

Investigaciones sobre las bacterias anaerobias activas en el enriamiento industrial del lino (*)

POR EL ING. AGR. SANTOS SORIANO (**)

I — ANTECEDENTES

Fribes fué el primer investigador que logró aislar en cultivo puro una bacteria anaerobia esporulada, capaz de producir la separación de las fibras en el proceso de enriamiento del lino. Los resultados de esta investigación sólo fueron dados a conocer en una comunicación hecha por Winogradsky, en cuyo laboratorio fué realizado el trabajo, a la Academia de Ciencias francesa, en el año 1895 (1), en la cual se denominó a dicho organismo «la bacteria del enriamiento del lino», estudiándola en sus más importantes propiedades morfológicas y fisiológicas.

Behrens, en 1902, describió un «Clostridio del enriamiento del cáñamo», como el agente específico de la separación de las fibras en esa planta textil. En este caso se trata también de una bacteria anaerobia esporulada, que el autor logró aislar en cultivo puro tan sólo en una ocasión, después de no poco trabajo.

Beijerinck y Van Delden, en 1904, aislaron en cultivo puro y describieron el *Granulobacter pectinovorum* como la bacteria específica activa en el enriamiento del lino, que se encuentra generalmente acompañada por el *Granulobacter urocephalum*, muy poco activo como agente pectinolítico. Ambas bacterias son igualmente anaerobias y esporuladas.

Störmer, en el mismo año, logró aislar el *Plectridium pectinovorum*, bacteria esporulada a la que atribuyó la propiedad de comportarse como

(*) Trabajo realizado en los laboratorios del Instituto de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

(**) Director del Instituto y Profesor titular de Microbiología Agrícola.

(1) Ver bibliografía al final del trabajo.

anaerobia facultativa, describiéndola como la bacteria activa en el enriamiento del lino.

Carbone, en 1917, describió y aisló, (aunque en cultivo discutiblemente puro), una nueva bacteria anaerobia absoluta, a la que denominó *Bacillus felsineus*, dotada de una fuerte capacidad pectinolítica, a la cual atribuyó la propiedad específica del enriamiento del cáñamo, lino y otras plantas textiles, sosteniendo que las demás bacterias, anteriormente descritas como capaces de efectuar ese proceso en la naturaleza, no poseían una capacidad pectinolítica como la demostrada por la que él encontrara y debían ser, en consecuencia, consideradas como «pseudo-enriadoras», correspondiendo únicamente a su bacteria la función de verdadera «enriadora».

Ruschmann y Bavendamm, en 1925, aunque comprobaron la propiedad fuertemente enriadora del *Bac. felsineus*, manifiestan la opinión de que en el enriamiento natural del lino, tal como se lo observa en los establecimientos industriales, esa bacteria queda desplazada por las formas que ellos denominan *Bac. amylobacter l.* o sea licuantes de la gelatina, para diferenciarlas de las n.l. o no licuantes, que no poseen propiedades enriadoras.

Sordelli y Soriano, en 1928, aislaron el *Bac. felsineus* en cultivo puro, de un preparado de «Felsinozima» en polvo obtenida de Italia y demostraron, además, la existencia de esa especie de bacteria en la Argentina, en una muestra de tierra y en lino enriado en el laboratorio.

Soriano, en 1929 y en 1930, describió una nueva bacteria anaerobia esporulada, enriadora, a la cual denomina *Bac. Haumanii*, distinta del *Bac. felsineus* de Carbone y del *Bac. amylobacter l.* de Ruschmann, que fué encontrada como contaminante en un cultivo proveniente de material de lino enriado.

Sordelli y Soriano, en 1930, describen el aislamiento y los caracteres del *Bac. felsineus*, en cuya ocasión corroboran las conclusiones de Ruschmann y Bavendamm acerca de las propiedades de esta bacteria en cultivo puro, y demuestran, por procedimientos bacteriológicos y suerológicos que esta especie difiere tanto del *Bac. Haumanii* como de otros cultivos de *Bac. amylobacter* probados, en la forma que lo hacen, en general, las especies distintas.

Orla-Jensen y Kluyver, en 1939, estudiaron dos materiales provenientes de enriamiento de lino, tal como se efectúan en la industria en Holanda, y reconocieron que la especie activa, en esas condiciones, era el *Clostridium felsineum*.

Con los trabajos fundamentales aparecidos desde 1895 hasta la actualidad, en el lapso de los 55 años transcurridos desde la descripción

de la primera bacteria enriadora del lino aislada en cultivo puro, citados en la reseña histórica que acaba de efectuarse, las opiniones sostenidas por los autores que se han ocupado de la determinación de la especie bacteriana a la cual debe atribuirse la realización del proceso de enriamiento en las condiciones en que se efectúa en la industria moderna por el método de inmersión del textil en agua, pueden sintetizarse en las dos siguientes: unos, como Fribes, Beijerinck, Ruschmann, etc., atribuyen dicha función al *Cl. pectinovorum*, mientras que Carbone y más recientemente Orla-Jensen y Kluyver sostienen que la especie activa, en esas condiciones, es el *Cl. felsineum*.

En los trabajos realizados en nuestro país en 1928-1930, el autor en colaboración con el Prof. Dr. Sordelli o solo, no logró aislar otras formas de bacterias dotadas de propiedades pectinolíticas que el *Cl. felsineum* y el *Cl. Haumanii*, aunque en el segundo el poder enriador era notablemente inferior al primero y su aislamiento sólo pudo ser efectuado en una sola ocasión, en forma casual, como contaminante de otro cultivo no pectinolítico. La circunstancia de no haber podido comprobar poder enriador alguno en una cepa de *Cl. amylobacter* l recibida directamente de Ruschmann, unida al hecho de que ninguno de los cultivos que pudieron ser clasificados entonces como *Cl. amylobacter* fuera capaz de demostrar esa propiedad, indujo al autor a retomar el problema, para ver si en los procesos naturales de enriamiento por sumersión en agua, tal como se realizan en la industria en el país, es el *Cl. amylobacter* (*Cl. pectinovorum*) o el *Cl. felsineum* la forma predominante y activa o si podía reconocerse, en último caso, alguna otra especie bacteriana pectinolítica, activa en el proceso en cuestión.

En el curso del presente trabajo, se tuvo ocasión de examinar un número relativamente grande de muestras de linos enriados en establecimientos industriales o provenientes de ensayos realizados en algunas reparticiones nacionales, a las que se unieron diversas otras correspondientes a ensayos efectuados en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires y finalmente, muestras provenientes de los ensayos de enriamiento hechos en las dependencias de la Cátedra de Cultivos Industriales de la misma Facultad.

, II — MÉTODOS

Los métodos de investigación utilizados en la ejecución de las distintas etapas del trabajo fueron los siguientes:

1. *Recolección y tratamiento del material*: El material de estudio consistió, generalmente, en muestras de lino enriadas, que se obtuvieron

de los lugares de origen, tomándolas con las precauciones elementales necesarias a objeto de evitar que pudieran mezclarse o contaminarse unas con otras.

Una vez llegadas al laboratorio, las muestras se disponen para ser estudiadas efectuando, de cada una por separado, una suspensión espesa del material microbiano en agua esterilizada, la cual se pasteuriza en baño-maría a 80°C durante 10 minutos para eliminar las formas vegetativas, quedando tan sólo las bacterias esporuladas para ser cultivadas en la operación del aislamiento.

