glucosa al 1 % agregar 1 cc. de una solución al 8,1 % de cloruro férrico; 0,5 cc. de hidróxido sódico al 12 % y 5 cc. de sulfito sódico anhidro al 20 %. Repartir en tubos hasta más o menos la mitad. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos. La siembra y los resultados se ejecutan como en el caso anterior.

FORMACIÓN DE ACETIL-METIL-CARBINOL

Medio de cultivo. Fórmula original: En esta experiencia se usó el medio de cultivo de VOGES PROSKAUER en su fórmula original y 10 veces más diluida, porque muchas cepas se resistían a desarrollar en un medio con tanta materia orgánica.

Peptona	5 gr.
Glucosa	5 »
Fosfato bipotásico	5 »
Agua destilada	1.000 cc.

Se calienta a la llama directa durante 20 minutos y agitando de tiempo en tiempo las sustancias mencionadas disueltas en 800 cc. de agua. Se filtra por papel, se enfría a 20° C y se diluye a un litro. Se reparte en tubos a razón de 10 cc. cada

uno y se esteriliza por tinalización 20 minutos a 100° C durante tres días consecutivos.

Otra fórmula que se usó fué la siguiente:

Extracto de agar	1.000 cc.
Glucosa	1 gr.

Se siembra y se incuba por 3 ó 5 días a 28° C. Después de este plazo se le agrega a 5 cc. de cultivo un volumen igual de hidróxido potásico al 10 %. Dejando los tubos en reposo durante una noche, a estufa de 37° C, la aparición de una coloración rojiza indica la presencia de acetil-metil-carbinol, formado como producto de transformación de la glucosa.

REACCIÓN DEL INDOL

Reactivo de KOVACS:

Para-dimetil-amino-benzo-aldehído	5 gr.
Alcohol amílico	75 cc.
Acido clorhídrico concentrado	25 »

Se disuelve en baño maría a 50-60° C el aldehído en el alcohol amílico, se enfría la solución y se le agrega el ácido clorhídrico tratando de enfriar a medida que es caliente la solución.

A un cultivo de 3 ó 4 días en el medio indicado, se le agrega unas 25-30 gotas del reactivo, se agita suavemente y se deja reposar para que se separe la capa de alcohol amílico que en presencia de indol aparece de color rojo intenso.

Pero más específica para indol es la modificación de GORE con la técnica de ERlich. Se moja la parte inferior del tapón de algodón, que esté bien seco y blando, del tubo de cultivo que se va a investigar indol, con 4-6 gotas de la solución. A dada a continuación y 4-6 gotas de la solución B.

Solución A

Para-dimetil-amino-benzo-aldehído	1 gr.
Alcohol etílico	95 cc.
Acido clorhídrico concentrado	20 »

Solución B

Persulfato de potasio (solución acuosa saturada).

En la parte inferior del tapón del tubo se colocan 4 ó 5 gotas de la solución A y 4 ó 5 de la solución B.

El tapón se introduce en el tubo hasta 2 cm más o menos de la superficie del cultivo. Manteniendo el tubo en posición vertical, se coloca en un baño maría en ebullición, tratando siempre de no mojar el tapón. Después de 15 minutos, si se observa una coloración roja intensa en el tapón, indica la presencia del indol, que es volátil. Otras sustancias afines pero no volátiles como el alfa-metil-indol, por ejemplo, no dan reacción.

TÉCNICAS DE COLORACIONES

Estas técnicas fueron copiadas del *Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacterias* de la Society of American Bacteriologists. Committee on Bacteriological Technic. Geneva, New York, 1937.

Fucsina de ZIEHL: para coloración simple. La fórmula y la técnica de preparación se dará más adelante, en el método ZIEHL-NEELSEN para ácido-resistencia.

Azul de metileno (solución acuosa):

Azul de metileno	1 gr.
Alcohol (95 %)	10 cc.
Agua destilada	90 »

En un mortero se coloca el azul de metileno en polvo y el alcohol, tratando de agitar hasta que se disuelva completamente. Agregar el agua destilada y filtrar por papel.

Técnica: Después de fijar el preparado por el calor se colorea durante un minuto con el colorante, se lava con agua, se seca y se observa con inmersión.

Solución acuosa de nigrosina (para preparados negativos):

Nigrosina	0,1 gr.
Agua destilada	100 »

Se mezcla y se filtra por papel.

Técnica: Colocar sobre un porta objeto bien limpio una gota de la solución de nigrosina y una gota del material de ensayo. Con otro portaobjeto o bien con una pipeta PASTEUR se hace un frotis. Secar y observar con inmersión.

Coloración de GRAM (modificación de HUCKER):

Solución A

Cristal violeta (con 85 %)	3 gr.
Alcohol etílico (95 %)	25 cc.

Solución B

Oxalato de amonio	0,8 gr.
Agua destilada	80 cc.

Mezclar las soluciones A y B.

Lugol

Iodo	1 gr.
Ioduro de potasio	2 »
Agua destilada	300 cc.

Colorante de contraste

Safranina (2,5 % sol. en 95 % de alcohol etílico)	10 cc.
Agua destilada	100 »

Técnica: Después de fijado el preparado se colorea con cristal violeta durante un minuto, se lava con agua y se trata el preparado con solución de lugol por un minuto. Decolorar con alcohol etílico de 95 % durante 30 segundos y colorear con el colorante de contraste por 10 segundos. Se lava, seca y observa con lente de inmersión.

Método de GRAM (modificado por KOPELOFF y BEERMAN).

Solución A

Violetade genciana o cristal violeta	1 gr.
Agua destilada	100 cc.

Solución B

Bicarbonato sódico	1 gr.
Agua destilada	20 cc.

Lugol

Iodo	2 gr.
Solución de hidróxido sódico N/1	10 cc.
Agua destilada hasta 100 cc.	

Colorante de contraste

Fucsina básica	0,1 gr.
Agua destilada	100 cc.

Técnica: Fijar el preparado y colorear 5 minutos con una mezcla de las soluciones A y B, en la proporción de 1,5 cc. de la solución A y 0,4 cc. de la solución B. Lavar con lugol, renovando y haciendo actuar 2 minutos. Eliminar el líquido y sin lavar secar. Decolorar con acetona 100 % dejando caer el líquido gota a gota sobre el preparado hasta que no se decolore (por lo general esto se cumple en un tiempo menos que 10 segundos. Secar al aire y colorear con el colorante de contraste durante 10 a 30 segundos. Lavar con agua, secar y observar con lente de inmersión.

