



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y  
DESARROLLO PROFESIONAL  
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**DETECCIÓN DE *Bacillus anthracis* EN MUESTRAS DE SUELOS Y  
ANIMALES DE UNA GRANJA GANADERA,  
UBICADA EN EL ESTADO ZULIA.  
PERIODO 2007-2008**

**Autores:**

Delgado Diego

Dudamel Geraldin

**Tutor:** Prof. Carlos Martínez

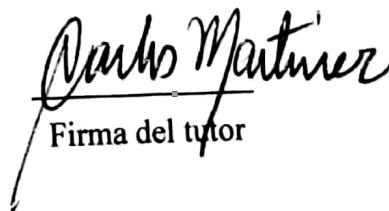
**Asesor Metodológico:**

Prof. Rosalina González

**VALENCIA, 28 DE OCTUBRE DE 2008**

## CONSTANCIA DE CERTIFICACION DEL TUTOR

Yo, **CARLOS MARTÍNEZ**, por medio de la presente certifico que he tenido conocimiento del trabajo de investigación que lleva por título: “DETECCIÓN DE *Bacillus anthracis* EN MUESTRAS DE SUELOS Y ANIMALES DE UNA GRANJA GANADERA, UBICADA EN EL ESTADO ZULIA. PERIODO 2007-2008”, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por los bachilleres: **DELGADO DIEGO** y **DUDAMEL GERALDIN**. Considero que el presente estudio reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

  
Firma del tutor



"hacemos el pasado, hacemos el presente, construimos el futuro"

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
 ESCUELA DE BIOANALISIS  
 DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PROFESIONAL  
 ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACION

### INSTRUCTIVO DE EVALUACION DEL CUARTO LAPSO

**Título del Trabajo:**

DETECCIÓN DE *Bacillus anthracis* EN MUESTRAS DE SUELOS Y ANIMALES DE UNA GRANJA GANADERA, UBICADA EN EL ESTADO ZULIA. PERIODO 2007-2008

La calificación obtenida en la presentación y defensa del Trabajo fue:

Estudiante	P. Escrita (30%)	Diseño de la P. (10%)	P. Oral (20%)	Defensa y Discusión (10%)	Total
Br. Delgado Diego	20	20	20	20	20
Br. Dudamel Geraldin	20	20	20	20	20
Br.					
Br.					

Rosalina González L	EUZAL. CAPOZZI L.	
Nombre:	Nombre:	
C.I.: 4866184	C.I.: 4873312	

Valencia, 13 de octubre de 2008

Instrumento Diseñado por las Profesoras Rosalina González y Yunedy Marcano. Actualizado por las Profesoras Vita Calzolaio y Amarily Perelli

## **DEDICATORIA**

*Dedicamos esto primeramente a nuestros padres por estar a nuestro lado y apoyarnos en todo momento, darnos ánimos, principios, amor, cariño, formación de calidad y un gran espíritu de superación, segundo a nuestros hermanos por ser nuestros mejores amigos y estar siempre allí, dándonos una mano cuando lo necesitamos. A nuestros amigos Ana Fernández, Sra. Carmen, por ayudarnos en los momentos más difíciles siendo un apoyo muy importante en la elaboración del presente trabajo.*

*A nuestras familias que siempre nos apoyaron en toda circunstancia, y sobre todo a nuestra más grande admiración, nuestras madres, Gladis Barreto y Teresa Sarmiento.*

*El Sr. Orlando Camacaro y familia quienes nos proporcionaron mucha ayuda para que este trabajo fuera posible.*

*Lo más importante dedicamos esto a Dios que es nuestro compañero y que siempre estuvo con nosotros para nunca dejarnos flaquear.*

**GRACIAS A TODOS DE CORAZON**

Delgado Diego y Dudamel Geraldin

## RECONOCIMIENTO

Nuestros más sinceros y grandes agradecimientos a todo el personal del Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo, en especial a la Sra. Carmen, Hector, Greisy, profesor Thomas Rojas, Agradecemos al Dr. Orlando Camacaro Jefe de Veterinaria del Sector El Venado en el Estado Zulia por toda la ayuda prestada.

Por ultimo también agradecemos a Ana Fernández, ya que a través de ella se realizó el presente estudio.

Delgado Diego y Dudamel Geraldin

## INDICE

	Página
Indice de Tablas	vii
Indice de Gráficos	viii
Resumen	ix
INTRODUCCION	1
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
METODOLOGIA	12
Tipo Investigación	12
Población	13
Muestra	13
Procedimiento Metodológico	13
Análisis de los Datos	20
RESULTADOS Y DISCUSION	21
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES	28
BIBLIOGRAFIA	29
ANEXOS	32

## INDICE DE TABLAS

Número de la tabla	Descripción	Página
1	Bacterias del género <i>Bacillus</i> aisladas a partir de muestras de suelos	21
2	Bacterias del genero <i>Bacillus</i> aisladas de las muestras provenientes de los animales.	23

## INDICE DE GRAFICOS

Número del gráfico	Descripción	Página
1	Comparación de especies de bacterias del género <i>Bacillus</i> recolectadas en muestras de suelos y animales	25



## RESUMEN

DETECCIÓN DE *Bacillus anthracis* EN MUESTRAS DE SUELOS Y ANIMALES DE UNA GRANJA GANADERA, UBICADA EN EL ESTADO ZULIA. PERIODO 2007-2008

Autores: Delgado Diego y Dudamel Geraldin

Tutor: Prof. Carlos Martínez

Asesor: Prof. Rosalina González

Realizado en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo y Financiado por el mismo.