2. *Medios de cultivo:* Los medios de cultivo utilizados para la realización del trabajo se detallan a continuación, agrupados en la forma que sigue:

Medios de cultivos para los aislamientos:

a) *Agar de papa glucosado con peptona:* Se prepara con 20 % de papa, 0,5 % de peptona, 2 % de glucosa y 2 % de agar. La reacción se arregla a pH 7-7,2. Para los aislamientos en cajas se agrega, además el 1 % de creta precipitada, pura.

b) *Agar de levadura glucosado:* Se usó la fórmula empleada por Orla-Jensen y Kluyver, pero se utilizó levadura autolizada en la forma que se dirá más adelante en j). Al agua de levadura autolizada de concentración simple, arreglada a pH 7, se agrega 2 % de glucosa y 2 % de agar en rama. En caso de usarse el medio para aislamientos en cajas, se agrega, además, el 1 % de creta, precipitada, pura.

c) *Agar de mosto de malta:* Se preparó con las proporciones indicadas por Beijerinck y van Delden, usando el mosto diluido hasta 2° Brix, adicionado de 2 % de agar y 2 % de creta. El mosto de malta inicial fué preparado siguiendo las prescripciones de Henneberg, y clarificado con clara de huevo, antes de ser utilizado para la confección del agar.

d) *Agar de hígado glucosado:* Fué preparado de acuerdo con las indicaciones de Torrey, usando infusión de hígado (al 50 %), con 1 % de peptona, 1 % de glucosa, 0,1 % de fosfato bipotásico y 2 % de agar, con la reacción arreglada a pH 7-7,2.

e) *Agar de zanahoria:* Se usó la fórmula de Rochaix, algo modificada, descrita en un trabajo anterior (Soriano 1929), empleando jugo de zanahoria exprimida, diluido $\frac{1}{2}$, y agar al 2 %. pH: 7-7,2.

f) *Agar de verduras:* Este medio fué desarrollado durante la ejecución del presente trabajo. Su empleo, dió un resultado satisfactorio, superior al de los otros medios ensayados, particularmente al agar de zanahoria, pero no pareció presentar mayores ventajas que otros más simples, co-

mo el agar de papa o el agar de levadura. Las proporciones de los ingredientes son las que siguen: zanahoria 60, papa 20, tomate 20, agua de levadura autolizada 20, agua 80, agar 2 %, pH 7.

Medios de cultivo para el estudio de los cultivos puros:

g) *Lino con zanahoria y agua de levadura:* Este medio fué también ideado durante el curso de la presente investigación, y su empleo dió un excelente resultado, no sólo para conseguir un buen desarrollo de los primeros cultivos, a partir de las colonias aisladas, sino también para investigar la capacidad de enriamiento de los mismos y obtener, finalmente, una esporulación satisfactoria,

La composición y preparación del medio es como sigue: Tallos de lino cortados en trocitos de unos 4 a 5 cm. de longitud y hervidos en agua, que luego se elimina; zanahoria cortada en cubitos de unos 0,5 a 0,7 cm. de lado, hervidos en agua, en proporción del 20 %; líquido de ebullición de la zanahoria (infusión de zanahoria) diluída $\frac{1}{2}$; agua de levadura autolizada (doble concentrada) 5 %; creta 0,3 %. Se reparten los tallitos de lino, ya hervidos, en tubos de ensayo, a razón de unos 15 en c|u, se agrega un solo trocito de zanahoria, hervida, se reparte el líquido (compuesto por la infusión de zanahoria diluída $\frac{1}{2}$, agua de levadura al 10 %, y creta al 0,3 %), en cantidad de unos 12 ml. por tubo y se coloca finalmente, tapón de vas-par.

h) *Lino:* Trozos de tallos de lino, cortados como en el medio anterior, y distribuidos a razón de unos 15 en cada uno con agua hasta cubrirlos y tapón de vas-par. Conviene agregar 10 % de agua de levadura autolizada y 0,3 % de creta. En este medio se obtiene una buena esporulación, pero la actividad pectinolítica se observa menos nítidamente que con zanahoria.

i) *Zanahoria:* Trozos de zanahoria cortados en cubitos de unos 0,5-0,7 cm. de lado, hervidos al 20 % en agua y distribuídos en tubos con tapón de vas-par. Conviene también agregar 10 % de agua de levadura y 0,3 % de creta.

j) *Agua de levadura glucosada:* El agua de levadura usada en este medio se prepara con levadura autolizada (a 50° C por 24-48 hs.), se diluye luego al 20 % en agua, y se clarifica con clara de huevo. El líquido claro así obtenido resulta doble concentrado, y para usarlo se diluye $\frac{1}{2}$ con agua; se arregla la reacción a pH 7; se agrega 1 % de glucosa, y se reparte en tubos con tapón de vas-par. Puede agregarse (y en general conviene) 0,5 % de creta, en cuyo caso no es necesario arreglar de antemano la reacción.

k) *Mosto de cereales con creta:* Se empleó la fórmula de Henneberg,

usando dos partes de malta y una de centeno en la harina inicial. Se sacarifica, separando, al final, tan sólo el material grueso, lo cual se consigue pasando por un lienzo y estrujando. Al líquido, con el material fino en suspensión, se agrega 3 % de creta, se reparte en tubos, agitando bien cada vez, y se provee a éstos de tapón de vas-par.

l) *Caldo de hígado glucosado*: El caldo de hígado se prepara como ya se ha dicho anteriormente en d). Se agrega 1 % de glucosa y se distribuye en tubos, también con tapón de vas-par.

m) *Legumbres*: Se usaron alverjas (de acuerdo con Störmer), porotos y garbanzos, obteniéndose mejor resultado con porotos. Se reparte una semilla por tubo, se agrega unos 10 ml. de agua en c|u. y se cubren con vas-par.

n) *Puré de papa*: Se prepara hirviendo papas al 20 % en agua, pasando la parte sólida por un prensa-puré, y, después de tamizada, se reúne con el líquido. Se agrega 0,3 % de creta y se reparte con cuidado en tubos agitando fuertemente cada vez.

o) *Gelatina de mosto de malta*: Al mosto de malta preparado como en c), se agrega 15 % de gelatina, se arregla la reacción a pH 7, se clarifica con clara de huevo y se reparte en tubos como para punción.

Todos los medios de cultivo descriptos, se esterilizan a 120° C por 15 minutos, o mejor, en el caso, frecuente, de contener bastante azúcar, a 115° C por 20 minutos. Para los mostos conviene más la esterilización a 110° C por ½ hora y, finalmente, para la gelatina, la tindalización, por ½ hora cada vez.

3. *Aislamientos*: Los aislamientos pueden ser efectuados en tubos o en cajas de Petri; en el primer caso se logran obtener colonias a las 24 horas, y cultivos, a partir de las mismas, a las 48 horas, pero la seguridad de la pureza de los cultivos así obtenidos no es tan grande como con el método de las cajas. A continuación se describen, someramente, los detalles más importantes de ambos métodos.

a) *Aislamientos en tubos*: Para cada operación de aislamiento se emplean 5 ó 6 tubos con un medio de cultivo apropiado, solidificado con agar al 2 %. Los tubos, licuados en baño-maría y entibiados, se siembran, en diluciones sucesivas, comenzando con una o dos gotas de la suspensión original, y una vez enfriados, se incuban a 35°-37° C; al día siguiente, o a más tardar a los 2 días, se examinan para proceder al aislamiento de las colonias aparecidas, que se siembran en tubos conteniendo un medio líquido apropiado, provistos de tapón de vas-par, a los cuales, para mayor seguridad en el desarrollo de los cultivos, se agrega un poco de levadura viva, a objeto de asegurar la anaerobiosis.

b) *Aislamientos en cajas*: Se utiliza el método de siembra por estrías en superficie, efectuándose seis estrías sucesivas en cada caja, partiendo de un ansa de la suspensión original, que se deja secar antes de comenzar el estriamiento. Las cajas se secan previamente en estufa de 37° C, a objeto de obtener una desecación de la superficie del medio lo más completa posible.

Todas las cajas, reunidas en grupos de 10, se colocan en tarros de vidrio de boca ancha, (de unos 4 litros de capacidad) con avena remojada, para obtener condiciones de anaerobiosis. Finalmente, se cierra la tapa con plastilina y se lleva a incubar en estufa de 33°-35° C por 3-4 días, tiempo necesario y suficiente para la obtención de colonias bien desarrolladas, en su mayor parte conteniendo bacterias ya esporuladas.

Las colonias son estudiadas, con lentes de poco aumento, y luego transplantadas a tubos conteniendo un medio de cultivo favorable, con levadura viva y tapón de vas-par, como se ha mencionado anteriormente.

4. *Estudio de los cultivos puros*: Los cultivos obtenidos por el aislamiento de las colonias, en la forma que se acaba de indicar, fueron reunidos sistemáticamente, a objeto de formar una colección, con la idea de efectuar un estudio monográfico del grupo de fermentos butíricos y butílicos, en unión con otros cultivos, provenientes de distintos materiales.

Todos los cultivos aislados de material de lino enriado, y que demostraron poseer propiedades pectinolíticas, fueron incluídos en el presente trabajo. Para determinarlo, se efectuaron, con los mismos, las comprobaciones que a continuación se indican, dejando el estudio completo de todas sus características morfológicas, fisiológicas y de cultivo para una ocasión posterior.

a) *Morfología*: La determinación de la forma y disposición celular de los cultivos en estudio, fué hecha mediante preparaciones microscópicas directas, sin o con coloración. Generalmente, de las colonias aparecidas en las cajas, o tubos, se realizó una observación microscópica antes de efectuar los aislamientos, para comprobar las semejanzas o diferencias morfológicas que pudieran existir entre las colonias que se estaban aislando. Posteriormente, de los cultivos obtenidos en los tubos, se efectuó una nueva preparación directa, a fin de corroborar las características morfológicas ya observadas.

b) *Esporulación*: La capacidad de producir esporas y la observación de su forma y de la del esporangio, fué realizada también con material obtenido de las colonias aparecidas en las cajas de Petri e igualmente de los cultivos en los medios líquidos en que las mismas fueron sembradas al efectuar los aislamientos.