Método de ZIEHL-NEELSEN para ácidorresistencia:

Solución A

Fucsina básica (90 % de contenido)	0,3 gr.
Alcohol etílico (95 %)	10 cc.

Solución B

Acido fénico	5 gr.
Agua destilada	95 cc.

Mezclar las soluciones A y B.

Técnica: Fijar el preparado y colorear con una mezcla de las soluciones A y B filtrada durante 2 ó 3 minutos en caliente o durante 15 minutos en frío. Lavar con agua, decolorar con una mezcla de alcohol etílico de 95 % y 3 % de ácido clorhídrico. Lavar con agua y colorear con una solución acuosa de azul de metileno. Lavar y secar. Observar con objetivo de inmersión. Las bacterias ácidorresistentes aparecerán de color rojo. Las no ácidorresistentes de color azul.

PREPARADOS EN CÁMARA HÚMEDA

Método de FORTNER modificado por SORIANO: Este método fué usado por el autor para el estudio morfológico de levaduras, y resultó perfectamente adaptable para este grupo de bacterias filamentosas.

Un portaobjeto de una sola excavación (modelo KOCH de 16 mm. de diámetro), bien desengrasado, se esteriliza a la llama y se deja enfriar con la excavación hacia abajo. Es cómodo apoyar un borde en una pipeta PASTEUR esterilizada.

Con un pincelito pequeño embadurnado con vaselina fundida (puede hacerse esto a la llama veladora de un mechero) se dibuja un aro alrededor de la excavación del porta.

Se toma un cubreobjeto cuadrado (18×18 mm.), se lo desengrasa, y sosteniéndolo por uno de sus vértices con una pinza CORNET, se lo esteriliza a la llama. Se deja enfriar con la superficie estéril vuelta hacia abajo.

Sobre la parte estéril del cubre, se vierte una gota de agar nutritivo fundido y entibiado a 60° . Esto puede hacerse con ayuda de una pipeta o directamente con el tubo de agar.

El cubre, sostenido verticalmente, permite eliminar el exceso de agar que se acumula en uno de los vértices, apoyando éste sobre una caja de PETRI estéril.

Una vez solidificado el agar, se recorta con un bisturí o navaja previamente flameados, los bordes de éste, tratando de que quede una figura octogonal de tamaño adecuado para ocupar la excavación del porta sin tocar la vaselina. Luego se coloca sobre el porta apretando un poco para hacer un cierre hermético que evite la entrada del aire y con ello la desecación del preparado.

En el momento de usarlo, se levanta el cubre y con un hilo de platino o una pipeta PASTEUR afinada se siembra en la parte central de la película. El cubre vuelve a colocarse en la excavación del porta, se aprietan los bordes nuevamente y con un pincelito con parafina fundida se bordea el preparado.

Hecho esto, el preparado está listo para incubar.

Todos estos movimientos deben hacerse con la mayor rapidez posible, para evitar que se infecte el preparado.

Cultivos de adhesión. Método de LINDNER: Se preparan los portas y cubreobjetos estériles como para la técnica del método anterior.

Con un ansa de platino se coloca en el cubre objeto, sobre la cara estéril, una gota del medio de cultivo estéril, tratando de que no sea muy convexa para evitar que toque la excavación del portaobjeto.

Se siembra con una pipeta PASTEUR afinada o bien con un hilo de platino, guardando siempre las habituales precauciones de asepsia. Luego se coloca el cubre sobre la excavación del portaobjeto y se termina como en el método anterior.

Se ha intentado hacer también los cultivos con gotitas por el método de LINDNER pero los resultados obtenidos no han sido lo suficientemente satisfactorios como se esperaba. Posiblemente la causa de ello ha sido casi exclusivamente la naturaleza del material, que siendo filamentosos y con vaina, resulta muy difícil romper los filamentos y dejar células sueltas.

CONCLUSIONS

After the experiments of the present investigation the following conclusions have been drawn:

1. — WINOGRADSKY's medium composed of boiled hay and ferric hydroxide is a good medium to obtain enrichment cultures of *Leptothrix ochracea*. The substitution of ferric hydroxide by manganese carbonate advised by MOLISCH is convenient.

2. — Isolation of the *Leptothrix* species including *Leptothrix ochracea* in pure culture was obtained with different solid culture mediums, described in the study; the best results were obtained by one composed of agar, water and ferric-ammonium citrate.

3. — *Sphaerotilus dichotoma* was also isolated in BUSGEN's medium with 0,5 ‰ meat extract.

4. — Methods of direct observation in moist-chamber, adhesion cultures and agar films have given satisfactory results for the morphological study of this group of bacteria.

5. — The physiological study has confirmed that: the studied strains cannot develop in completely mineral media, presence or absence of iron or manganese does not seem to influence the quantity or quality of development, oxidation of manganese salts takes place even with dead cells and complex substances are employed for their metabolism, among which preferably peptone.

6. — These results make us doubt on the facultative autotrophy of this group of bacteria.

7. — The morphological and physiological study of 255 strains isolated allowed us to group them in 5 species described in the study.

SUMMARY

In this study a relation is made of the results of the physiological and systematic study of some *Chlamydobacteriales*, a group of the *Schizomycetes* which main characteristic is the presence of a sheath.

Representatives of this group were described by KUTZING in 1833 and 1843, COHN in 1870, ZOPF in 1882 and others.

WINOGRADSKY in 1888 studied some of their forms and named them *Iron bacteria* because of their affinity with this metal. In his experimental study, he deducted that in similarity with green plants they could live and develop in absence of organic substance, the synthesis of carbonated substances starting from the carbon dioxide of the air. He succeeded in cultivating them in crude cultures with boiled hay and ferric hydroxide.

BUSGEN in 1894, cultivated and isolated *Sphaerotilus dichotoma* in pure culture; MOLISCH in 1910 and LIESKE in 1911 obtained the first pure cultures of *Leptothrix ochracea* from natural iron sources in organic media. MOLISCH stated, that the presence or absence of peroxide of manganese was not absolutely necessary for the development of these bacteria, and the two previous reasons made him deny WINOGRADSKY's theory.

Specimens of different sources were employed in this investigation to establish the possible relation between the forms of life of these bacteria and their habitat.

All the specimens (100) were taken in sterilized flasks submitted to a microscopical examination and sown in several culture media.

Of the enrichment cultures tested the best result was obtained with boiled hay at 10 to 20 ‰ plus manganese carbonate; having stated that the hay must have an advanced grade of maceration and must be boiled in a large quantity of water (more or less 2.000 times).

