

## DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Prof. Dr. A. RAMOS

INVESTIGACION DE LA SINTESIS Y ACUMULACION DE VITAMINAS POR ESPECIES DEL GENERO *BACILLUS*Angela ORTS, A. RAMOS-CORMENZANA, F. RUIZ-BERRAQUERO  
y Ana BAYA \*

## RESUMEN

Se investiga la capacidad de producir y acumular vitaminas (vitamina B<sub>12</sub>, pantenol, riboflavina, niacina y biotina) en 58 estirpes diferentes del género *Bacillus*.

La vitamina producida por mayor número de microorganismos fue la vitamina B<sub>12</sub> y la sintetizada por menor número de *Bacillus* fue la niacina.

Sin embargo de los resultados obtenidos no puede deducirse ninguna conclusión de valor taxonómico.

Se señala la importancia que puede tener la producción de sustancias antibióticas cuando se detecte la acumulación de vitaminas por medio de una cepa auxotrófica, que puede ser susceptible para la sustancia antibiótica producida.

## SUMMARY

We have researched the capacity to produce and accumulate vitamins (Vitamin B<sub>12</sub>, panthenol, rivoflavin, niacin, biotin) in 58 different strains of *Bacillus*.

The vitamin produced by larger number of microorganisms was the vitamin B<sub>12</sub> and the synthesized one by the least number of *Bacillus* was the niacin.

However we can't produce any conclusions of taxonomic value from the obtained results.

We point out the importance can have the production of antibiotic substances when we detect the accumulation of vitamins utilizing auxotrophic strains that can be susceptible for the produced antibiotic substance.

\* Actualmente en la Universidad Católica de de Valparaiso (Microbiología). Chile.

## RESUMÉ

On recherche la capacité de produire (vitamine B<sub>12</sub>, pantenol, riboflavine, niacine et biotine) à 58 souches différentes du genre *Bacillus*.

La vitamine produite par le plus grand nombre de microorganismes fut la vitamine B<sub>12</sub> et la synthétisée par le plus petit nombre de *Bacillus* fut la niacine.

Cependant, des résultats obtenus ne peut pas se déduire aucune conclusion de valeur taxonomique.

On relève l'importance qu'il peut posséder la production de substances antibiotiques quand on détecte l'accumulation de vitamines avec une souche auxotrofique, qu'il peut être susceptible pour la substance antibiotique produite.

## INTRODUCCION

Por lo que se refiere a sus diferentes aplicaciones y perspectivas tanto ecológicas como sanitarias, se puede considerar al género *Bacillus* como uno de los más importantes dentro del campo de la microbiología. Solo dentro del grupo de variedades de *B. cereus*, son numerosas las estirpes patógenas descritas, por su elevada capacidad para producir toxinas (1, 2, 3); tienen aplicación en estudios ecológicos (por ejemplo como indicadores de polución (4); y también es conocida su capacidad para producir antibióticos (5). Recientemente, se ha estudiado bajo puntos de vista puramente taxonómicos (5).

En consecuencia, creemos que sigue vigente la frase escrita por Ford et al. (16) en 1916: "Es aún un problema importante en la higiene moderna, estudiar el grupo *Bacillus*, que influye en toda clase de sustancias que afectan a las condiciones físicas del hombre", lo que ha motivado que en este trabajo (homenaje a la memoria de nuestro Prof. A. Murillo) preendamos estudiar la capacidad de síntesis y acumulación de vitaminas en un género microbiano que tanta importancia tiene, tanto para la industria como para la salud pública.

## MATERIAL Y METODOS

1.—*Microorganismos*

Se han utilizado 58 cepas de *Bacillus* pertenecientes a las colecciones: CECT (Colección española de cultivos tipo); PCM (Po-

lan Collection of Microorganisms); CCM (Czechislovak Collection of Microorganisms); y ATCC (American Type Culture Collection).

