

Estudio sobre el *Lactobacillus bifidus* (Tissier) Kulp y Rettger

Por P. NEGRONI e I. FISCHER

SINONIMIA: *Bacillus bifidus communis* y *Bacillus bifidus* Tissier, 1900. *Bacteroides bifidus* Cast. y Chalmers, 1919. *Bifidibacterium bifidum* O. Jensen, 1924. *Corynebacterium bifidum* Henneberg, 1936. *Nocardia bifida* Vuillemin, 1931.

PROBABLES SINÓNIMOS: *Bacillus intestinalis tuberculiformis* Jacobson, 1908. *Bacillus cornutus* Distaso, 1912. *Coccobacillus oviformis* Tissier, 1908. *Bacillus ventriosus* Tissier, 1908. *Diplobacillus acuminatus* Distaso, 1912. *Bacillus tortuosus* Debono, 1912. *Bacteroides catenaformis* Egerth, 1935.

Hace unos dos años, emprendimos la investigación sobre la presencia de *Actinomycetales* en el contenido del apéndice ileocecal y de las materias fecales, teniendo presente que la actinomicosis abdominal comienza frecuentemente a nivel de la zona cecoapendicular y que en la historia de tales enfermos se registra, muchas veces, ataques de apendicitis aguda o crónica.

Con este objeto examinamos el contenido de 86 apéndices extirpados en el servicio del Profesor Dr. E. Finochietto, Pabellón IX del Hospital Rawson. Como en los primeros casos estudiados nos llamara la atención la presencia habitual de bacterias bífidas con tendencia a producir filamentos, aislamos, sistemáticamente, todas aquellas bacterias no gasógenas microaerófilas o anaerobias que por su morfología pudieran ser clasificadas en el orden *Actinomycetales*, incluyendo al *Bacillus bifidus*. Con fines comparativos estudiamos, también, 6 materias fecales de adultos, 13 de lactantes, el contenido de 15 muelas cariadas, de 5 vesículas biliares y de una úlcera de estómago, con el siguiente resultado:

Material	Cultivos impuros		Cultivos puros	
	<i>B. bifidus</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>B. bifidus</i>	<i>Actinomyces</i>
86 apéndices	84	1	18	1
6 materias fecales de adultos	4	2	1	
13 materias fecales de lactantes	13		7	
15 caries dentarias	0	0		
5 ves. biliares	0	0		
1 úlcera estómago	1	0		

En el presente trabajo detallamos el estudio del *Bac. bifidus*, que traduce nuestra experiencia sobre este microorganismo, haciendo notar que en ocasiones tuvimos serias dificultades para diferenciarlo del *Cohnistreptothrix israeli* por una parte y del *Lactobacillus acidophilus* por otra. Finalmente, expondremos nuestro punto de vista sobre su posición sistemática.

No vamos a pasar en revista la copiosa bibliografía referente a este germen. De su examen podemos resumir los hechos siguientes: El *Lact. bifidus* es un huésped habitual del intestino del lactante a partir de las 24 a 48 horas siguientes al nacimiento (Lauter, 1921). Más tarde, posiblemente con el cambio del régimen alimenticio, tiende a desaparecer de las materias fecales y algunos autores (Torrey, 1918) sostienen que, solamente en condiciones patológicas, se lo observa en el adulto.

También se lo ha aislado de las materias fecales de diferentes animales: perro, gato, conejo y ratones, particularmente cuando se los somete a una dieta láctea o se les da lactosa en abundancia (Cruickshank, 1925 y Stransky y Maslowski, 1927); de la vagina, especialmente en las mujeres embarazadas y durante el puerperio (Maujocks, 1921); del apéndice sano (Veillon y Zuber) y enfermo (Weinberg); de las caries y granulomas dentarios (Howe y Hatch, 1917; Pesch y Zöllner, 1936); de las vías urinarias infectadas (Albarran y Cottet, Raeh y Reuss, 1909 y Cirilo, 1924).

La existencia del *Lactobacillus bifidus* como especie propia, fué negada por numerosos investigadores (Moro, Finkelstein, Mereshkowsky, Rodella y, recientemente, por Rettger y sus colaboradores). Pesch y Zöllner sostuvieron que el *Bac. bifidus* y el *acidophilus* podían transformarse el uno en el otro y, solamente a título de curiosidad, recordaremos el trabajo de Noguchi (1910) confirmado posteriormente por Brown y Bosworth en 1922, en el cual se expresa que el *Bac. bifidus* tiene dos fases biológicas, una aerobia esporulada en el pezón de la madre y otra anaerobia, no esporulada, en el intestino del lactante.

AISLAMIENTO. — El aislamiento del *Lactob. bifidus* de un medio muy contaminado, no deja de ofrecer serias dificultades. Habiendo comprobado que este germen crece mejor en un medio ácido (pH 5,5 a 6,4) y que es capaz de desarrollar también en la bilis pura de buey, hemos aplicado estos dos hechos para la preparación de un medio de enriquecimiento.

El contenido apendicular (apéndices recientemente extraídos) o los hisopos con los que se habían recogido las muestras de materias fecales, fueron introducidos en tubos de ensayo conteniendo bilis pura de buey acidificada (pH 6).