La observación de las formas esporuladas en el lino, se efectuó por el método de coloración ISF (iodo-sulfúrico-formol) descrito por Butterworth.

Además, el calentamiento de los cultivos sembrados, a 75 u 80°C durante 10 minutos, al efectuar los trasplantes, se interpretó, en el caso de obtenerse desarrollo, como un indicio seguro de la presencia de esporas.

c) *Movilidad*: Ocasionalmente, la movilidad de las células fué notada al efectuar las observaciones morfológicas con el material de las colonias, pero en general se comprobó en los cultivos hechos en los medios líquidos en tubos, con o sin levadura vida, provistos de tapón de vas-par.

d) *Colonias*. La forma y demás características de las colonias en superficie fué estudiado en cajas de Petri, sembradas en estrías sucesivas, como se mencionó anteriormente. Las colonias en profundidad fueron obtenidas en tubos de ensayo comunes, con agar, sembrados por dilución.

La formación de colonias con bordes bien limitados, en superficie, fué obtenida, a pesar de la excesiva humedad existente en los recipientes de incubación en anaerobiosis, mediante el uso de trozos de papel secante previamente mojados con CaCl_2 y secados.

e) *Cromogenesis*: La propiedad de formar pigmentos coloreados en los cultivos fué observada en las colonias en cajas de Petri, empleando medios con agar adicionados de creta, que parece favorecer la cromogenesis.

También se observó la formación de pigmento en tubos de puré de papa con creta, preparados con tapón de vas-par para asegurar la anaerobiosis.

f) *Pectinolisis*: La capacidad pectinilítica fué comprobada de diversas maneras, sembrando e incubando por unos días, tubos con agua de levadura diluída 1/10 ó 1/5, conteniendo, además: 1) trozos de lino, observando la separación o ablandamiento de los tejidos; 2) trozos de zanahoria, observando la desintegración o ablandamiento de los tejidos; 3) trozos de lino y un trocito de zanahoria, observando, a las 24-48 horas, la desintegración, y a los 5-6 días, el ablandamiento de la zanahoria. Los trozos de lino, en el último medio citado, fueron colocados a objeto de obtener una buena esporulación de los cultivos en estudio.

g) *Proteolisis*: La propiedad de utilizar proteínas nativas, que parece ser una cualidad común a todas las bacterias enriadoras, fué estudiada por la licuación de la gelatina, utilizando tubos de gelatina (al 15 %) de mosto de malta diluído $\frac{1}{2}$ provistos de tapón de vas-par; en ocasiones se utilizaron también tubos sin vas-par, introduciéndolos, en ese caso, en tarros con avena remojada, para obtener la anaerobiosis. Al cabo de unos 5-6 días de incubación, los tubos se colocan en tarros con trozos de

hielo, o se dejan por unas horas en la heladera, observando luego la incapacidad de volver a solidificarse, que se produce en el caso de haber sido atacada la gelatina.

El conjunto de las observaciones efectuadas, de la manera que se acaba de describir, permitió, en general, identificar las formas de las bacterias en estudio que se encuentran activas en el proceso natural de enriamiento del lino, tal como se efectúa en la industria, por el método de sumersión en agua, es decir, en condiciones prevalentemente anaeróbicas.

En todos los casos en que no se pudo llegar a la identificación de las formas bacterianas aisladas, se efectuaron otras determinaciones necesarias, como: fermentación de azúcares, reducción de colorantes, comportamiento en diversos medios líquidos y sólidos, etc., hasta lograr, al menos, una identificación probable de todos los cultivos incluidos en el trabajo.

III — INVESTIGACIONES

El presente trabajo fué comenzado en junio de 1945, continuado durante los años 1947 y 1948, y terminado en Abril de 1949. En el curso del mismo se efectuó el estudio bacteriológico de 30 muestras de linos enriados, 24 de las cuales corresponden a materiales de establecimientos industriales situados en el país y en el extranjero y las 6 restantes a linos enriados en ensayos semi-industriales efectuados en dos reparticiones nacionales.

El aislamiento de los microorganismos predominantes, dotados de actividad enriadora, fué efectuado, preferentemente, en forma directa, al principio, en las experiencias de 1945, por el método de dilución en tubos, usando diversos medios de cultivo solidificados con agar al 2 %, y luego por el método de las cajas de Petri, sembradas en estrías, en superficie. En algunos casos, se ensayaron también algunos métodos de enriquecimiento, sembrando el material original en medios de cultivo líquidos, con diversos agregados, especialmente en medios con trozos de lino o de zanahoria, esterilizados, prosiguiendo, luego, con el aislamiento de las formas enriquecidas en el material enriado.

De esa manera, se realizaron 26 análisis directos y 5 por enriquecimiento, es decir, 31 análisis microbiológicos de las 24 muestras provenientes de establecimientos industriales, 18 de las cuales corresponden a linos enriados en el país, y 6 en el extranjero, y 9 análisis directos, y uno por enriquecimiento, o sea otros 10 más, de las 6 muestras de linos enriados en ensayos semi-industriales, efectuados en el país.

En total, con las 30 muestras de materiales estudiados, se hicieron

41 análisis microbiológicos, con el objeto de tratar de identificar la o las especies de bacterias anaerobias a las cuales pueda atribuirse la realización del proceso de enfriamiento del lino, en las condiciones en que se efectúa en la industria, por el método de inmersión en agua.

Los cultivos obtenidos en esa forma, fueron estudiados microscópicamente y, en caso necesario, convenientemente purificados mediante nuevos aislamientos por dilución en agar, después de lo cual se realizaron, con cada uno de ellos, las determinaciones del poder enriador, licuación de gelatina y el estudio somero de sus características morfológicas y de cultivo, a objeto de obtener, en lo posible, una rápida identificación específica.

A continuación, se detallan los materiales estudiados en este trabajo, agrupándolos de la manera que se ha indicado anteriormente.

A — Linos enriados en establecimientos industriales:

1) «*Linotex*» Nos. 1 a 10: Estas muestras provienen del establecimiento «*Linotex*», situado en el partido de Pergamino, Provincia de Buenos Aires. Los linos correspondientes fueron enriados en piletas, por el método de inmersión, en las cuales, cierta proporción del agua se elimina periódicamente, reemplazándola por nueva, hasta la terminación del proceso.

Las dos primeras muestras de esta serie fueron obtenidas y estudiadas en 1945 y corresponden a linos de dos piletas distintas, enriados por 3 ½ días (enriamiento incompleto), y 4 ½ días (enriamiento completo), respectivamente.

En 1947 se efectuó, nuevamente, el estudio microbiológico de las mismas muestras y los cultivos obtenidos fueron agregados a los anteriores. En uno y otro caso, se empleó el método de aislamiento directo por dilución, en tubos.

De la muestra *Linotex* N° 2, se efectuó también, en 1947, además del aislamiento directo, un enriquecimiento en tubos con agua de levadura y trozos de lino y con el mismo líquido y trozos de zanahoria, después de lo cual se prosiguió con el aislamiento por dilución en tubos de agar, de las bacterias enriquecidas en los medios nombrados.

Las restantes muestras, Nos. 3 a 10, del mismo origen, fueron obtenidas y estudiadas en 1947, empleándose, en el aislamiento de los cultivos correspondientes, el método de siembra directa en cajas de Petri, y utilizando, como medios de cultivo, agar de papa glucosado, agar de agua de levadura glucosada con creta y agar de mosto de malta diluido, con creta.

De la muestra *Linotex* N° 9, de igual manera que se hizo con la N° 2,

se efectuó también un enriquecimiento en un tubo de trozos de lino con agua de levadura, luego de lo cual el material tomado del lino enriado fué sembrado en cajas para proceder al aislamiento de las bacterias enriquecidas en el medio mencionado.