The isolation of the representatives of this group of bacteria, specially in the *Leptothrix* species was a complicated task at the beginning as safe isolation mediums in pure culture were ignored.

After several tests BUSGEN's medium for isolation of *Sphaerotilus dichotoma* was modified by adding manganese carbonate.

LIESKE's medium could be employed for development only after modifying the original formula.

Later on the different species of the *Leptothrix* genus were isolated in a sure and rapid way in a medium composed of agar 1 ‰ and 0,75 ‰ of ferric-ammonium citrate.

Isolation of *Sphaerotilus dichotoma* was also obtained in the previous medium and in BUSGEN's agar (0,5 ‰ meat extract and 1 ‰ agar).

A total of 255 strains were isolated and later identified as:

Sphaerotilus dichotoma (COHN) MIGULA (1900.

Leptothrix ochracea KUTZING 1843.

Leptothrix sideropous (MOLISCH) 1910.

Leptothrix crassa CHOLODNY 1926.

One of the forms was recognized as a new species for which the name of *Leptothrix winogradskii* n. sp. is proposed.

The study of the isolated strains is based on morphological observations, from moist chamber cultures and stained preparations; the characteristics of these cultures were observed on PETRI dishes

and agar strokes using peptonised water plus manganese acetate and BUSGEN's medium.

The first problem created by the physiological study of the strains was the discovery of a medium to cultivate them in pure state, and sufficient to carry out the systematic experiments and evidence the influence of different agents on the studied germs.

At the same time an investigation was made on their developing capacity in mineral media and the influence of ferric salts and manganese in their metabolism, according to WINOGRADSKY's theory.

The first problem gave the following results:

Leptothrix develops better in peptone as organic substance and manganese acetate as the manganese salt, in the following proportions: peptone 0,5 ‰, manganese acetate 0,1 ‰.

Sphaerotilus dichotoma develops very well in meat extract 0,5 ‰ (BUSGEN's medium).

The tests with mineral media gave negative results although LIESKE's mineral medium for *Leptothrix ochracea* was tried and all possible causes of mistake foreseen.

In certain cases, the ferric salt and manganese are favourable to the development of these bacteria, in others their action is negative and in others they seem harmful.

In these experiments in pure cultures, iron has never been oxidised by these bacteria, while manganese has been affected so, in most cases. When manganese is not oxidised it is due to the composition of the culture medium, it does not happen with iron as oxidation is effected at a pH greater than 6,8 and at that point ferrous salts are so unstable that they are practically transformed into ferric. Oxidation may also be produced with dead cells.

These results make us suspect that these bacteria are not facultative autotrophes, which coincides with the doubts expressed by MOLISCH, BAAS-BAKING and PARK.

The other physiological investigations were: the determination of the carbon-dioxide influence, temperature, relation with oxygen, medium reaction, power of reduction of nitrates, formation of hydrogen sulphide, acetyl-metyl-carbinol and indol, gelatine liquefaction, sporulation ability and influence of light. The results of these investigations which allowed the identification of the previously mentioned strain are grouped in a special chapter.

The systematic study is preceded by the diagnosis of the different genus of *Chlamydobacteriales* and by a brief comment on *Leptothrix* and *Sphaerotilus*. The genus and species have been described separately and illustrated by prints and camera-lucida drawings.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ADLER, O. 1904. « Ueber Eisenbakterien in ihrer Beziehung zu den therapeutisch verwendeten natürlichen Eisenwasser ». *Zentralbl. f. Bakt. II.* 11: 215-219; 277-287.
- (2) BAAS-BECKING, L. C. M., and PARKS. 1927. « Energy relations in the metabolism of autotrophic bacteria ». *Physiological Review.* 7: 85-106.
- (3) BEGER, H. 1936. « *Leptothrix echinata* ein neues vorwiegend mangan fällendes Eisenbakterien ». *Zentralbl. f. Bakt. II.* 92: 401-406.
- (4) BERGEY, D. 1934. « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. A Key for the identification of Organisms of the Class *Schizomycetes*. 4. th. ed. Williams a Wilkins.
- (5) BUCHANAN, R. E. 1918. « Studies in the classification and nomenclature of the bacteria. VII. The subgroups and genera of the *Chlamydo bacteriales* ». *Jour. Bact.* 3: 301-306.
- (6) — 1925. *General Systematic Bacteriology*. 507 pag. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- (7) BUSGEN, M. 1894. « Kulturversuche mit *Cladothrix dichotoma* ». *Berichte d. Deutsch. Bot. Gesellsch.* 12:147.
- (8) COHN, F. 1870. « Über den Brunnenfaden (*Crenothrix polyspora*) ». *Beitrage z. Biol. d. Pfl.* 1: 108-131.
- (9) — 1875. « Untersuchungen über Backterien, II. ». *Beitr. z. Biol. d. Pfl.* 1: 185.
- (10) CHOLODNY, N. 1926. « Die Eisenbakterien ». *Beiträge z. einer Monographie.* Jena. G. Fischer.
- (11) De TONI and TREVISAN, V. 1889. « *Schizomycetaceae* NAEG. », in SACCARDO, P. A.: *Sylloge Fungorum.* 8: 923-1087.
- (12) DORFF, P. 1934. Die Eisenorganismen. Systematik und Morphologie. *Pflanzenforschung*, HRSG. R. KOLKWITZ, H. 16. Biologie des Eisen- und mau-gankreislaufs. (Die Eisenorganismen II). *Verlagsgesell. f. Ackerbau M. B. H.*, Berlin, 1935.
- (13) EHRENBURG, C.G. 1836. Vorläufige Mitteilungen über das wirkliche Vorkommen fossiler Infusorien und ihre grosse Verbreitung. *Poggendorf Annalen.* 38, 213-455.
- (14) HENNEBERG, W. 1926. Handuch der Gärungsbakteriologie. 2 ed., 2 vol. P. Parey, Berlin.
- (15) KÜTZING, F. T. 1833. « *Sphaerotilus natans*, eine neue Süßwasseralge ». *Linnaea* 8: 385.
- (16) — 1843. *Phycologia generalis*. 198 pag. Leipzig.
- (17) LIESKE, R. 1911. « Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von *Spirophyllum ferrugineum*, einem typischen Eisenbakterium ». *Jahrb. f. wiss. Botanik.* 49: 91.
- (18) — 1919. « Zur Ernährungsphysiologie der Eisenbakterien ». *Zbl. f. Bakt. II.* 49: 413-425.
- (19) LINDNER, J. 1893. « Die Einzellkultur im hängenden Tropfen ». *Wochenschr. f. Brauerei.* 10. 1554.
- (20) MACÉ, E. 1897. « Sur les caractères de culture du *Cladothrix dichotoma* ». *Compt. Rend. Acad. Sci.* 106: 1622.
- (21) MIGULA, W. 1897-1900. *System der Backterien.* Jena.
- (22) MOLISCH, H. 1910. *Die Eisenbakterien.* Jena.