Efectuamos el aislamiento después de 24 a 48 horas de incubación a 37° en los siguientes medios de cultivo: agar blando glucosado o lactosado al 1 %, medio con hígado con 0,5 % de agar y filtrado de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo glucosado, de 1 semana, adicionado de 0,5 % de agar. Según nuestra experiencia resulta realmente beneficioso el enriquecimiento en la bilis y el aislamiento en el medio con hígado y en el del filtrado de *Sacch. cerevisiae*. Este último reemplazaría, para los fines prácticos, la adición de autolizado de levadura.

MEDIO CON HÍGADO (Blaurock y Torrey combinados).— En una olla se vierten 500 grs de hígado fresco de ternera, bien cortado, y 1 litro de agua destilada, haciéndolo hervir durante dos horas. Se filtra por un lienzo y se le agrega 1 g de PO_4HK_2 , 10 g de Bacto-peptona, 5 g de ClNa y 1 ml de una solución de cistina al 1/10.000. Se ajusta el pH a 7,4, se filtra por papilla de papel de filtro, se reparte y esteriliza.

En el momento de usarlo le agregamos glucosa o lactosa en la proporción de 1 %.

Los cultivos purificados por repetidos trasplantes de una colonia en alguno de los medios mencionados repartidos en columna, para anaerobiosis, fueron posteriormente sembrados, por diseminación, en cajas de Petri con el medio de hígado, adicionado de 10 % de sangre defibrinada de conejo. En este caso reemplazamos la tapa de la caja de Petri por el fondo de otra conteniendo agar glucosado sembrado con una bacteria muy aerobia (el *Microc. prodigiosus* o un bacilo esporulado). Después de adaptarlas perfectamente, hemos cerrado la unión con tela adhesiva. El desarrollo se observa al cabo de 24 a 48 horas de incubación a 37°.

CARACTERES MACROMORFOLÓGICOS.— Las colonias en la profundidad de los medios semisólidos son lenticulares de bordes netos o en forma de lentes entrecruzadas, siempre que se haya sembrado poco material y las colonias aparezcan aisladas unas de las otras (figuras 1 y 2). En los medios con salicina, manitol y glicerol hemos observado la formación de colonias con el aspecto de penachos o copos de algodón (fig. 3).

En la superficie del medio de Blaurock-Torrey las colonias típicas son hemisféricas salientes, de bordes netos, húmedas y brillantes con un reflejo de porcelana y de 1 a 2 mm de diámetro a las 48 horas. Al cabo de 4 días su diámetro es de 2 a 3 mm y adquieren un tinte pardusco o rosado, al mismo tiempo que pueden presentar una zona periférica plana y festoneada (fig. 4). Menos frecuente-

mente las colonias son traslúcidas o transparentes y representan un pequeño sector de esfera, siendo casi planas.

No hemos podido referir este último aspecto, poco común de la colonia del *L. bifidus*, a un carácter particular de su morfología microscópica o de sus propiedades fermentativas.

No desarrolla en el medio de Zeissler (observación que coincide con la de Stransky y Mailowski), ni tampoco en la superficie de los medios sólidos inclinados, en los cuales se hace la anaerobiosis con la técnica de Buchner. Según Boventer (1938-1939), el pirogalato de sodio o de potasio absorbería el CO₂ del ambiente, gas que favorecería el crecimiento del *L. bifidus*.

Las microcolonias en los cultivos por adhesión se presentan frecuentemente con un núcleo central compacto, rodeado de una areola clara de bordes netos o, raramente, desflecados (fig. 5).

CARACTERES MICROMORFOLÓGICOS. — Tanto en las materias fecales como en el material extraído del apéndice ileocecal, no se observa, como ya lo han hecho notar la mayoría de los investigadores, la forma típica que inmediatamente hacen pensar en el *L. bifidus*. Estas se presentan, en cambio, en los primeros cultivos y consisten en bastoncitos intensamente gram positivos de 0,75 hasta 8 ó 12 μ por 0,4 a 1 μ ; término medio de 2 a 4 μ de largo, aislados o agrupados generalmente de a dos o en grupos, con el aspecto de letras chinas. No forman generalmente cadenas ni se presentan ensortijados ni rígidos. Tienen una cierta flexuosidad y cuando se presentan de a pares están, habitualmente, geniculados. Uno o los dos extremos libres están abultados, jamás cortados a pico, con una muesca, índice de una incipiente bifurcación, habitualmente bifido y, más raramente, dividido por tricotomía. Las ramas dicotómicas pueden a su vez dicotomizarse.

En las microfotografías y dibujos que acompañan este trabajo están representados los diversos aspectos micromorfológicos de esta bacteria tan polimorfa (figs. 8 a 12). Queremos, sin embargo, llamar la atención sobre los siguientes caracteres: Con cierta frecuencia (cepas n^o 53, 72, 119, 123 y 133 aisladas de apéndices) forman un micelio filamentosos rudimentario o bastante desarrollado, por lo menos en las primeras 24 hs. con ramificaciones laterales abortivas o bien desarrolladas y terminado, a veces, el eje principal en forma bifida o dividido por tricotomía. Este micelio se tabica y desorganiza luego en elementos bacteriformes aislados, en forma de V, de Y o conservando la ordenación primitiva del filamento. Esta bacteria presenta, en ocasiones, el crecimiento angular que se observa en los grupos vecinos de *Corynebacterium* y *Proactinomyces*.