## 2.—Determinación de la síntesis y acumulación de vitaminas

Se realizó siguiendo la técnica de Udaka (3) modificada por Ruiz-Berraquero y Ramos-Cormenzana (7). Como cepas auxotróficas se han utilizado el *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042, para vitamina B<sub>12</sub>, biotina, pantoténico y el *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, para la riboflavina y niacina.

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos van indicados en las tablas I y II, especificándose la producción de vitaminas por las especies de *Bacillus* correspondientes de acuerdo con los dos grupos sistematizados en la 8.<sup>a</sup> edición del Bergey de Bacteriología Determinativa.

TABLA I

Producción de vitaminas por distintas especies del género *Bacillus*  
(grupo 1)

CEPAS	B <sub>12</sub>	Pantenol	Rivoflav.	Niacina	Blotina
<i>B. polymyxa</i>					
ATCC 842	+++ (i)	++ (i)	+++ (i)	+++ (i)	++ (i)
CCM 1459	++++ (1)	+(i)	+++ (i)	++ (i)	+(i)
NCTC 4747	+	+	+	+	+
PCM 451	+	+(d)	+(d)	—	+
<i>B. brevis</i>					
ATCC 8246	—	+	+(d)	+	+
CCM 2050	++	++ (d)	+	+	+
<i>B. circulans</i>					
ATCC 9966	—	+	—	—	—
CCM 2048	+	+(d)	—	—	—
PCM 1398	++	—	—	—	+(d)
<i>B. subtilis</i>					
ATCC 6051	++ (i)	+(i)	RD	++	—
CCM 2216	++ (i)	+(i)	RD	++ (i)	+(i)
PCM 1903	+++ (i)	++ (d)	+++ (i)	++ (i)	+(d)

TABLA I.—(Continuación)

CEPAS	B <sub>12</sub>	Pantenol	Rivoflav.	Niacina	Biotina
<i>B. coagulans</i>					
ATCC 10545	—	+	RD	—	—
CCM 2013	—	—	—	+(1)	+(1)
PCM 1843	+	—	+(d)	—	—
<i>B. sterothermophilus</i>					
CCM 2062	++	+	+	++	++
PCM 453	+	++(d)	—	—	—
<i>B. megaterium</i>					
ATCC 25848	++	—	+	+	++++(d)
CCM 2007	+++	—	++	+	++++(d)
PCM 1855	++	++	+	+	+
<i>B. firmus</i>					
CCM 2213	++++(d)	++++(d)	++	+	+++
PCM 1844	+	—	—	+(d)	+(d)
<i>B. sphaericus</i>					
ATCC 14577	+	+	+	+	+
CCM 2120	+	+	+	+	+
PCM 485	—	+(d)	+(d)	—	+(d)
<i>B. laterosporus</i>					
ATCC 64	RD	+(d)	—	—	—
CCM 2116	+(1)	+(d)	—	—	—
PCM 1848	—	+(1)	—	++(1)	+++ (1)
<i>B. macerans</i>					
CCM 2012	+(1)	+(d)	+(1)	+(1)	+(1)
PCM 1399	+	—	—	—	—
<i>B. mycoides</i>					
PCM 1401	++	+(d)	+	+	—
<i>B. thuringensis</i>					
PCM 1853	+	—	+	—	—
CECT 197	—	++(d)	—	—	—
<i>B. cereus</i>					
ATCC 11778	++(1)	++(d)	—	++(1)	++(1)
ATCC 14579	++(1)	+	—	++(1)	++(d)

T A B L A I.—(Continuación)

CEPAS	B <sub>12</sub>	Pantenol	Rivoflav.	Niacina	Biotina
CCM 1992	+	+	—	+	+
PCM 482	+	—	+(d)	—	+
<i>B. pumilus</i>					
ATCC 14884	—	—	—	—	—
ATCC 7061	+	+	+	—	++
CCM 2144	++	++(d)	—	+	—
PCM 1852	+	+(i)	—	++(i)	+++
<i>B. licheniformis</i>					
ATCC 14580	++(i)	+(i)	—	+++ (i)	++(i)
PCM 1847	++(i)	++(d)	+(i)	++(i)	—
<i>B. alvei</i>					
ATCC 6344	+	—	++(d)	+	—
CCM 2051	—	+	++(d)	+	+
PCM 481	++	+(d)	++	—	+(d)