- (23) NAUMANN, E. 1921. « Untersuchungen über die Eisenorganismen Schwedens I. Die Erscheinungen der Sideroplastie in den Gewässern des Teichgebietes Aneboda ». *Kungl. Svenska Vetenskapsakad. Handl.* 62. (4): 1-68. 6 lam.
- (24) — 1929. « Ueber Morphologisch bzw. Physiologisch bestimmbare Eisenbakterien ». *Ber. d. Deutsch. Bot. Ges.* 47.
- (25) — 1935. « Ist *Cladothrix dichotoma* Cohn 1875 mit *Sphaerotilus natans* Kützing 1833 identisch? ». *Zentralbl. f. Bakt.* II. 88:62-66.
- (26) RÖSSLER, O. 1906. « Der Nachweis von *Crenothrix polyspora* im Trinkwasser ». *Deutsch. Med. Wochenschr.* 32: 1628.
- (27) SCHORLER, B. 1904. « Beiträge zur Kenntnis der Eisenbakterien. » *Zentralbl. f. Bakt.* II. 12: 681.
- (28) SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC. *Manual of Methods for pure culture study of bacteria.* Geneva. New York, 1923-1939.
- (29) SORIANO, S. 1935. « Dispositivo sencillo para micromanipulaciones ». *Folia Biológica.* 46-47-48: 205-210.
- (30) — 1938. « Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la « chicha ». *Rev. del Instituto Bacteriológico (D. N. H.).* 8 (3): 231-321.
- (31) WINOGRADSKI, S. 1888. « Über Eisenbakterien ». *Bot. Zeitung.* 46: 261.
- (32) — 1891. « Recherches sur les organismes de la Nitrification ». *Annales Inst. Pasteur.* 5: 32, 577.
- (33) — 1922. « Eisenbakterien als Anorgoxydanten ». *Zentralbl. f. Bakt.* II. 57: 1.
- (34) — 1928. « Ferrobacteries. Travaux récents ». *Bull. Inst. Pasteur.* 26: 625-630.
- (35) ZIKES, H. 1915. « Vergleichende Untersuchungen über *Sphaerotilus natans* (Kützing) und *Cladothrix dichotoma* (Cohn) auf Grund von Reinkulturen ». *Zentralbl. f. Bakt.* II. 43: 529-552.
- (36) ZOPF. 1882. *Zur Morphologie der Spaltpflanzen.* Leipzig.

INDICE

	PÁG.
INTRODUCCION	5
CAPÍTULO I. — Antecedentes	7
CAPÍTULO II. — Métodos de enriquecimiento y aislamiento	12
1. — Material	12
2. — Enriquecimiento	12
3. — Aislamiento	19
a) Aislamiento de <i>Leptothrix</i>	19
b) Aislamiento de <i>Sphaerotilus</i>	22
CAPÍTULO III. — Estudio de las <i>Chlamydobacteriales</i> aisladas	23
1. — Morfología	23
2. — Fisiología	25
a) Desarrollo en medios minerales	27
b) Influencia del hierro y del manganeso	31
c) Otras características fisiológicas	33
CAPÍTULO IV. — Agrupación de los cultivos estudiados	43
CAPÍTULO V. — Sistemática de las <i>Chlamydobacteriales</i>	46
1. — Diagnósis	46
2. — Identificación de los cultivos estudiados	52
3. — Descripción de géneros y especies	55
4. — Resumen de los caracteres de las especies estudiadas	65
5. — Addenda.	68
CAPÍTULO VI. — Conclusiones	70
CAPÍTULO VII. — Resumen	71
APÉNDICE	74
1. — Listas de las muestras del material y de los cultivos estudiados.	74
2. — Medios de cultivo, métodos y técnicas empleados	84
CONCLUSIONS AND SUMMARY	92
BIBLIOGRAFÍA	95
ILUSTRACIONES: Láminas I-IX .	