Al cabo de varios días o en condiciones disgenéticas se observan formas anormales, vesiculosas o en bola, hipertróficas que llegan a medir 3 μ de diámetro y son semejantes a levaduras. Además existen elementos que pierden, en mayor o menor grado, la facultad de teñirse por el gram y otros que presentan la substancia gramófila fragmentada (formas degenerativas de Cruikshank, formas en camarita de Henneberg) (figs. 12 y 13).

PROPIEDADES BIOLÓGICAS. — Es un germen anaerobio. Su temperatura óptima de crecimiento es la de 37° con temperaturas límites de 30° a 42-43°, siendo, en estas condiciones, el desarrollo escaso y demorando de 3 a 10 días en aparecer las primeras colonias.

El pH más favorable para el desarrollo en el caldo glucosado, es el de 5,5 a 6,4. Por encima de pH 7,75 no desarrolla o lo hace tardíamente. Enturbia primero el caldo con formación de ondas « moiré » al agitarlo, aclarándose con formación de un depósito hacia los 5 a 7 días. El pH de la mucosa apendicular (de los apéndices extirpados con inflamación aguda o crónica) es igualmente de 6,5 a 7

Para el estudio de las propiedades fermentativas utilizamos caldo, en el cual eliminamos todo vestigio de azúcar sembrándolo con *B. coli* y filtrándolo 24 hs. después. Ajustamos el pH a 7, adicionamos 0,5 % de agar lavado, 1 ml por mil de una solución acuosa saturada de rojo fenol y otro de una solución acuosa saturada de bromocresol púrpura. Se reparte este medio en tubitos de 120 \times 12 milímetros y, después de esterilizarlos, se les adiciona de 1 % de los diferentes hidratos de carbono, disueltos en agua destilada y esterilizados aparte. Los hidratos de carbono y otras fuentes carbonadas utilizadas, han sido los siguientes: xilosa, glucosa, galactosa, manosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, inulina, almidón, salicina, manitol y sorbitol, con los resultados siguientes: xilosa, glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa y maltosa bien fermentados, en el orden mencionado, con producción de ácido, pero no de gas. Con menos intensidad fermentan, también, la rafinosa, inulina y almidón y poco la manosa, salicina, manitol y glicerol.

La fermentación es, sin embargo, caprichosa y no hemos podido relacionarla a tipos o formas especiales. Según Orla-Jensen mucho depende de la fuente nitrogenada y es probable que sea ésta, también, la causa de la discordancia de los resultados obtenidos por diversos autores respecto a los ácidos producidos por el *L. bifidus*. Según Orla-Jensen produce ácido láctico destrógiro y hasta 50 % de ácidos volátiles, mientras que Weiss y Rettger comprobaron para el tipo I, aislado de las materias fecales de los lactantes, la pro-

ducción de ácido láctico inactivo y 18-20 % de acidez volátil. Los resultados obtenidos con nuestras cepas, según los análisis practicados por el Dr. Antola, del Instituto de Química, a quien expresamos nuestro agradecimiento, concuerdan con los datos expuestos por Orlan-Jensen.

Leche: la coagula al cabo de 5 a 8 días, formando un coágulo denso con poco suero, sin gas, pero reduciendo el tornasol, cuando se le adiciona este indicador.

Caldo gelatinado y glucosado: no licúa la gelatina.

No reduce los nitratos en nitritos, no produce acetil-metil-carbinol, indol, hidrógeno sulfurado ni catalasa.

Carece de acción patógena para los animales de laboratorio.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON ESPECIES VECINAS Y POSICIÓN SISTEMÁTICA. — El *Fusiformis ramosus* (Veillon y Zuber, 1898) encontrado frecuentemente por Weinberg y sus colaboradores en el apéndice ileocecal, se diferencia del *L. bifidus* porque crece a 20° y en un pH óptimo de 7 a 8, desprende un poco de gas con olor rancio desagradable y es patógeno para los animales de laboratorio. La especie α de Lotti (1909) aislada de casos de apendicitis aguda, es, probablemente, idéntica a la precedente.

Es con el *Lactobacillus acidophilus* y con el *Cohnistreptothrix israeli* con los cuales hemos encontrado, en ocasiones, las dificultades diagnósticas más serias.

Recordamos que el primero es microaerófilo, sus colonias, en el medio de hígado-sangre de conejo, son planas, pegajosas y de bordes dentados. Igualmente las microcolonias en los cultivos por adhesión presentan un núcleo central, más denso, rodeado de una areola desflecada, formada por cadenetas de bastoncitos formando arcadas. Microscópicamente se presenta como bastoncitos bastante rígidos, de extremos casi rectangulares, formando cadenetas o en-sortijados, nunca bifurcados. En sus propiedades biológicas se diferencia por la producción de ácido láctico l— o inactivo y ausencia de acidez volátil.

El *C. israeli* se diferencia del *L. bifidus* por la facultad de crecer en el medio con sangre de Zeissler y en los medios sólidos con la técnica de Buchner. Las colonias, en la superficie, son salientes e irregulares y, en la profundidad, globulosas y abollonadas, más consistentes pero desmenuzables. No dan suspensiones homogéneas en el agua. Microscópicamente, no tiene el aspecto bífido y, biológicamente, no hace fermentar la inulina, salicina, manitol y glicerol. Produce una pequeña cantidad de ácido láctico.