## Clave:

- No produce
- + halo de 0,1 mm a 0,5 mm
- ++ halo de 0,5 mm a 1,0 mm
- +++ halo de 1,0 mm a 1,5 mm
- ++++ halo superior a 1,5 mm
- (d) interpretación dudosa
- (i) zona de inhibición anterior al halo de crecimiento

TABLA II

Producción de vitaminas por distintas especies del género *Bacillus*  
(grupo 2.º)

CEPAS	B <sub>12</sub>	Pantenol	Rivoflav.	Niacina	Biotina
<i>B. lentus</i>					
ATCC 10440	—	—	—	—	—
CCM 2214	—	—	—	—	—
PCM 450	++	—	+	—	+
<i>B. badius</i>					
ATCC 14574	—	—	—	—	+(d)
CCM 2113	—	—	—	—	+(d)
<i>B. pantothenicus</i>					
ATCC 14576	+	+(d)	—	+	+(d)
CCM 2049	+	+(d)	—	—	+(d)
PCM 454	++	—	—	—	+(d)
<i>B. pulcifaciens</i>					
CCM 39	+(i)	+(d)	++(d)	++(i)	+(i)
<i>B. aminovorans</i>					
ATCC 7046	+	+(d)	+(d)	—	—
<i>B. globisporus</i>					
PCM 1845	+++ (i)	+(d)	—	—	—
<i>B. psychrofilus</i>					
PCM 1853	+	—	+	—	—
CECT 197	—	++(d)	—	—	—

Clave:

- No produce
- + halo de 0,1 mm a 0,5 mm
- ++ halo de 0,5 mm a 1,0 mm
- +++ halo d
- ++++ halo superior a 1,5 mm
- (d) interpretación dudosa
- (i) zona de inhibición anterior al halo de crecimiento

En la tabla III se condensan las vitaminas producidas en relación al número de especies ensayadas.

TABLA III

Porcentaje de estirpes productoras de cada una de las vitaminas sobre el total de las 58 ensayadas

Vitamina	N.º cepas productoras	%
B <sub>12</sub>	45	77.88
Pantenol	40	68.96
Riboflavina	32	55.17
Niacina	31	53.44
Biotina	37	63.79

## DISCUSION

En este trabajo, se han observado ciertas discrepancias entre los datos publicados por algunos autores y los obtenidos por nosotros. Sin embargo, esta disparidad es hasta cierto punto lógica, pues los resultados obtenidos por otros investigadores en ningún caso deben ser considerados como definitivos.

En la mayoría de los estudios exhaustivos —como los realizados por Kninght y Proom (9, 13, 17)— al ensayar diferentes estirpes dentro de la misma especie, difícilmente se producía una coincidencia absoluta. En la tabla IV, hemos recopilado los datos que corresponden a las especies descritas como exigentes para algunas de las vitaminas ensayadas por nosotros, lo que significa incapacidad para efectuar la síntesis de las mismas. Es fácil observar, en la mencionada tabla IV, que la mayor exigencia se aprecia frente a la biotina. Esto sugeriría que los resultados obtenidos respecto a la producción de biotina debieran ser inferiores; como podría de igual forma presumirse que la mayoría de las especies de *Bacillus* sintetizaran vitamina B<sub>12</sub>. Esto que parece cumplirse respecto a la vitamina B<sub>12</sub>, no parece que ocurra de igual manera en lo referente a la biotina. En este aspecto, son sorprendentes algunos datos, como los correspondientes al *B. firmus* y *B. pumilus*, pues en los trabajos de Proom y Knight (9, 13, 17) veinte de veinte cepas ensayadas de *B. firmus* requerían biotina, y las veintiún estirpes en-