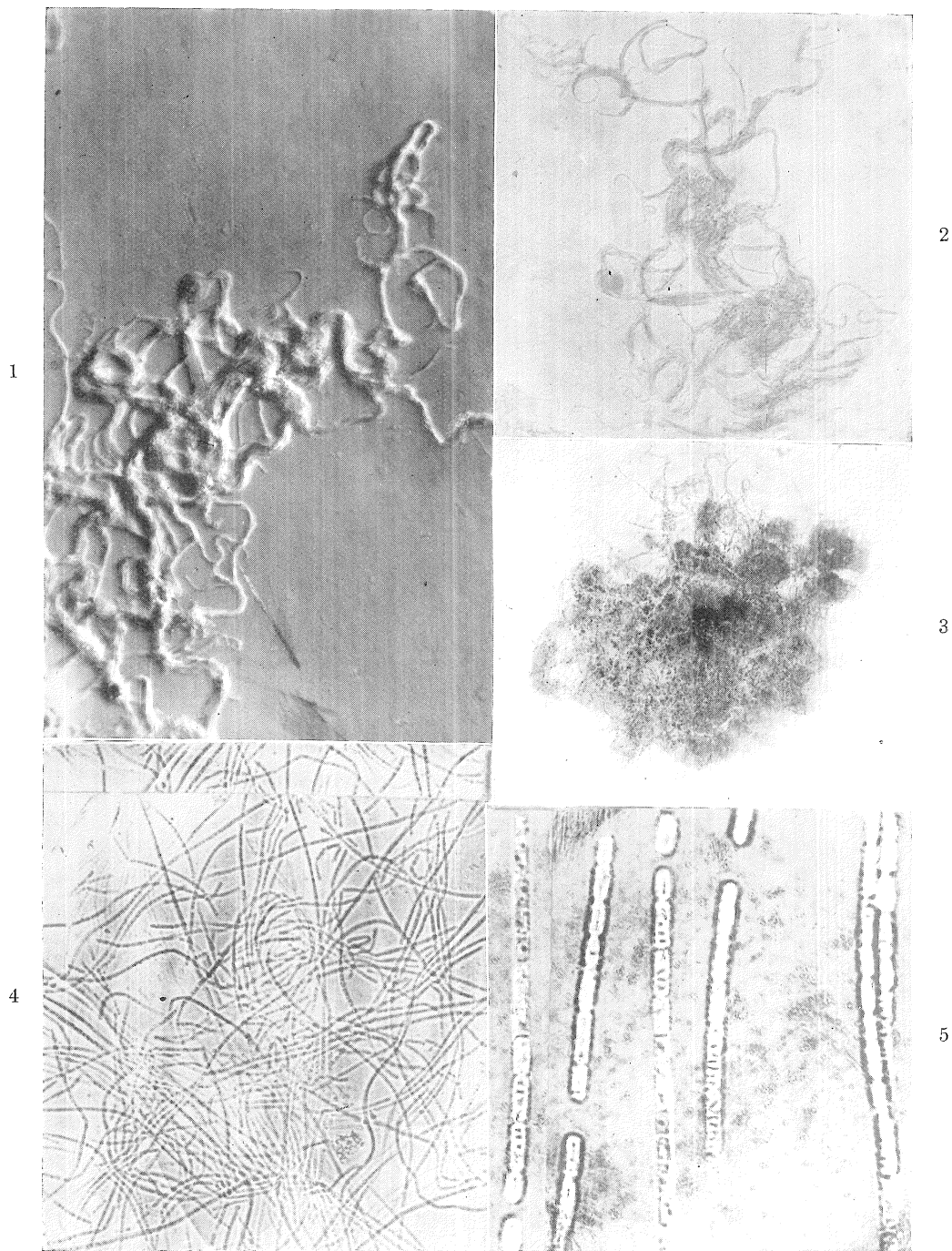


LÁMINA N° 1. — *Sphaerotilus dichotomus*

- 1-2-3. — Tres aspectos de las colonias de *Sphaerotilus dichotomus* 100 ×
4. — Filamentos en cultivo puro 250 ×
5. — Filamentos en cultivo puro, vistos con gran aumento 1200 ×

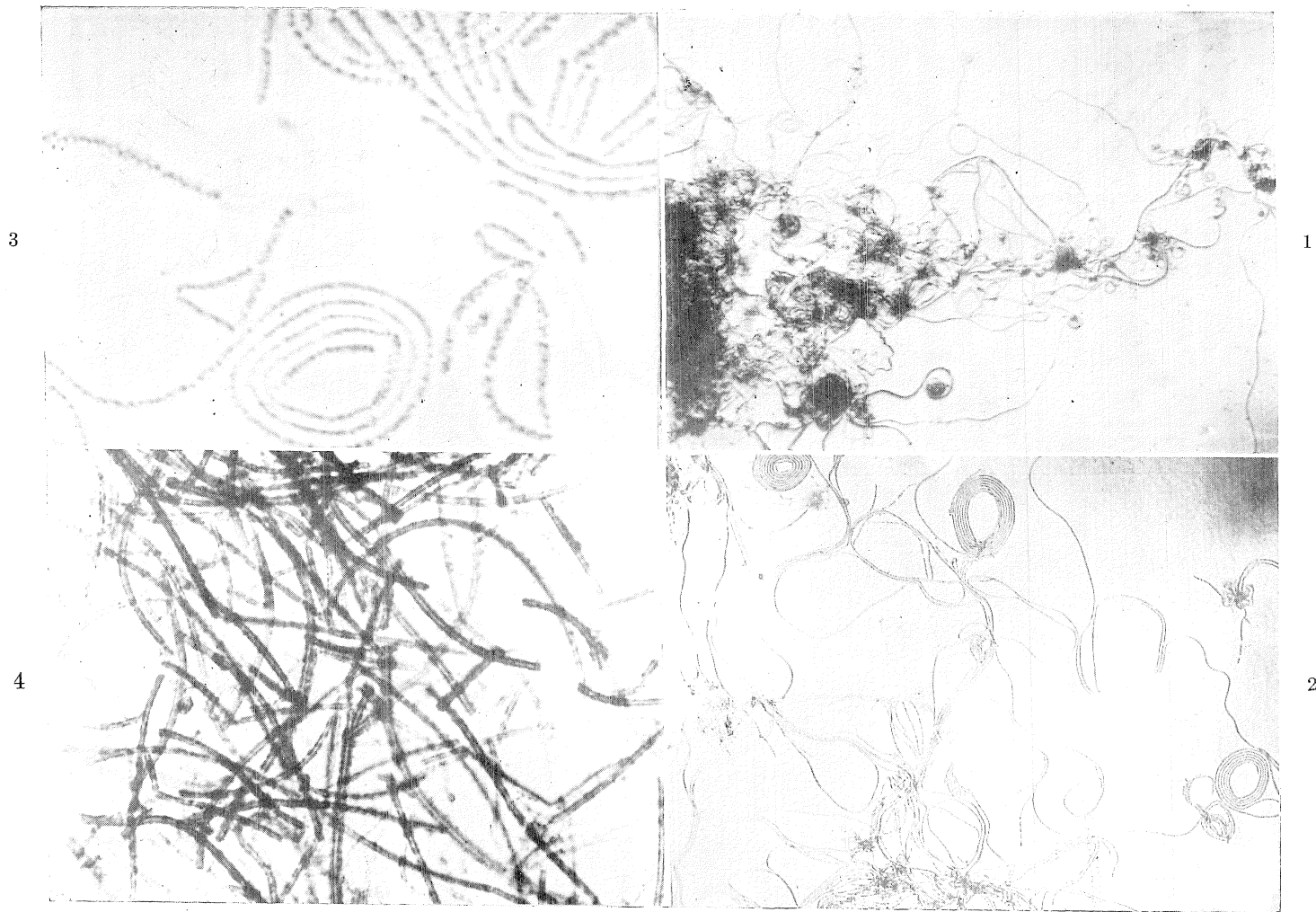


LÁMINA N.º 2. — *Leptothrix ochracea*

1 - Colonia en agar citrato de hierro y amonio 150 X. — 2 - Borde de colonia 100 X. — 3 - Borde de colonia 1000 X. — 4 - Aspectos de los filamentos con vainas impregnadas con manganeso 560 X.