El *Cohnistreptothrix discofoliatum* (Grüter, 1932) es, microscópi-

camente, muy semejante al *L. bifidus*, pero es aerobio facultativo, sus colonias en el medio de Zeissler son cerebriformes, su desarrollo tiene consistencia mucosa y no hace fermentar la salicina ni el manitol.

En colaboración con el Dr. H. Bonfiglioli, hemos comenzado el estudio serológico de las cepas de *L. bifidus* y de las especies vecinas y, sus resultados, se comunicarán oportunamente.

Respecto a su posición sistemática, este germen se relaciona por su actividad bioquímica con los *Lactobacillus* y por su morfología microscópica con los géneros *Corynebacterium* y *Cohnistreptothrix*. Los autores que atribuyen a la actividad metabólica una importancia fundamental en la sistemática de las bacterias han clasificado al *L. bifidus* en el género *Lactobacillus*.

Nosotros no compartimos este criterio, pues no se trata de un grupo de microorganismos cuyo metabolismo se distinga francamente del de otras bacterias, como ocurre en las quimioautotróficas o las que siendo quimioheterotróficas son homofermentativas, como los representantes genuinos del género *Lactobacillus*. Por este motivo Orla-Jensen se vió precisada a crear un género aparte el *Bifidobacterium*, heterofermentativo, vecino del precedente y con caracteres micromorfológicos particulares.

Recordaremos que Vuillemin (1931), considerando que la morfología tiene, en los microorganismos heterotróficos, más importancia que el metabolismo, lo clasificó como *Nocardia* (*Actinomyces*) *bifida*, criterio compartido por Reichelt (1935). Finalmente Henneberg (1936) lo clasificó en el género *Corynebacterium*.

Teniendo en cuenta su morfología: tendencia a formar un micelio ramificado rudimentario, debemos clasificarlo, necesariamente, en el orden *Actinomycetales*, pero además debemos tener presente que el *L. bifidus* es anaerobio estricto, por lo cual lo colocamos en el género *Cohnistreptothrix* Pinoy, 1913.

Según S. A. Waskman (1940) el orden *Actinomycetales* Buchanan, 1918, tiene los caracteres que exponemos a continuación: « Microorganismos semejantes a los hongos filamentosos, cuyos elementos no sobrepasan de 1,5 μ de diámetro, habitualmente alrededor de 1 μ , sin vaina impregnada de hierro, sin gránulos de S libre ni bacteriopurpurina, nunca forman plasmidios, inmóviles, sin endosporos, pero pueden formar astrosporos, esporos por fragmentación y conidias », comprendiendo las siguientes familias y géneros:

A. Con micelio rudimentario generalmente ausente.

I. Colonias tipo bacteriano. Microbios de crecimiento angular o quebrado. Aerobios.

Familia *Mycobacteriaceae* Chester.

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Acido-resistentes..... | género <i>Mycobacterium</i> L y N. |
| 2. No ácido-resistentes..... | género <i>Corynebacterium</i> L y N. |

- B. Con micelio y esporos producidos por fragmentación.
- I. Micelio continuo en los primeros estados del desarrollo y luego se tabica y desorganiza en elementos bacteriformes. Colonias tipo bacteriano sin formar micelio aéreo, la mayoría.
- Familia *Proactinomycetaceae* L. y N.
1. Anaerobios o microaerófilos, habitualmente parásitos, no ácido-resistentes. No proteolíticos ni diastásicos género *Cohnistreptothrix* Pinoy.
 2. Aerobios estrictos género *Proactinomyces* Jensen.
- C. Con micelio y esporos (conidias) aéreos.
- I. Micelio ramificado bien desarrollado. Forman conidias, artrosporos y esporos de fragmentación. Colonias resistentes y compactas. No enturbian los medios líquidos. Proteolíticos.
- Familia *Actinomycetaceae* Buchnan.
1. Conidias formadas en hifas aéreas dispuestas monopodialmente, en manojos o racimos. . . . género *Actinomyces* Harz.
- II. Esporoso terminales en ramas del micelio vegetativo.
- Familia *Micromonosporaceae* Krassilnikov.
1. Conidias únicas. Diastásicos y proteolíticos, la mayoría son saprófitos, de los productos cloacales o del suelo género *Micromonospora* Orskov.

La bacteria que motiva este estudio sería, pues, el *Cohnistreptothrix bifidus* (Tissier) Negroni y Fischer. La especie tipo del género es *C. israeli* (Kruse, 1896) cuyos caracteres diferenciales con el *C. bifidus*, así como con el *C. discofoliatum*, hemos expuesto más arriba. Es un grupo de microorganismos no gasógeno. Por eso excluimos al *B. ramosus* y al *Propionibacterium*.

Se han clasificado en este género, además de las mencionadas, las siguientes especies: *C. americana* Chalmers y Christopherson, *C. bronchitica* Chalmers y col. y *C. neschczadimenki* Chalmers y Christopherson, incompletamente descriptas y probablemente idénticas a *C. israeli*.

RESUMEN

Del contenido de 86 apéndices (ileocecal) hemos aislado en cultivos impuros 84 veces el *Cohnistreptothrix bifidus* y una vez el *C. israeli*, de 6 materias fecales de adultos: 4 veces el *C. bifidus* y 2 el *C. israeli* en cultivos impuros y, finalmente, de 13 materias fecales de lactantes 13 veces el *C. bifidus*.