2) «*Línera*» Nos. 1 a 7: Estas muestras corresponden a linos enriados en el establecimiento «*Línera Bonaerense, S. A.*», situado en la estación Jáuregui, Prov. de Buenos Aires, también por el método de inmersión, pero en el cual el agua se hace correr lentamente, regulando su velocidad en forma apropiada, y suspendiéndola en el momento que se juzga oportuno, al final del proceso de enriamiento.

Los aislamientos fueron realizados en este caso por siembras en estrías en cajas de Petri, conteniendo agar de agua de levadura glucosada y creta, y agar de mosto de malta diluído también con creta.

3) *Tucumán*: Corresponde a un lino enriado en la provincia de Tucumán, obtenido por gentileza del Ing. Agr. Carlos V. Marciotte, quien comunicó a la vez las referencias recogidas en el lugar, de que los linos cultivados en la región, se opina que enrían muy bien. De esta muestra se efectuó un aislamiento directo por siembras en cajas de Petri, en estrías, y otro consecutivo a un ensayo de enriquecimiento hecho en tubos de lino con levadura, utilizando, en ambos casos, los dos medios de cultivo mencionados al final del tratamiento de las muestras anteriores.

4) *Río Lys (Bélgica N° 1)*: Esta muestra corresponde a un lino enriado en el río Lys (Bélgica), famoso lugar de enriamiento del lino, que fué posible obtener gracias a la gentileza del señor Julio Steverlynck, de la «*Línera Bonaerense, S. A.*» (1).

Por el interés especial que merecía esta muestra, debido a su origen, fueron efectuados aislamientos directos en cajas y en tubos, y además enriquecimientos en tubos con trozos de lino y de zanahoria, con sus aislamientos consecutivos correspondientes. Los medios de cultivo empleados en los aislamientos fueron los ya nombrados, con creta, y, además, el agar de papa glucosado para las cajas, y el agar de agua de levadura glucosado y agar de papa peptonado y glucosado, en ambos casos sin creta, para los tubos.

5) *Bélgica Nos. 2 y 3, Chile Nos. 1 y 2, y Holanda*: Todas estas muestras, de distinta proveniencia como está indicado, fueron obtenidas en

(1) El autor se complace en agradecer muy especialmente aquí al señor Steverlynck, por su extremada gentileza, al encargarse de hacerle remitir una muestra, por vía aérea, desde su lugar de origen, apenas le fué transmitido el deseo, por intermedio del Ing. Agr. H. Rubén Batalláñez, de obtener un lino auténticamente enriado en el río Lys. Dicha muestra fué recibida apenas una semana después de solicitada y pudo ser analizada de inmediato.

una visita realizada al establecimiento de tejidos «Lonalino», situado en San Martín, en las cercanías de la ciudad de Buenos Aires. Las fibras enriadas, fueron sacadas, separadamente, de los fardos originales, con suficientes precauciones como para evitar una mezcla de su contenido, usando cada vez un trozo de papel en el cual se envolvía de inmediato. En la preparación de la suspensión del material para sembrar se tuvo la precaución de cortar los trozos empleados, de la parte central del haz de fibras, con lo cual debe descartarse prácticamente, el peligro de una posible mezcla de la microflora existente en el material original, de procedencia tan diversa, como es el caso de las muestras que componen esta serie.

De todas estas muestras se hicieron aislamientos directos por estrías en cajas de agar de agua de levadura glucosada, y de agar de mosto de malta diluída, en ambos casos con creta, y además, de la muestra N° 20 (Bélgica N° 2), también enriquecimiento en tubo con agua de levadura y trozos de lino y zanahoria, y los aislamientos respectivos en cajas empleando el mismo método y medios de cultivo mencionados para las muestras restantes de la serie.

B — *Linos enriados en ensayos semi-industriales:*

1) *Pergamino Nos. 1 a 5:* Estas muestras fueron obtenidas de la Estación Experimental de Pergamino, perteneciente al Ministerio de Agricultura de la Nación. Su enriamiento fué efectuado en piletas de ensayo, por el método de inmersión, con renovación parcial y sucesiva del agua; en dichas piletas, dos años antes de la obtención, en 1945, de las dos primeras muestras, se hizo un ensayo de enriamiento con el agregado de cultivos de *Clostridium felsineum* ¹.

Posteriormente, las piletas fueron refaccionadas íntegramente, y las muestras Nos. 3 a 5 corresponden a ensayos de enriamientos hechos después de la ejecución de esas refacciones.

Las muestras Nos. 1 y 2 corresponden a linos enriados durante 60 y 120 hs., respectivamente, y fueron analizados en 1945 utilizando en los aislamientos el método de dilución en tubos con los medios de cultivo ya citados en el caso de las muestras Nos. 1 y 2 de Linotex, y luego fueron estudiadas de nuevo, por el mismo método en 1947. Las restantes muestras, Nos. 3 a 5, corresponden a linos tomados al término de su enriamiento, y en los aislamientos fué utilizado el método de las cajas sem-

(1) Esta operación fué realizada con la intervención del Prof. Ing°. Agr°. Luis A. Garassini, en esa época Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de La Plata.

bradas en superficie con los medios de cultivo también mencionados en el caso de las demás muestras.

2) *Facultad*: Esta muestra corresponde a un ensayo de enriamiento de lino realizado en un tanque cilíndrico de cemento, instalado en el campo experimental de la Cátedra de Cultivos Industriales de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

El enriamiento fué considerado como casi llegado a su término a los 3 días en cuyo momento fué sacada la muestra para ser estudiada. De la misma se efectuó un aislamiento directo en cajas, por siembra del material en estrías, en superficie, y un enriquecimiento en un tubo de agua de levadura con trozos de lino y zanahoria, y el aislamiento posterior correspondiente en cajas. Los medios de cultivo empleados fueron iguales a los citados en las tres últimas muestras de Pergamino.

Como ya se ha referido anteriormente, el estudio microbiológico de las muestras Linotex y Pergamino, Nos. 1 y 2, realizado en 1945 y principios de 1947, se efectuó mediante el empleo del método de aislamiento por dilución en tubos, pero luego, y a medida que pudo ser resuelta la obtención de colonias bien formadas y no confluentes en la superficie del agar en cajas de Petri, este método fué empleado conjuntamente con el anterior, adoptándose, finalmente, el método de las cajas con los medios de cultivo ya mencionados, conteniendo creta, para todos los aislamientos posteriores.

IV — RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las investigaciones relatadas en el capítulo anterior, se expondrán a continuación, separando también, como se hizo en el mismo, las experiencias efectuadas con los materiales estudiados provenientes de establecimientos industriales, de las que fueron hechas en los ensayos en escala semi-industrial.

A — *Linós enriados en establecimientos industriales*:

Debido a la particular modalidad del método de aislamiento utilizado al principio del trabajo, los resultados obtenidos en el estudio de las muestras Nos. 1 y 2 de Linotex, que fueron las primeras analizadas correspondientes a linos enriados, respectivamente, por 3 $\frac{1}{2}$ y 4 $\frac{1}{2}$ días, se darán por separado de las demás incluídas en este grupo.

En el estudio de esas dos primeras muestras, la diferencia de los tipos de microorganismos obtendios en los aislamientos se dificultó por la imposibilidad de establecer una fácil comparación entre las colonias desarrolladas y efectuar una rápida inspección morfológica de sus componen-

tes, antes de proceder al aislamiento de cada una de ellas, por cuyo motivo debió aislarse y cultivarse un número relativamente grande de colonias, para luego efectuar el estudio de los microorganismos resultantes.

El cuadro N° 1 resume los resultados obtenidos relativos al estudio realizado por aislamientos directos, de las mencionadas muestras Linotex Nos. 1 y 2.

CUADRO N° 1

Investigación de la presencia de bacterias anaerobias enriadoras en las muestras de lino enriado «Linotex» Nos. 1 y 2.

N°	Muestras	Ensayo N°	N° de colonias aisladas	N° de colonias enriadoras			% de colonias enriadoras
				anaran- jadas	blancas	totales	
1	Linotex 1 (3 ½ días)	1	7	0	1	1	14 %
		2	22	0	1	1	5 %
2	Linotex 2 (4 ½ días)	1	21	0	0	0	0 %
		2	22	2	1	3	14 %

Como puede observarse en el cuadro, de la muestra Linotex N° 1 se aislaron 7 colonias sospechosas en el primer análisis hecho en 1945 y 22 en un segundo análisis hecho en 1947, de las cuales, sólo dos colonias, una cada vez, resultaron corresponder a bacterias capaces de producir el enriamiento del lino, cuando fueron probadas en cultivo puro. En ambos casos, los cultivos parecían corresponder a *Clostridium felsineum*, aunque no formaron el color anaranjado, característico de esa especie.