## TABLA IV

Necesidades de las diferentes especies de *Bacillus*, en relación a las vitaminas ensayadas (recopilación bibliográfica)

Vit. B <sub>12</sub>	Pantenol	Riboflavina	Biotina
Ninguna (8)	<i>B. pantothenicus</i> (9)	<i>B. circulans</i> (11)	<i>B. alvei</i> (13)*
	<i>B. globigii</i> (10)	<i>B. dextralacti-</i> <i>cus</i> (12)	<i>B. brevis</i> (13)*
			<i>B. cereus</i> (14)
			<i>B. mycoides</i> (15)
			<i>B. circulans</i> (13)
			<i>B. coagulans</i> (16,13)
			<i>B. firmus</i> (17)
			<i>B. lentus</i> (17)
			<i>B. macerans</i> (18,13)
			<i>B. polymyxa</i> (18,13)
			<i>B. pulvifaciens</i> (17)
			<i>B. pumilus</i> (13)
			<i>B. sphaericus</i> (13)*

\* Solo requieren la vitamina parte de las cepas ensayadas.

( ) Entre paréntesis va indicada la referencia bibliográfica.

sayadas de *B. pumilus* también las requerían, mientras que nosotros hemos comprobado cómo dentro de ambas especies existen estirpes capaces de sintetizar la mencionada vitamina. Algo similar podríamos considerar respecto a los *B. macerans*, *B. coagulans* y *B. polymyxa*; en esta última nos llamó la atención que la producción de la citada vitamina se dió en la totalidad de estirpes ensayadas por nosotros.

Es posible que la primera conclusión deducible de este estudio sea la imposibilidad de dar datos concretos en relación con la exigencia o la incapacidad de síntesis de algunas de las vitaminas ensayadas.

Por este motivo, creemos, que de acuerdo con los datos de las tablas I y II, la capacidad de sintetizar y acumular vitaminas no es carácter que pueda utilizarse bajo fines o criterios taxonómicos; por lo menos en función a los nombres y especies actualmente incluidos en la 8.<sup>a</sup> edición del Manual de Bergey (19) y quizás podría



ser un verdadero desbarajuste el intentar una nueva agrupación y nomenclatura basándonos en la capacidad o no de producir vitaminas.

En segundo lugar, nos gustaría volver a insistir en algo que ocurre cuando se investiga la capacidad de síntesis y acumulación de vitaminas en microorganismos que puedan originar sustancias antibióticas; estas sustancias son capaces de inhibir al microorganismo auxotrófico utilizado en detectar la vitamina producida, lo que podría dar como resultado negativo de síntesis de vitaminas, lo que simplemente fue un fenómeno de antibiosis; esta circunstancia debe tenerse en cuenta cuando se empleen en las técnicas de revelado o de investigación de la producción de una vitamina o aminoácido, cepas auxotróficas anteriormente (20).

En la fotografía que acompaña al presente trabajo (figura 1) puede observarse perfectamente el fenómeno de inhibición y estimulación del desarrollo del *Leuconostoc*, como consecuencia de una parte de la sustancia antibiótica originada y por otra de la acumulación de vitaminas en el medio de cultivo.