El *C. bifidus* es un microorganismo de crecimiento delicado, que necesita una fuente nitrogenada compleja y de ciertos activadores del crecimiento (cistina, levadura autolizada). Es anaerobio estricto.

to y su pH óptimo de crecimiento, en los medios líquidos, es de 5,5 a 6,4.

En la profundidad de los medios semisólidos forma colonias lenticulares y en la superficie del medio de Blaurock-Torrey colonias pequeñas, semiesféricas, como gotitas de parafina. Enturbia los medios líquidos y luego se aclaran por sedimentación. Forma frecuentemente un micelio rudimentario y siempre formas bífidas. Temperatura óptima de crecimiento: 37°. Forma ácido láctico y volátiles en igual proporción. Fermentación caprichosa.

No debe ser considerado como un típico fermento láctico. Algunos autores lo han señalado como patógeno (Albarran y Cottet, Rach y Reuss y Cirilo).

RESUMÉ

En ensementant le contenu de 86 appendices extirpés avec le diagnostique d'appendicite aiguë ou chronique, nous avons obtenu en 84 cas le *B. bifidus* et 1 fois le *C. israeli* en cultures impures.

Dans les cultures impures de 6 spécimens de matières fécales d'adultes nous avons observé en 4 cas le *B. bifidus* et 2 fois des formes filamenteuses rappelant le *C. israeli*. Finalement en ensementant 12 matière fécales de nourrissons nous avons obtenu 13 cultures impures de *B. bifidus*.

Nous décrivons les caractères morphologiques et biologiques du *B. bifidus* (Tissier) et nous croyons qu'il doit être classé parmi les *Proactinomycetacées* L. et N. dans le genre *Cohnistrepthrix*.

SUMMARY

We have obtained 84 impure cultures of *B. bifidus* (Tissier) et 1 *C. israeli* from the content of 86 appendixes operated with the diagnosis of acute or chronic inflammation.

We have obtained 4 impure cultures of *B. bifidus* and twice colonies of a filamentous organism similar to *C. israeli* from 6 adult's feces. Finally, we have obtained 13 impure cultures of *B. bifidus* from 13 infant's feces.

We describe the cultural and morphological characteristics of *B. bifidus* and, from this study, conclude that it should be classified among the *Proactinomycetaceae* L. and N. in the genera *Cohnistrepthrix*.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAM, A. — Ueber die Bedeutung der Eigenwasserstoffzahl (des *H. ionenoptimum*) der Backterien. Zbt. f. Bakt., I Abt. Orig. Bd. 87, H. 7/8, pp. 481-486, 1922.

- BERGEY y col. — *Lactobacillus bifidus* (Tissier) Kulp y Rettger. *Manual of Determinative Bacteriology*. London, 1939.
- BESSAU, G. — *Wissenschaftliche Kongresse und Vereine. 49 Tag. die Deut. Ges. f. Innere Med. Munch. Med. Woch.*, Bd. 84, n° 18, p. 712, 1937.
- BLUHDORN, K. — *Untersuchungen über den Bacillus bifidus communis und sogen. Bac. acidophilus (Streptobac. faecalis)*. *Jahrb. f. Kinderheilk.*, Bd. LXXII, pp. 693-704, 1910.
- BOSWORTH, y col. — *Studies of infant feeding. XVII. Bacteriochemical study of te acid stools excreted by breast-fed and bottlefed infants*. *Amer. J. Dis. of Children*, vol. 23, pp. 323-337, 1922.
- BROWN, E. W., y BOSWORTH, A. W. — *Studies of infant feeding. XVI*. *Amer. J. Dis. of Children*, vol. 23, pp. 243-258, 192.
- BOVENTER, K. — *Untersuchungen ubes das Bact. bifidum*. *Zbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig., Bd. 142, pp. 419-430, 1938.
- CIRILLO, G. — *Le Bacillus bifidus communis dans quelques formes de cystite aigüe hémorragique de la première enfance*. *J. d'Urol.*, vol. XVII, pp. 25-28, 1924.
- CRECELIUS, H. G., y RETTGER, L. F. — *The intestinal flora of the guinea-pig*. *The J. of Bact.*, vol. 46, n° 1, pp. 1-13, 1943.
- CRUICKSHANK, R. — *Bacillus bifidus. Its characteristics and isolation from the intestine of infants*. *The J. of Hyg.*, vol. 24, n° 3-4, pp. 241-254, 1925.
- DELBOVE, P. — *Le bacillus bifidus (H. Tissier, 1899), son antagonisme bacterien*. *These Med.* Paris, 1932.
- DISTASO, A. — *Sur le microbes acido-tolérans de la fore intestinal*. *Zbl. f. Bakt.*, Orig. I Abt., Bd. 59, H. 1, pp. 48-56, 1911.
- EGGERTH, A. H. — *The gram-positive non spore-bearing anaerobic bacilli of human human feces*. *J. of Bact.*, vol. 30, pp. 277-299, 1935.
- HENNEBERG, W. — *Handbuch der Gärungsbakteriologie*. P. Parey. Berlin, 1926.
- HENNEBERG, W. — *Die Untersuchung der Darmflora des Menschen mittels der Deckglassagarmethode*. *Zbl. f. Bakt. Orig. I Abt.*, Bd. 136, pp. 36-49, 1936.
- HOWE, P. R., y HATCH, R. E. — *A study of the microorganisms of dental caries*. *The J. of Med. Res.*, voll. 36, pp. 481-491, 1917.
- HULL, T. G., and RETTGER, L. F. — *The influence of milk and carbohydratefeeding on the intestinal flora of white rats*. *Zbl. f. Bakt.*, Orig. I Abt., Bd. 75, H. 3, pp. 219-229, 1914.
- JACOBSON, G. — *Contribution a l'étude de la flore normales des selles du noussisson*. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 22, pp. 300-322, 1908.
- KENDALL, A. I., y HAHUER, R. C. — *Bacillus bifidus*. *J. Inf. Dis.*, vol. 35, pp. 77-88, 1924.
- LAUTER, L. — *Ueber das Vorkommen des Bacillus bifidus beim Neugeborehen*. *Zbl. f. Bakt. Orig. I Abt.*, Bd. 579-582, 1921.
- LEWIS, K. H., y RETTGER, L. F. — *Non-sporulating anaerobic bacteria of the intestinal tract*. *J. of Bact.*, vol. 40, pp. 287-307, 1940.
- LOGAN, W. R. — *The intestinal flora of infants and young children*. *J. of Bact.*, vol. XVIII, pp. 527-551, 1914.
- LOTTI, C. — *Contributo alla conoscenza der germi anaerobi dell'intestino in condizioni patologiche*. *Ann. Ig. Sper.*, vol. XIX, p. 75, 1909.
- METCHNIKOFF, E. — *Etudes sur la flore intestinale*. *Ann. Inst. Pasteur*, vol. 24, pp. 755-770, 1910.
- MOBLEY, R. L. — *A study of Lactobacillus acidophilus und Saccharomyces cerevisiae*. *IV. Cbl. f. Bakt.*, II Abt., Bd. 98, pp. 311-314, 1938.