De la muestra Linotex N° 2, se hicieron también dos análisis: el primero en 1945, en que se aislaron 21 colonias sospechosas, ninguna de las cuales demostró poseer propiedades enriadoras, y otro en 1947, en que fueron aisladas 22 colonias, de las cuales 3 resultaron enriadoras. De éstas, 2 presentaban el color anaranjado típico del *Cl. felsineum* y la tercera, si bien semejante en un todo a las otras, era apigmentada.

De la misma muestra N° 2 se efectuaron también en 1947, cultivos de enriquecimiento en trozos de lino con levadura y en trozos de zanahoria; de los tubos de lino no se logró aislar enriadores, pero sí de los de zanahoria, en que se recobraron, por aislamiento en tubos, dos colonias algodonosas, rosadas.

El resultado del estudio de todas las muestras correspondientes a este grupo formado por linos enriados en establecimientos industriales, ha sido reunido, en forma sintética en el cuadro N° 2, en el cual se incluye también el resumen de los resultados obtenidos con las muestras Nos. 1 y 2 que se acaban de exponer.

Según puede observarse en el cuadro N° 2, aparte de lo que se refiere a las muestras Linotex Nos. 1 y 2 que han sido consideradas en el cuadro anterior, sólo 3 de las 22 muestras restantes, incluidas en este cuadro, dieron un resultado negativo al ser probadas, por el método de aislamiento directo en cajas, respecto de la presencia de bacterias anaerobias esporuladas enriadoras. Todas las colonias aisladas provenientes de las cajas

CUADRO N° 2

Investigación de la presencia de bacterias anaerobias enriadoras en las muestras de linos enriados en establecimientos industriales

N°	Muestras	Ensayo N°	Método de aislamiento	Presencia de enriadores	Observaciones
1	Linotex 1	1	Directo tubos	+	Sólo una colonia blanca.
	» »	2	» »	+	» » » »
2	» 2	1	» »	—	Ninguna colonia enriadores
	» »	2	» »	+	Dos cols. anaranj. y 1 blanc.
	» »	3	Enriquecimiento	+	Algunas colonias anaranj.
3	» 3	1	Directo cajas	+	» » »
4	» 4	1	» »	+	» » »
5	» 5	1	» »	—	Ninguna colonia enriadores.
6	» 6	1	» »	—	» » »
7	» 7	1	» »	+++	Casi puro fels. anaranj. y blanc.
8	» 8	1	» »	++	Colonias anaranj. y blancas
9	» 9	1	» »	—	Ninguna colonia enriadores
	» »	2	Enriquecimiento	+	Algunas colonias anaranj.
10	» 10	1	Directo cajas	+	» » »
11	Linera Bon. 1	1	Directo cajas	+++	Casi puro fels. anar. y blanc.
12	» » 2	1	» »	+++	» » » » » »
13	» » 3	1	» »	+++	» » » » » »
14	» » 4	1	» »	+++	» » » » » »
15	» » 5	1	» »	+++	» » » » » »
16	» » 6	1	» »	+++	» » » » » »
17	» » 7	1	» »	+++	» » » » » »
18	Tucumán	1	Directo cajas	+++	Casi puro fels. anar. y blanc.
	»	2	Enriquecimiento	+++	Colonias anaranj. y blancas
19	Río Lys (Bélg. 1)	1	Directo cajas	+++	Predom. fels. anaranj. y blanc.
	Río Lys (Bélg. 1)	2	Enriquecimiento	++	Algunas colonias anaranj.
20	Bélgica 2	1	Directo cajas	+++	Casi puro fels. anaranj.
	»	2	Enriquecimiento	++	Colonias anaranj. y blancas
21	Bélgica 3	1	Directo cajas	+++	Colonias anaranj. y blancas
22	Chile 1	1	Directo cajas	+++	Casi puro fels. blanco
23	Chile 2	1	» »	+	Algunas colonias anaranj.
24	Holanda	1	Directo cajas	++	Colonias anaranj. y blancas

sembradas con los materiales Linotex Nos. 5, 6 y 9, demostraron no poseer capacidad enriadora alguna, al ser examinadas a este respecto.

De estas tres muestras negativas, la última (o sea la N° 9), fué investigada de nuevo, utilizando, esta vez, un método de enriquecimiento en un medio de cultivo favorable al desarrollo de bacterias enriadoras, sembrando el material en un tubo de trozos de lino y zanahoria, con agua de levadura y creta, provisto de tapón de vas-par para asegurar la anaerobiosis. La siembra posterior del material microbiano desarrollado, efectuado, como antes, en cajas de Petri, pudo poner de manifiesto que se había producido, en esta forma, un enriquecimiento de bacterias enriadoras, en número tal, que permitió su reconocimiento y aislamiento inmediato.

No se consideró necesario, en ese tiempo, someter las otras dos muestras al mismo procedimiento, siguiéndose con el examen analítico directo de las demás muestras.

Con respecto a las otras muestras de la misma proveniencia, se ha encontrado que la Linotex N° 7, ha dado en las cajas un desarrollo abundante de *Clostridium felsineum* con las características de un cultivo prácticamente puro, mientras que las restantes (Nos. 3, 4, 8, 10), si bien demostraron contener también la mencionada especie bacteriana enriadora, no se encontró en las mismas en tal cantidad.

Las muestras provenientes de la «Línea Bonaerense, S. A.», resultaron contener, todas, el *Clostridium felsineum*, en cultivo prácticamente puro y como única especie enriadora, hecho que indica un indudable predominio de esta especie en el lugar de origen. A este respecto, es interesante consignar la circunstancia de que parte del agua de las piletas de enriamiento proviene, en ese lugar, de un arroyo donde se vuelca el líquido final de cada operación, de modo tal que su utilización posterior en un nuevo enriamiento, constituye en realidad, una siembra hecha con material de la operación anterior, con lo cual debe haberse producido, al cabo de un tiempo, un verdadero enriquecimiento de las bacterias enriadoras.

Las otras muestras, provenientes de Tucumán, Chile, Bélgica y Holanda, también mostraron contener la nombrada especie, destacándose, por la abundancia del desarrollo en que la misma apareció en las cajas correspondientes y el color de las colonias. En la muestra designada como Bélgica N° 1 (muestra N° 19 del cuadro) se encontró dicha bacteria en cultivo netamente predominante.

Este resultado adquiere una importancia muy especial si se considera el hecho de que la muestra en cuestión corresponde a un lino enriado en

el río Lys, famoso por la excelencia del producto enriado en sus aguas, a las que se atribuye una propiedad excepcional en tal sentido.

Además dieron un desarrollo casi puro de *Cl. felsineum*, la muestra de Tucumán, las otras dos de Bélgica y una de las de Chile.

B — *Linós enriados en ensayos semi-industriales:*

Al igual que con las muestras Nos. 1 y 2 de Linotex, referidas anteriormente, las muestras Pergamino Nos. 1 y 2, correspondiente a linos enriados por 60 hs. y 120 hs. respectivamente, fueron también estudiadas en 1945 utilizando el método de aislamiento por dilución en tubos, usando los medios de cultivo ya citados en esa ocasión.

En el cuadro N° 3, se exponen los resultados obtenidos con las dos muestras mencionadas.

CUADRO N° 3

Investigación de la presencia de bacterias anaerobias enriadoras en las muestras de lino enriado «Pergamino» Nos. 1 y 2.

N°	Muestras	Ensayo N°	N° de colonias aisladas	N° de colonias enriadoras			% de colonias enriadoras
				anaran- jadas	blancas	totales	
1	Pergamino 1 (60 hs.)	1	10	1	1	2	20 %
		2	17	6	3	9	53 %
2	Pergamino 2 (120 hs.)	1	50	10	5	15	30 %
		2	21	2	6	8	38 %

De acuerdo con las cifras consignadas en el cuadro, de la muestra Pergamino N° 1 enriada por 60 hs., se aislaron en total 27 colonias, de las cuales 11 resultaron enriadoras, 7 de ellas con el color anaranjado típico del *Cl. felsineum* y 4 incoloras, pero, por otra parte, del todo semejantes a las coloreadas. De la muestra Pergamino N° 2, enriada por 120 hs. fueron aisladas en total 71 colonias, de las que 23 resultaron enriadoras, 12 de las cuales correspondieron a típicas colonias anaranjadas de *Cl. felsineum* y 11 a colonias de la forma incolora.