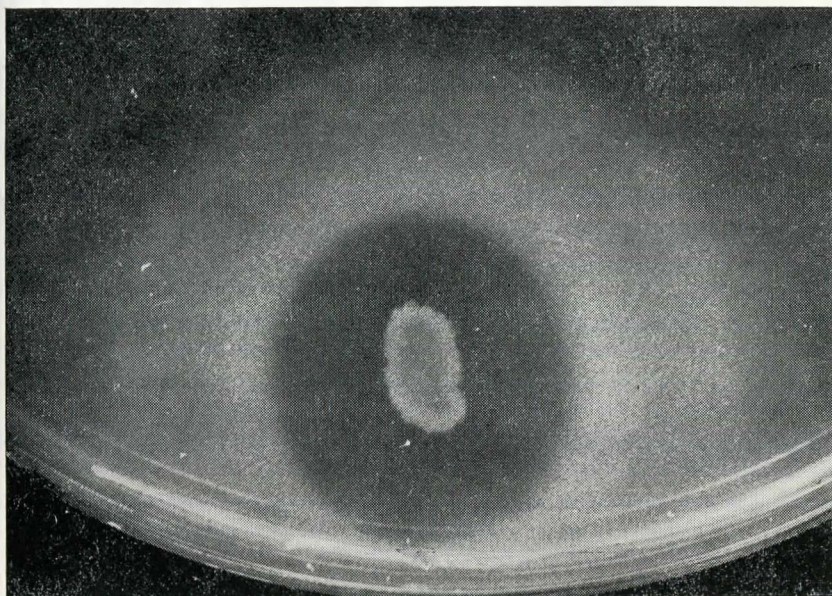


Figura 1.—Se observa una colonia que ha originado junto al halo de crecimiento de *Leuconostoc* (acumulación de vitaminas) un halo de inhibición (producción de una sustancia antibiótica)

## BIBLIOGRAFIA

- (1) JOHNSON, C. E. and BONVENTRE, P. F.: *J. Bact.* 94, 306 (1967).
- (2) KIM, H. V. and GOEPFERT, J. M.: *J. Mil. Food. Technol.* 34, 12 (1971).
- (3) UDAKA, S.: *J. Bact.* 75, 754 (1960).
- (4) PULEO, J., OXBORROW, G. S., FIELDS, N. S. and HALL, H. E.: *J. Bact.* 20, 384 (1970).
- (5) BONDE, G. J.: ISS Research Council's. Copenhagen (1973).
- (6) FORD, W. W., LAWRENCE, J. S. and LAUBACH, C. A.: *J. Bact.* 1, 273 (1916).
- (7) RUIZ-BERRAQUERO, F. and RAMOS-CORMENZANA, A.: *Tex. J. Sci.* (aceptada) 1976.
- (8) KOSER, S. A.: "Vitamin Requirements of Bacteria and Yeasts". Ch. C. Thomas Publ. Springfield (Illinois), 1968, 379.
- (9) PROOM, H. and KNIGHT, B. C. J. E.: *J. Gen. Mi*
- (10) CAMPBELL, L. L. and WILLIAMS, O. B.: *J. Bact.* 65, 141 (1953).
- (11) BAKER, H., SOBOTKA, H. and HUTNER, S. N.: *J. Gen. Microbiol.* 9, 485 (1953).
- (12) PETERSON, W. H. and PETERSON, M. S.: *Bact. Review* 9, 49 (1945).
- (13) KNIGHT, B. C. J. G. and PROOM, H.: *J. Gen. Microbiol.* 4, 508 (1950).
- (14) AMAHA, M. and SAKAGUHI, K.: *J. Agri. Soc. Japan* 26, 353 (1952).
- (15) SOUTHCOTT, B. A. and TARR, H. L. A.: "Microbiological Formation of vitamin B<sub>12</sub>". *Can. J. Microbiol.* 3, 195 (1957).
- (16) HUMPHREYS, T. W. and COSTILOW, R. N.: *Can. J. Microbiol.* 3, 533 (1957).
- (17) PROOM, H. and KNIGHT, B. C. I. E.: *J. Gen. Microbiol.* 13, 474 (1955).
- (18) KATZNELSON, N.: *J. Bact.* 48, 495 (1944).
- (19) BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8.<sup>a</sup> ed. Williams & Wilkins. Baltimore, 1974, 529.
- (20) RUIZ-BERRAQUERO, F., BAYA, A. M. y RAMOS-CORMENZANA, A.: *Abst. Int. Congr. Bacteriol.* 37 (1973).