- ORLA-JENSEN. — *La classification des bacteries lactiques. Le lait.* 4eme Annee, pp. 468-474, 1924.
- ORLA-JENSEN, S.; ORLA-JENSEN, A. D., y WINTHER, O. — *Bacterium bifidum und Thermobacterium intestinale.* Zbl. f. Bakt., II Abt., Bd. 93, n° 18/22, pp. 321-347, 1936.
- PESCH, K., y ZOLLNER, A. — *Ueber das Vorkommen acidotoleranter Bakterien (Bac. acidophilus, Bac. bifidus) in kariosen Zahnen, Granulomen und Säulingsstuhlen.* Arch. f. Hyg., Bd. 116, pp. 295-313, 1936.
- RACH, E., u. REUSS. — *Zur Aetiologie der Cystitis im Säulingsalter (Bac. bifidus communis und ein Paracolibacillus).* Zbl. f. Bakt., I Abr. Orig., Bd. 50, pp. 169-178, 1909.
- REICHELDT, E. — *Hat die Bifidusflora Vitaminartige Wirkungen?.* Monatschr. f. Kinderheilk., vol. 63, pp. 138-141, 1935.
- RETTGER, L., y col. — *Lactobacillus acidophilus and its therapeutic applications.* New Haven. Yale Univ. Press, 1935.
- RODELLA, A. — *Magencarcinoma und Milchsäurebacillen.* Zbl. f. Bakt., Orig. I Abt., Bd. XLVII, H. 4, pp. 445-466, 1908.
- RUHLE, R. — *Ueber eine neue Zuchtungs-methode des B. bifidus und acidophilus bei anaeroben Oberflächenwachstum.* Jahrb. f. Kinderh., Bd. 106, pp. 21-32, 1924.
- SCHIAPARELLI, P. — *Ulteriori ricerche sperimentali sulla biologia del bacilo bifido.* Boll. Ist. Sierot. Milanese, vol. IX, pp. 465-476, 1930.
- SHERMAN, M. J., y HODGE, H. M. — *The value of certain tests in the differentiation of Lactobacillus bulgaricus from L. acidophilus.* J. of Bact., vol. 40, pp. 11-22, 1940.
- STRANSKY, E., y MASLOWSKI, H. — *Weitere Untersuchungen über Darmbakterien* Zeitschr. f. Kinderheilk., Bd. 43, pp. 717-723, 1927.
- TISSIER, H. — *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons.* These Med., Paris, 1900.
- Repartition des microbes dans l'intestin du nourrisson.* Ann. Inst. Pasteur, t. 19, pp. 109-123, 1905.
- TORREY, J. C. — *New differential plating methods for B. bifidus (Tissier) and B. acidophilus (Moro).* J. of Bact., vol. 2, pp. 435-439, 1917.
- VALLEY, G. — *Favorable rôle of cysteine in the cultivation of anaerobic organisms.* J. of Bact., vol. 17, pp. 12-13, 1929.
- VEILLON, et ZUBER. — *Recherches sur quelques microbes strictement anaerobies.* Ann. Med. Exper., t. X, pp. 517-545, 1898.
- WASKMAN, S. A. — *On the classification of Actinomycetes.* J. of Bact., vol. 39, n° 5, pp. 549-558, 1940.
- WEINBERG, M., y col. — *Recherches sur la bactériologie et la sérotherapie des appendicites aigües.* Ann. Inst. Pasteur, t. 42, 1167-1241, 1928.
- WEINBERG, M., y col. — *Les microbes anaerobies.* Masson Ed. Paris, 1937.
- WEISS, J. E., y RETTGER, L. F. — *Taxonomic relationships of L. bifidus and Bacteroides bifidus.* The J. of Inf. Dis., vol. 62, pp. 115-120, 1938.
- WEISS, J. E., y RETTGER, L. F. — *Lactobacillus bifidus.* J. of Bact., vol. 28, pp. 501-518, 1934.
- ZEISSLER, J., y KACKELL. — *Zur Bakteriologie des Säulingsstuhles.* Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 99, pp. 308-320, 1922.