El cuadro N° 4, que se incluye a continuación, reúne los resultados obtenidos con las 6 muestras analizadas, correspondientes al grupo de los linos enriados en ensayos semi-industriales, incluyéndose en el mismo, también, el resumen de las dos muestras de Pergamino cuyo detalle se ha dado en el cuadro anterior.

Según puede apreciarse en el cuadro N° 4, aparte de las muestras Pergamino Nos. 1 y 2, cuyos resultados fueron ya comentados en el cuadro N° 3, las restantes muestras (Nos. 3, 4 y 5) de Pergamino, dieron un resultado positivo, encontrándose colonias de *Clostridium felsineum* en todas, especialmente en la muestra N° 5 en que esta bacteria apareció prácticamente con el aspecto de un cultivo puro, aunque incoloro.

CUADRO N° 4

Investigación de la presencia de bacterias anaerobias enriadoras en las muestras de linos enriados en ensayos semi-industriales.

N°	Muestras	Ensayo N°	Método de aislamiento	Presencia de enriadores	Observaciones
1	Pergamino 1	1	Directo tubos	+	Colonias anaranj. y blancas
	»	2	» »	++	Predominan colonias anaranj.
2	Pergamino 2	1	» »	++	» » »
	»	2	» »	++	Predominan colonias blancas
3	Pergamino 3	1	Directo cajas	+	Pocas colonias algo anaranj.
4	Pergamino 4	1	» »	+	» » »
5	Pergamino 5	1	» »	+++	Cult. casi puro fels. blanco
6	Facultad	1	Directo cajas	—	Ninguna colonia enriadora
	»	2	» »	+	Algunas colonias anaranjadas
	»	3	Enriquecimiento	++	Varias colonias coloreadas

Finalmente, el análisis de la muestra designada como «Facultad», demostró contener la bacteria enriadora solamente en muy limitada cantidad, puesto que sólo en un segundo aislamiento directo, reiterado después de haber fracasado el primero, se logró poner de manifiesto su presencia de una manera indudable. Un ensayo de enriquecimiento posterior, efectuado en tubos con lino y zanahoria esterilizados, y el aislamiento respectivo consiguiente puso, además, en evidencia el contenido de *Clostridium felsineum* también en ese material enriado.

En el cuadro N° 5 se han resumido todos los resultados obtenidos en el estudio de las 30 muestras analizadas en el presente trabajo, provenientes de los linos enriados en la industria y en los ensayos semi-industriales a que ya se ha hecho referencia anteriormente, en los cuadros Nos. 2 y 4.

Como puede apreciarse por las cifras consignadas, 21 de las 24 muestras correspondientes al primer grupo, y la totalidad de las 6 muestras correspondientes al segundo, dieron resultado positivo cuando fueron estudiadas por la siembra directa del material original en los medios de cultivo empleados para los aislamientos.

De las tres muestras que dieron resultado negativo por esos métodos, una sola fué analizada de nuevo, posteriormente, mediante un ensayo de enriquecimiento en tubos de lino esterilizado, con trozos de zanahoria y agua de levadura, luego de lo cual se obtuvo un resultado positivo respecto de la presencia de enriadores en los aislamientos respectivos, efectuados con dicho material, una vez fermentado.

Se estudiaron, además, por enriquecimiento, otras cuatro muestras de linos del primer grupo y una del segundo, que ya habían sido anali-

CUADRO N° 5

Número total de las muestras de lino estudiadas en el trabajo, por aislamiento directo y por enriquecimiento y resultados obtenidos respecto de la presencia de bacterias anaerobias enriadoras.

Grupos	Forma de enriamiento	Aislamiento directo		Enriquecimiento		Totales	
		analizados	positivos	analizados	positivos	analizados	positivos
1	Linós enriados en establec. industriales	24	21	(4) + 1	5	24	22
2	Linós enriados en ensayos semiindustriales	6	6	(1)	1	6	6
Total general		30	27	(5) + 1	6	30	28

Las cifras entre paréntesis se refieren a muestras ya analizadas por aislamiento directo con resultado positivo.

zadas, con resultado positivo, por aislamiento directo. Los aislamientos correspondientes a estas muestras, realizados con los medios enriquecidos, dieron también en todos los casos, un resultado confirmatorio del anterior.

Las únicas dos muestras que en el presente trabajo no dieron un resultado positivo, fueron analizadas solamente por siembra directa de material original en los medios de aislamiento, de igual manera que el resto de las muestras estudiadas. No se hizo con ellas un ensayo de enriquecimiento, que sólo fué efectuado con la otra muestra que también dió resultado negativo por aislamiento directo, con un resultado favorable después del enriquecimiento, como ya se relató con anterioridad.

No obstante esto último, el número de muestras en que se logró demostrar la presencia de bacterias anaerobias enriadoras y la constancia de las formas bacterianas obtenidas, se consideró suficiente, como para permitir arribar a las conclusiones que se derivan del trabajo, indicadas

a continuación, no justificándose una reiniciación del estudio de las muestras mencionadas, puesto que no se obtendría otra cosa, en el mejor de los casos, que una confirmación del comportamiento análogo al de la muestra anteriormente aludida.

V — COMENTARIOS

La comparación de los métodos de aislamiento empleados en este trabajo, así como de los diversos medios de cultivo utilizado en dicha operación, permitió poner en evidencia la superioridad del uso de las cajas de Petri, sembradas por estrías, en superficie, con material previamente pasteurizado. La diferenciación de las colonias pudo hacerse, en esa forma, con mucha mayor facilidad que utilizando el método de aislamiento por dilución en tubos, y el procedimiento de identificación de los cultivos se simplificó sobremanera.

Los medios de cultivo que dieron mejor resultado para los aislamientos en cajas fueron: el agar de agua de levadura glucosada al 2 % con 1 % de creta, el agar de mosto de malta diluída a 2° Brix, con 2 % de creta, y el agar de papa glucosado al 2 %, con 1 % de peptona y 1 % de creta.

Para los aislamientos en tubos, se obtuvieron igualmente buenos resultados con el agar de agua de levadura glucosada, el agar de papa peptonado y glucosado y el agar de hígado glucosado, prefiriéndose el primero por su mayor transparencia y facilidad de preparación.

La determinación de la capacidad de producir enriamiento por los cultivos bacterianos aislados, significó una tarea extensa y delicada no sólo por el número de cultivos distintos (más de 500) que debió manejarse durante el curso del trabajo, sino también porque de la eficacia del método empleado podía depender la decisión definitiva que debía tomarse respecto de esa importante propiedad.

Luego de ensayar diversos métodos y medios de cultivo, todos los cuales se basan en la manifestación de la propiedad pectinolítica por los cultivos en estudio, se llegó al desarrollo de un método suficientemente simple y práctico, consistente en el uso del medio de cultivo de lino con zanahoria y levadura detallado en otra parte del trabajo, en el cual, a las 24-48 horas pueden reconocerse, con facilidad, las bacterias fuertemente enriadoras y a los 5-8 días las enriadoras débiles y no enriadoras, como ya se ha mencionado anteriormente. En este medio se ha logrado, también, obtener una esporulación satisfactoria de todos los cultivos de bacterias estudiados en el trabajo, varios de los cuales no han producido esporas, sino con dificultad, en otros medios de cultivo conocidos.

La aparición de colonias blancas, observadas primero en los tubos de aislamiento, las que parecían corresponder a *Clostridium felsineum* por el resto de sus características, salvo la falta de coloración anaranjada, planteó, en un principio, la sospecha de que podría tratarse del *Clostridium* (*Granulobacter*) *pectinovorum* de Beijerinck y van Delden, para el cual los autores citados, y otros, no mencionan la formación de pigmento alguno. Esta sospecha se acentuó posteriormente cuando, al emplear el método de las cajas sembradas en superficie, se dispuso de una posibilidad de fácil observación de otros caracteres, como el aspecto de «moiré» de sus colonias, que se tiene como característico de esta especie, y la morfología de las células vegetativas y esporangios que las constituyen.

Por otra parte, las diversas formas y coloraciones de colonias y transiciones entre ellas, y las semejanzas que se han podido establecer entre los numerosos cultivos aislados, ha permitido formarse una idea posiblemente más exacta del límite específico del *Clostridium felsineum*, de modo que en atención a ese concepto, los cultivos de colonias incoloras (designados en las anotaciones como *felsineus* blanco) fueron considerados, finalmente, como pertenecientes a dicha especie.