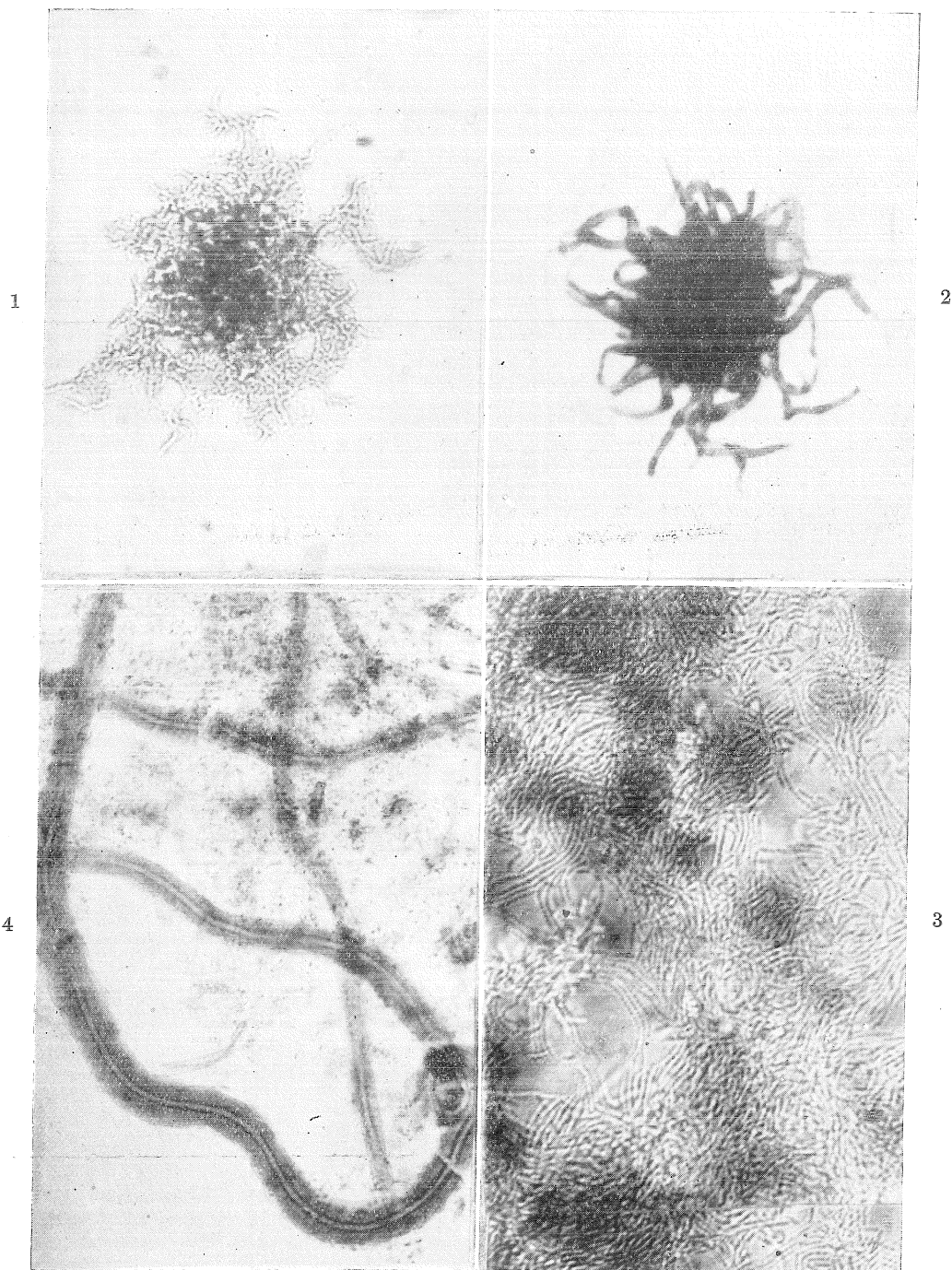


LÁMINA Nº 3. — *Leptothrix crassa*.

1. — Colonia en superficie 200 ×
2. — Colonia dentro del agar 200 ×
3. — Borde de colonia 1000 ×.
4. — Filamentos con las vainas fuertemente impregnadas 500 ×