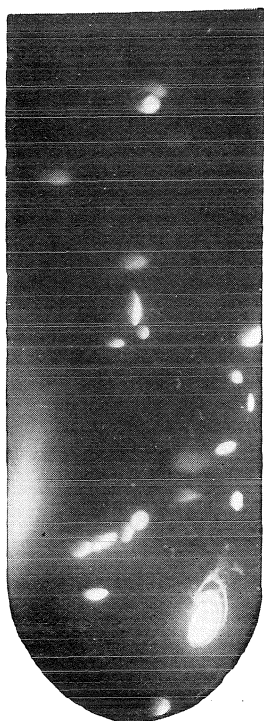


FIG. 1. — Cultivo de *L. bifidus* en agar-glucosado con 0,5 % de agar. Colonias lenticulares desarrolladas en la profundidad.

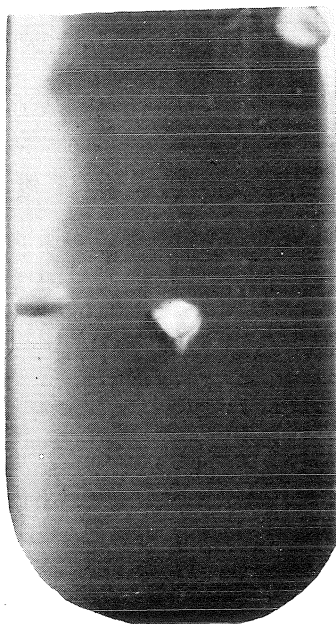


FIG. 2. — El mismo germen. Colonias en forma de lentes entrecruzados.

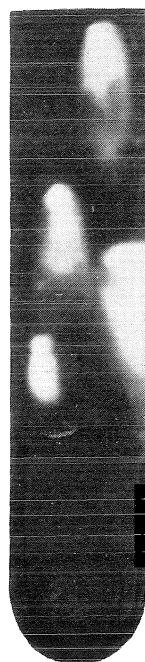


FIG. 3. — Colonias en la profundidad del agar blando con glicerol.

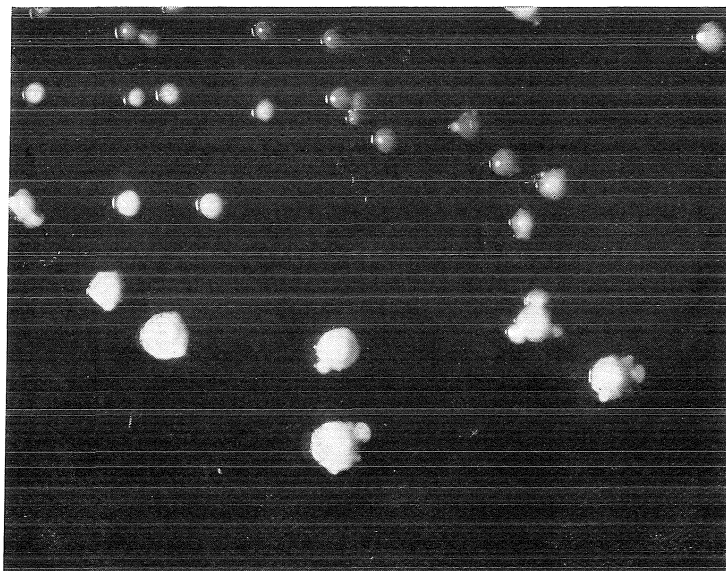


FIG. 4. — Colonias del *L. bifidus*, desarrolladas en la superficie del agar-sangre-hígado.

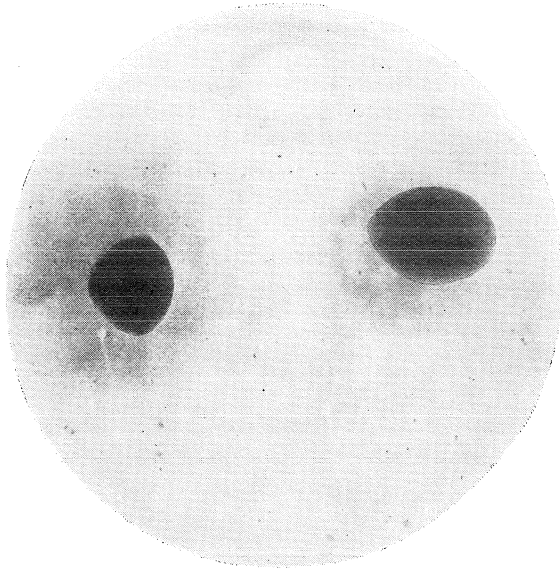


FIG. 5. — Microcolonias en los cultivos por adhesión con agar blando glucosado.