De esa manera quedó, pues, en pie la cuestión referente a la presencia de la especie de Beijerinck en los linos enriados que, a juzgar por el categórico resultado de su trabajo magistral debe corresponder a la bacteria específica causante del enriamiento del lino. En tal sentido cabría adelantar la hipótesis de que el *Clostridium felsineum* de Carbone, (al menos las formas de colonias incoloras) no sería otra cosa que el *Clostridium* (*Granulobacter*) *pectinovorum* de Beijerinck y van Delden, descrito 13 años antes por los autores citados, cuestión que sólo puede ser resuelta apropiadamente, mediante una comparación directa de los cultivos originales, lo cual se tratará de realizar, si es posible, en una ocasión futura.

Respecto de este interesante asunto, cabe manifestar que la circunstancia de que los numerosos cultivos aislados en el curso del presente trabajo, que resultaron corresponder a la forma de *Clostridium amylobacter* l. de Ruschmann, licuantes de la gelatina, y que, probados con el método que aquí se describe, fueron clasificados, invariablemente, como enriadores débiles, difícilmente puede conciliarse con la manifestación de los autores holandeses que asignan a su bacteria un fuerte poder enriador, y con su reconocimiento como la bacteria específica del enriamiento del lino. La hipótesis aquí planteada podría representar, en el caso de confirmarse, una solución satisfactoria del problema.

El aislamiento de dos cultivos con ciertas características diferenciales

típicas, efectuado en dos ocasiones, durante el desarrollo del trabajo, con un material proveniente de un lino enriado en el país (Tucumán) y otro enriado en el extranjero (Río Lys), aunque en escasa cantidad respecto de los cultivos de *Clostridium felsineum*, también encontrado en ambos casos planteó, igualmente, un problema de sistemática dentro del grupo de las bacterias anaerobias esporuladas enriadoras, cuya solución se ha dejado para más adelante, cuando se espera efectuar el estudio sistemático detallado de todos los cultivos de fermentos butíricos y butílicos que se han reunido, correspondientes a éste y a otro trabajos similares en que se han encontrado bacterias de este grupo.

No obstante, corresponde adelantar que la forma de los cultivos aludidos, a la que se denominó provisionalmente «clostridio curvo», podría representar una variedad del *Clostridium felsineum* o constituir una nueva especie, indudablemente relacionada con ella, de la cual difiere por la forma de sus esporangios, en general, algo encurvados, y el color amarillo o herrumbre, así como el tamaño limitado y aspecto distinto, de su colonia.

Los resultados finales obtenidos en esta investigación, confirman la conclusión del trabajo de Orla-Jensen y Kluver en el que se comunica que la bacteria enriadora encontrada en muestras de lino enriados en establecimientos industriales de Holanda, resultó ser el *Clostridium felsineum*.

El citado trabajo conjuntamente con el actual constituyen, pues, una corroboración experimental del punto de vista sostenido por Carbone, durante muchos años en Italia, de que la bacteria por él descubierta sería la única forma realmente activa del enriamiento del cáñamo y del lino, llegando, por su parte, hasta a considerar que ella es también la única bacteria que se comporta como verdaderamente enriadora, mientras que las demás, tan sólo llegan a actuar como pseudo-enriadoras.

En abierta contradicción con ésta está la opinión de Ruschmann y colaboradores, en Alemania, quienes, si bien aceptan que el *Clostridium felsineum* es una bacteria capaz de manifestar, en cultivo puro, una potente actividad de enriamiento, no la manifiestan en los procesos de enriamiento natural, por cuanto queda desplazada, en esas condiciones, por las formas de «*Amylobacter*» enriadoras, licuantes de la gelatina.

Los resultados del presente trabajo, no están en favor de la tesis sostenida por los autores alemanes, puesto que, no sólo se pudo aislar reiteradamente y en forma directa, el *Clostridium felsineum* de numerosas muestras de linos enriados en establecimientos industriales, sino que también se consiguió el desarrollo de dicha bacteria, con otras formas de «*Amylobacter*», en los ensayos de enriquecimiento, que se efectuaron

en trozos de lino esterilizado o sin esterilizar, utilizando algunas de las muestras estudiadas en el curso de la investigación.

VI — CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las investigaciones efectuadas en el presente trabajo, permiten establecer las conclusiones siguientes:

1°. — De las 24 muestras estudiadas, correspondientes a linos enriados en establecimientos industriales por el método de sumersión en agua, en el país y en el extranjero, 21, o sea, casi el 90 %, dieron un resultado positivo, al ser examinados respecto de la presencia de bacterias anaerobias esporuladas enriadoras, por el método de la siembra directa de material en los medios de aislamiento.

2°. — La única muestra de lino enriado, de las tres que dieron resultado negativo en los aislamientos directos, en la que se ensayó, posteriormente, el aislamiento de las citadas bacterias enriadoras previo cultivo de enriquecimiento en medios favorables, dió un resultado positivo después de la mencionada operación.

3°. — La totalidad de las 6 muestras de linos enriados, provenientes de ensayos efectuados en escala semi-industrial, dieron un resultado positivo respecto de la presencia de las mismas bacterias, cuando se investigaron por el método de aislamiento directo.

4°. — En la mayor parte de las muestras estudiadas, y en unión con las colonias de color anaranjado, característicos del *Cl. felsineum*, aparecieron también colonias semejantes, pero incoloras o con distintas gradaciones menores del mencionado color, las cuales fueron consideradas como pertenecientes a la misma especie, no obstante la falta de ese carácter distintivo.

5°. — En dos de las muestras analizadas correspondientes al grupo de linos enriados en establecimientos industriales, una del país y otra del extranjero, apareció una forma de bacterias enriadoras caracterizada por sus clostridios algo encurvados y sus colonias pequeñas teñidas de color ocre-rojizo o amarillento, conjuntamente con el típico *Clostridium felsineum*.

6°. — En todas las muestras de linos enriados, analizadas en el presente trabajo, en las que se logró aislar bacterias anaerobias enriadoras, se encontró, en forma exclusiva o predominante, el *Clostridium felsineum* (Carbone) Donker.

AGRADECIMIENTOS

El autor se complace en expresar aquí su agradecimiento, por la provisión del material y de las informaciones que se han utilizado en la confección del trabajo, a los colegas que se mencionan a continuación: Prof. Ing° Agr° Walter F. Kugler, Director de la Estación Experimental de Pergamino, Ministerio de Agricultura de la Nación; In° Agr° Ernesto F. Godoy, Subdirector de la misma institución; Ing° Agr° Carlos V. Marciotte, Encargado de la Sección Textiles, en el mismo lugar; Prof. Ing° Agr° José S. Isnardi, Encargado de Curso de la Cátedra de Cultivos Industriales, en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires; Prof. Ing° Agr° Carlos Remussi, Encargado del curso de Lino, en la citada Cátedra; Ing° Agr° H. Rubén Battalláñez, Director Técnico de la «Línera Bonaerense», S. A.; Ing° Agr° Carlos M. Liberatori, Director Técnico de «Linotex», S. A.

Al mismo tiempo, desea también dejar constancia de su gratitud a las autoridades de los establecimientos industriales visitados: «Línera Bonaerense», «Linotex» y «Lonalino», de donde han sido obtenidas la mayor parte de las muestras incluídas en la investigación.

VII — RESUMEN

El trabajo trata de la investigación de bacterias anaerobias enriadoras, en muestras de linos enriados en establecimientos industriales de la Argentina, Chile, Bélgica y Holanda, por el método de sumersión bajo agua, a las que se agregan algunas muestras de linos enriados, por el mismo procedimiento, en escala semi-industrial.

De las 30 muestras analizadas, 24 correspondientes a establecimientos industriales y 6 a ensayos semi-industriales, fué posible demostrar la presencia de bacterias anaerobias enriadoras en 27, por un método de aislamiento directo, y en otra por un método de enriquecimiento, lo que hace un total de 28 muestras positivas, equivalentes a más del 90 % de las estudiadas.

En la totalidad de los casos en que se estableció la presencia de bacterias anaerobias esporuladas, capaces de producir enriamiento en cultivo puro, la especie aislada, generalmente, como enriadora única y excepcionalmente en unión con otras, resultó ser el *Clostridium felsineum* (Carbone) Donker, por lo que cabría considerar a dicha especie como la bacteria activa en el enriamiento industrial del lino.

La circunstancia de que una de las muestras estudiadas, proveniente del río Lys, famoso por la bondad del producto enriado en sus aguas,

contenía la citada bacteria en proporción netamente predominante sobre el resto de su microflora, constituye un sólido apoyo en favor de la anterior opinión.