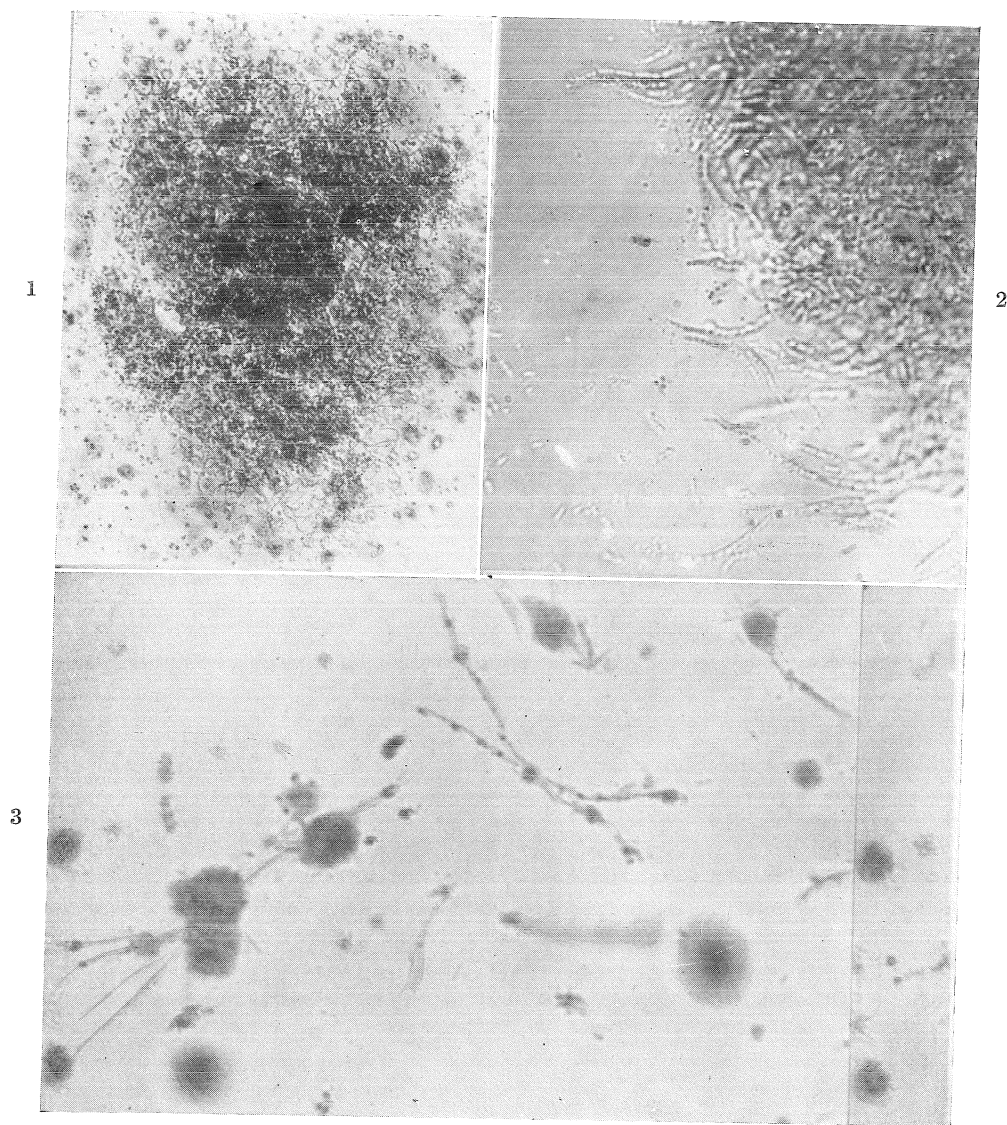


LÁMINA N° 4. — *Leptothrix sideropous*

1. — Colonia en superficie 250 X
2. — Borde de colonia.
3. — Aspecto de los filamentos con su disco de adhesión.

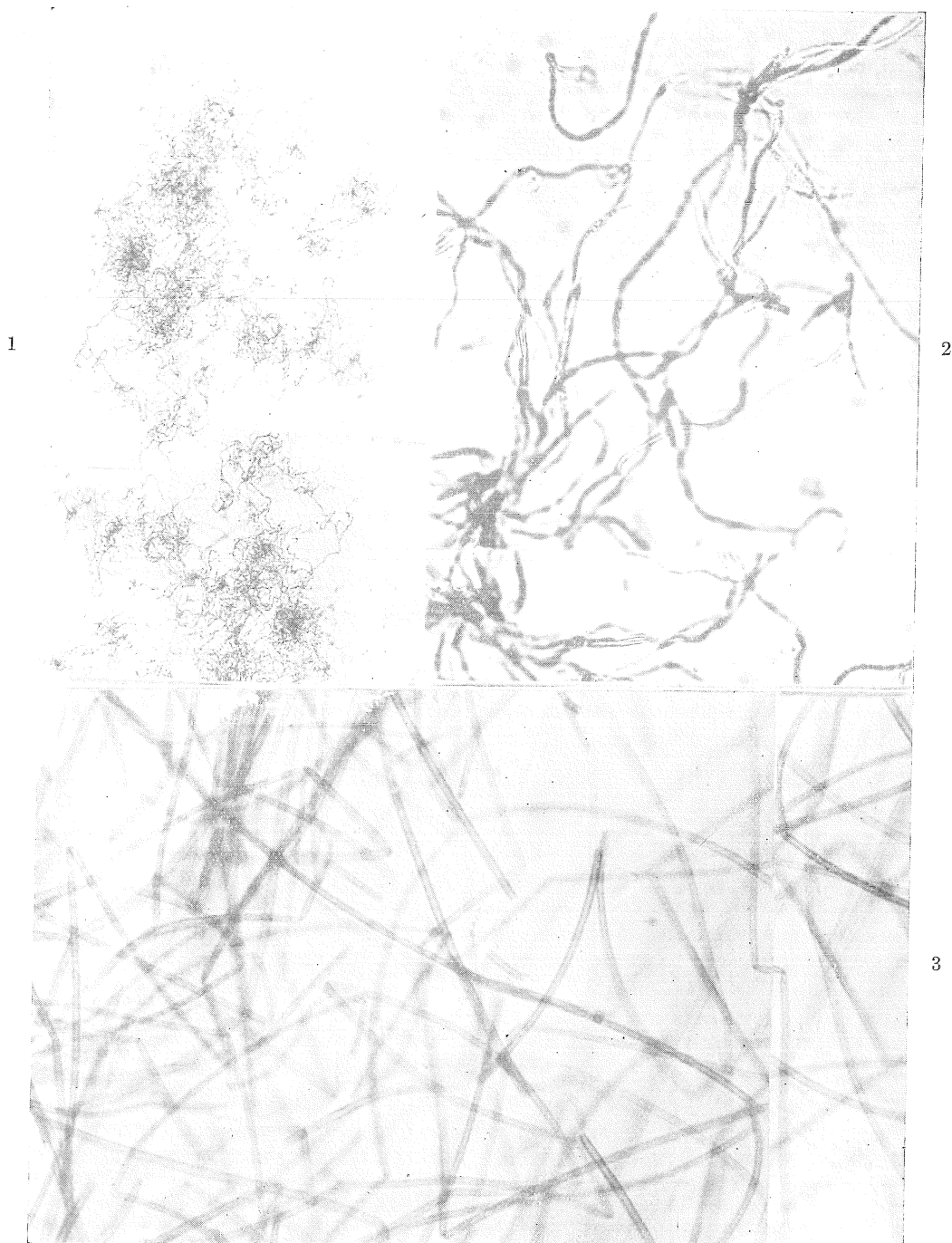


LÁMINA Nº 5. — *Leptothrix winogradskii*

1. — Colonia en superficie 150 ×
2. — Borde de colonia 1150 ×
3. — Filamentos, en cultivo puro, con sus vainas impregnadas con manganeso 600 ×