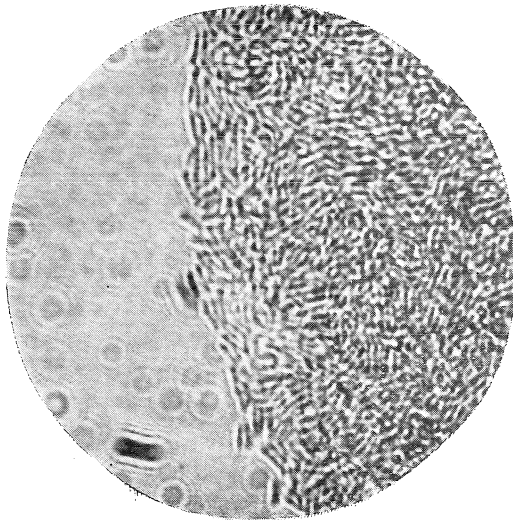


FIG. 6. — Borde de la microcolonia en donde se ven los bastoncitos formando una línea regular.

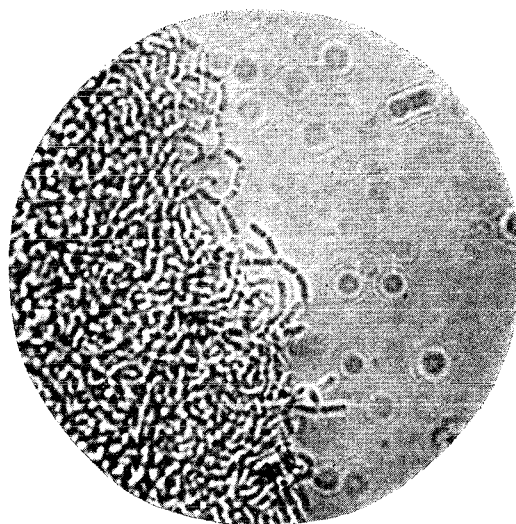


FIG. 7. — Borde de una microcolonia de un cultivo por adhesión del *L. acidophilus*. Los bastoncitos forman cadenas y arcadas, comunicando a la colonia un contorno irregular.

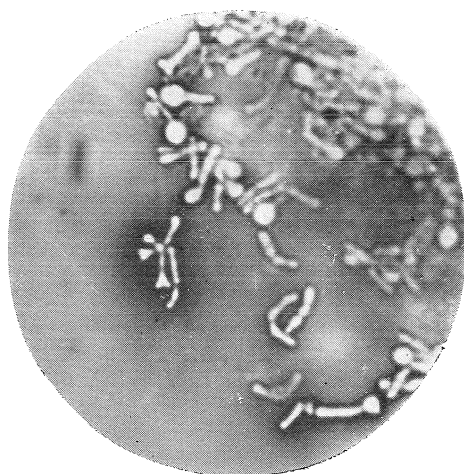


FIG. 8. — Formas de involución del *L. bifidus*.

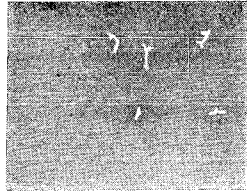


FIG. 9. — Elementos comunes de *L. bifidus*.

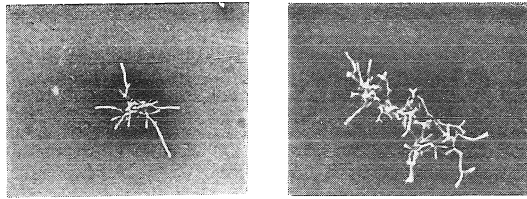


FIG. 10 y 11. — Formas con micelio filamentoso rudimentario.

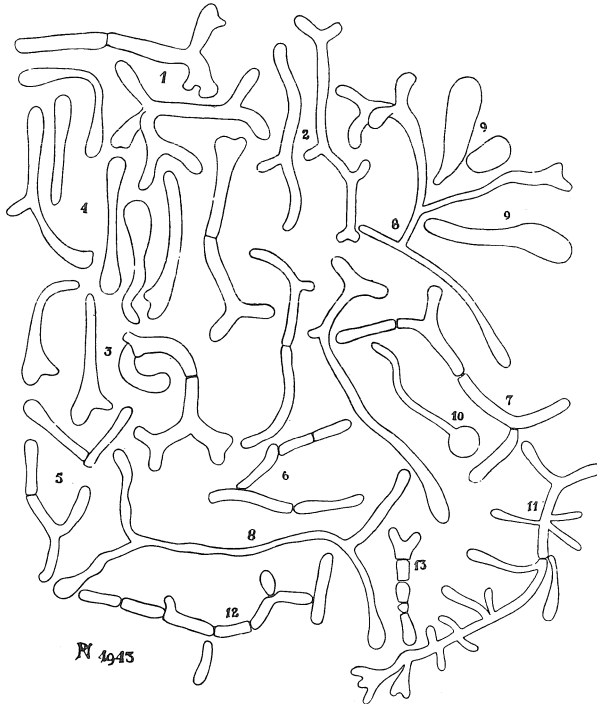


FIG. 12. — Diversos aspectos micromorfológicos del *L. bifidus*, tomados con la cámara clara.