S U M M A R Y

The work deals with the investigation of retting anaerobic bacteria, in samples of flax retted in industrial establishments of Argentina, Chile, Belgium and Holland through the method of submersion in water; to these are added some samples of retted flax, by the same procedure, in a semiindustrial scale.

Of the thirty analyzed samples, 24 corresponding to industrial establishments and 6 to semi-industrial ones, it was possible to prove the presence of anaerobic retting bacteria in 27 through a method of direct isolation, and in another case by a method of enrichment, which makes a total of 28 positives equivalent to more than 90 % of the samples, studied.

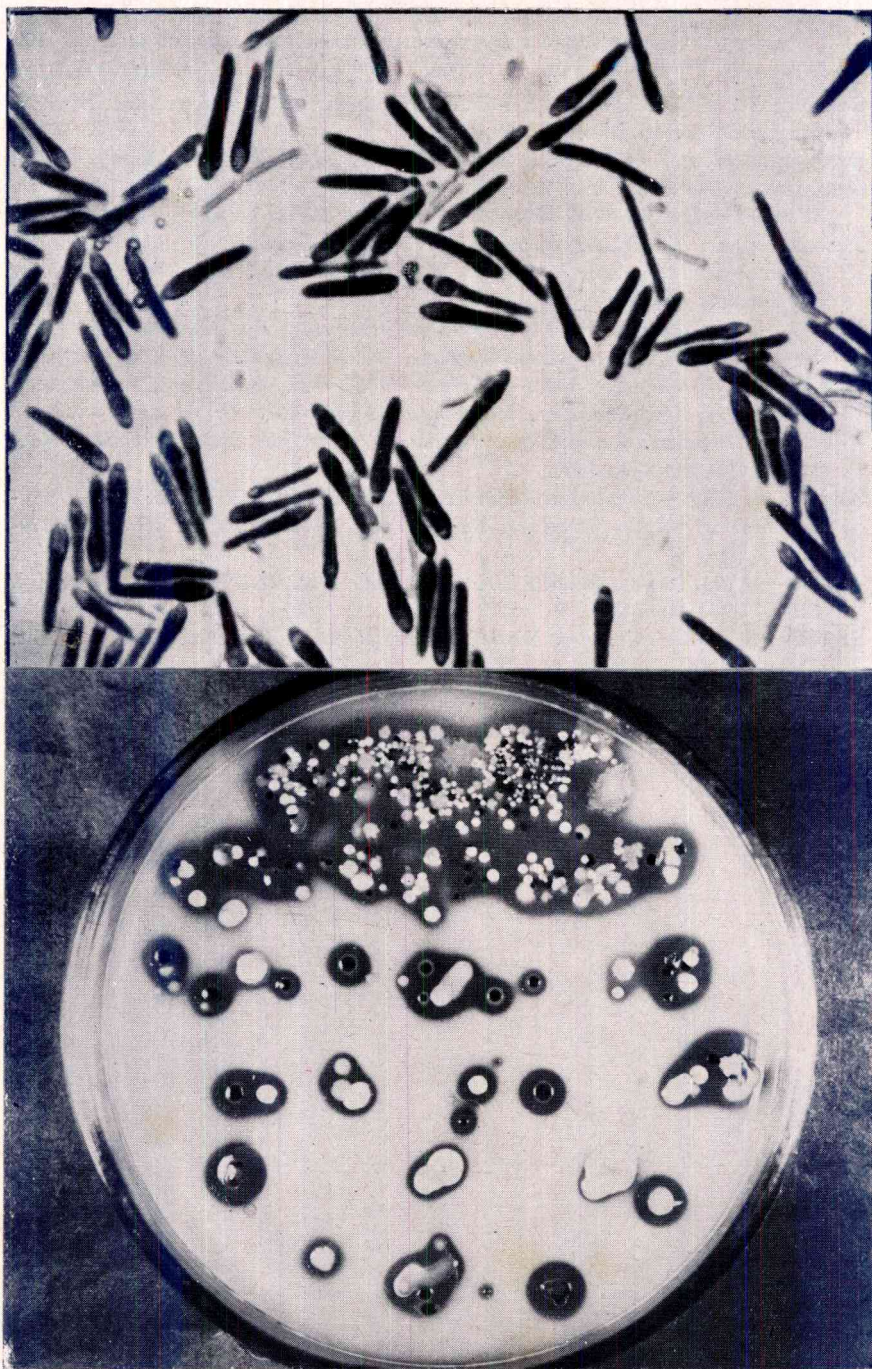
In the totality of the cases in which the presence of sporulated anaerobic bacteria, capable of producing retting in pure culture has been demonstrated, the isolated species, generally as the only retter and exceptionally with others, was the *Clostridium felsineum* (Carbone) Donker, for which reason this species has to be considered as the active bacteria in the industrial retting of flax.

The fact that one of the investigated samples, coming from the Lys river, which is famous for the bounty of the product retted in its waters, contained the above cited bacteria in a clearly dominant proportion from the rest of its microflora constitutes a solid support in favour of the former opinion.

VIII — BIBLIOGRAFIA

- ANÓNIMO. 1938-1945 — *The Flax Development Committee. First to Sixth Interim Reports*. 347 pp., 37 pl. Ed.: Bell and Hogan Ltd. Belfast, Ireland.
- BEHRENS, J., 1902 — *Untersuchungen über die Gewinnung der Hanffaser durch natürliche rostmethoden*. Centralbl. f. Bakt. II Abt. 8:114.
- BELJERINCK, M. W., AND A. VAN DELDEN, 1904 — *On the bacteria which are active in flaxretting*. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Proceedings of the Section of Sciences, 6:462-481.
- BUTTERWORTH, E. — 1945. — *Report of the year's work presented to the Flax Development Committee. Sixth Interim Report*, pp. 48-124. (Ver: Anónimo).
- CARBONE, D. 1926 — *La macerazione industriale delle piante tessili col Bacillus felsineus*. 2a. ed. Ed.: Istit. Sieroterapico Milanese, Milano.

- CARBONE, D., e TOMBOLATO. 1917 — *Sulla macerazione rustica della canapa*. Le Staz. Speriment. Agrar. Ital., 50: 563.
- HENNEBERG, W. 1926 — *Handbuch der Gärungsbakteriologie*. Verlag: P. Parey, Berlin.
- ORLA-JENSEN, ANNA D., UND A. J. KLUYVER. 1939 — *Notiz über den Erreger der Warmwasserflachsrost in Holland*. Zentralbl. f. Bakt. II Abt. 101: 257-261.
- RUSCHMANN, G. UND W. BAVENDAMM. 1925 — *Zur Kenntnis der Rosterreger Bac. felsineus* CARBONE UND *Plectridium pectinovorum* (Bac. amylobacter A. M. et Bredemann). Centralbl. f. Bakt. II Abt. 64:340.
- 1925 — *Die Flachsroste mit Plectridium pectinovorum* (Bac. amylobacter A. M. et Bredemann) und Bac. felsineus Carbone. Centralbl. f. Bakt. II Abt. 65:43.
- SORDELLI, A. y S. SORIANO. 1928 — *Aislamiento del Bac. felsineus y su existencia en la República Argentina*. Rev. Soc. Arg. Biol. 4:611-617.
- 1930 — *Aislamiento y caracteres de Bacillus felsineus*. Rev. Inst. Bact. Dep. Nac. Hig. 5:725-740. 4 láminas.
- SORIANO, S. 1929 — *Estudios sobre un bacilo anaerobio enriador del lino*. Tomo conmemorat. 25 anivers. fundación Facultad Agr. y Vet. Univ. Bs. Aires, pp. 279-300. 5 figs.
- 1930 — *Nuevo bacilo anaerobio enriador del lino*. Rev. Inst. Bact. Dep. Nac. Hig. 5:741-756. 3 láminas.
- STORMER, K. 1904 — *Ueber die Wasserroste des Flaches*. Centralbl. f. Bakt. II Abt. 13:35.
- WINOGRADSKY, S. et V. FRIBES. 1895 — *Sur le roissage du lin et son agent microbien*. Compt. Rend. Acad. Scs. pp. 121-242.



*Explicación de la lámina: Arriba: Formas de «plectridios» en un cultivo de enriquecimiento en lino. Coloración con el método ISF (Iodo-Sulfúrico-Formol) (Aumento: x 2000). Abajo: Colonias en una caja de Petri sembrada con material de lino enriado (Tamaño natural). (Las colonias que en la fotografía aparecen con centro obscuro son en realidad anaranjadas, y corresponden al típico *Clostridium felsineum*).*