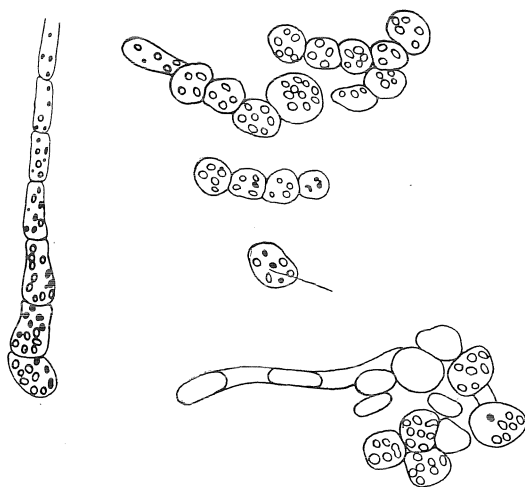
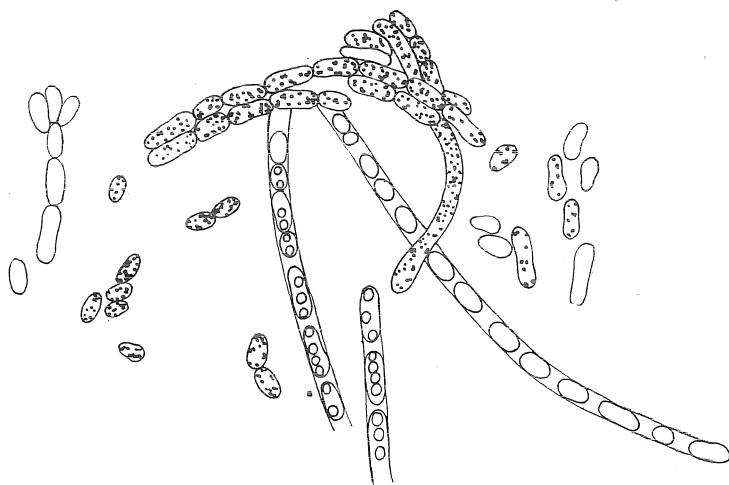


LÁMINA N° 6.

1. — *Sphaerotilus dichotomus* 1300 X
2. — Aspecto que toman algunos preparados, en cámara húmeda, de *Sphaerotilus dichotomus* después de 24 horas.



LÁMINA Nº 7.

1. — *Leptothrix ochracea*, 1300 X
2. — *Leptothrix crassa*, 1300 X

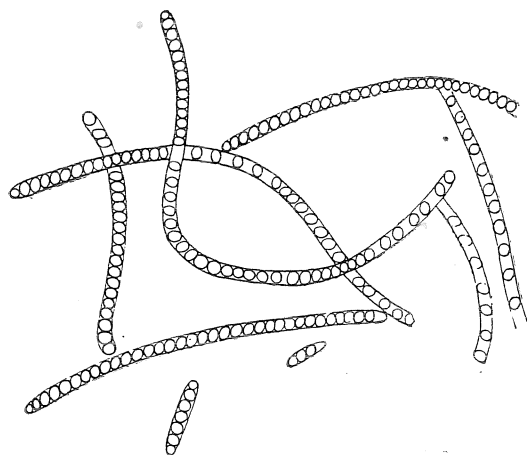
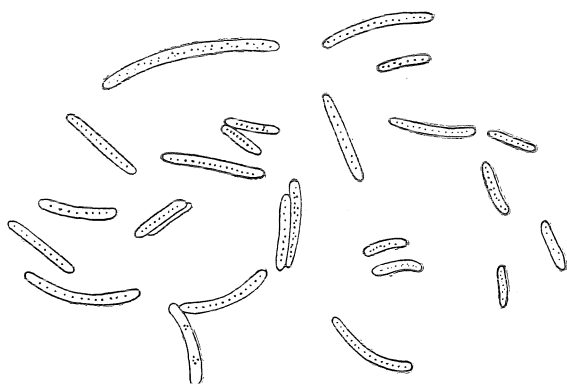


LÁMINA Nº 8.

1. — *Leptothrix sideropous*, 1300 ×
2. — *Leptothrix winogradskii*, 1300 ×

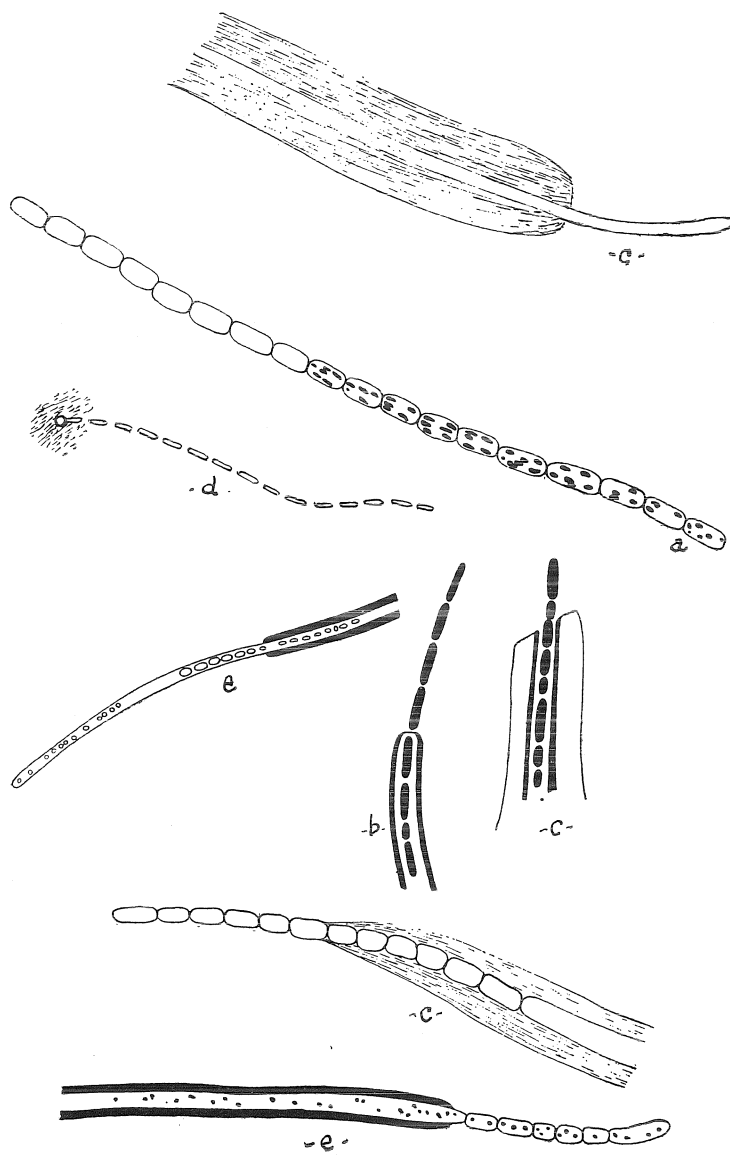


LÁMINA Nº 9. — Filamentos con sus respectivas vainas.

- a. — *Sphaerotilus dichotomus*.
- b. — *Leptothrix ochracea*.
- c. — *Leptothrix crassa*.
- d. — *Leptothrix sideropous*.
- e. — *Leptothrix winogradskii*.

Se terminó de imprimir el 23 de Octubre de 1939
en los talleres gráficos "Tomás Palumbo" - La Madrid 321-25 - 21-1733 - Bs. Aires