Existe una gran variedad de bacterias presentes en los suelos, por su parte el género *Bacillus* tiene la particularidad de presentar endosporas, estas son formadas cuando la especie no se encuentra cómoda en ambientes determinados, lo cual les permite estar presentes en los distintos habitats, hasta darse las condiciones óptimas para su desarrollo. El objeto de este trabajo fue detectar el *B. anthracis* agente causal del ántrax, en suelos y animales de una granja ganadera ubicada en el Estado Zulia. El mismo se aplicó a 60 muestras provenientes de las mucosas del ganado bovino y 60 muestras provenientes del suelo. Se utilizaron para su determinación técnicas de coloración de Gram, siembra en agar nutriente y agar sangre humana, la identificación bioquímica se realizó a las colonias morfológicamente compatibles determinando: movilidad, catalasa, nitratos, Voges-Proskauer, OF glucosa, lecitinasa, almidón. En el total de muestras analizadas no se identificó *B. anthracis*, lo cual no significa que el bacilo del ántrax este ausente en esa región. Por otra parte se aisló un total de 10 especies de *Bacillus*, donde la especie que predominó fue *B. polymyxa* en un (42%). En menor porcentaje se encontraron *B. sphaericus* (2%) *B. megaterium* (1%) y *B. cereus* (1%). En cuanto a la diversidad, se registraron 6 especies comunes en suelos y animales como: *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* y *B. sphaericus*, lo que indica que el 60% de las especies fueron similares para ambos aislamientos. Se demostró que las especies del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y cuya presencia en estos últimos se correlaciona con su presencia en el animal.

Palabras claves: *Bacillus anthracis*, ántrax, coloración de Gram, endosporas.

## INTRODUCCIÓN

La explotación del ganado bovino en el mundo constituye una fuente de ingresos económicos, labor que es ejercida principalmente en áreas rurales; donde existen las cualidades óptimas del terreno para la cría de estos animales. La vaca es un animal herbívoro del cual se obtienen productos como carne, leche y piel, que son los derivados con mayor demanda en el mercado ganadero (Hoogsteijn y Mazzei, 2002).

Existen dos formas diferentes de explotación ganadera, la ganadería extensiva y la ganadería intensiva. En la ganadería extensiva se utilizan grandes dimensiones de terreno para el crecimiento del ganado; modalidad que se maneja mayoritariamente en Venezuela. En menor medida se encuentra la ganadería intensiva donde hay unas instalaciones dedicadas al uso y alimentación del ganado; estas instalaciones son las llamadas establos donde el ganado está menos expuesto a la contaminación por agentes infecciosos (Vazquez, Nosedá, Combessies, Cordeviola, Bigalli, Fiscalini, Bardon y Martínez, 2006).

Sin embargo todas las especies animales son susceptibles a la infección por diferentes agentes etiológicos ya que son huéspedes que reúnen ciertas condiciones para la nutrición y posterior crecimiento de dichos agentes patógenos u oportunistas, entre ellos las bacterias, virus, parásitos y otros. (Contreras, 2000).

Así se tiene una amplia lista de enfermedades bacterianas del ganado vacuno que afectan órganos específicos donde figuran, entre otras, las que se encuentran en sangre, como el carbunco producido por *Bacillus anthracis*, carbunco bacteriano causado por *Pasteurella multocida*, fiebre del transporte cuyos agentes etiológicos son *Pasteurella haemolytica* y *Yersinia*

*pseudotuberculosis*, fiebre carbuncosa o ántrax sintomático provocado por *Clostridium chauvoei*, todos estos agentes etiológicos son bacilos, que influyen negativamente en la productividad ganadera (Osbaldiston, V. 1981).

El ganado sano está propenso a adquirir dos formas de ántrax: el ántrax generalizado y el ántrax localizado, siendo la forma más frecuente el ántrax generalizado, el cual resulta mortal en 1 ó 2 días, pudiendo afectar al animal durante varios días de manera subclínica. El ántrax localizado, constituye otra forma de infección donde sólo se abarca un área específica del cuerpo como músculo, piel, garganta, lengua u otra pequeña área. Esta forma de ántrax, rara vez provoca la muerte, salvo cuando la infección se extiende a órganos vitales (Contreras, 2000).

El ántrax generalizado constituye una causa de muerte súbita en el ganado vacuno, puesto que se presenta sin aviso previo, es una enfermedad infecciosa aguda, que afecta a un amplio rango de animales entre ellos el ganado vacuno, los caballos, mulas, carneros o cabras. La misma se caracteriza por iniciar un proceso septicémico que provoca la muerte en los animales afectados. De hecho, durante este proceso el animal cursa con la salida de sangre de color oscuro a través de los orificios naturales del cuerpo con poca tendencia a la coagulación, haciéndose sintomática poco tiempo antes de que el animal muera (Acha y Szyfres, 2003).

La capacidad del *B. anthracis* para causar enfermedad depende principalmente de la concentración, de la exposición, de la vía de infección y del órgano afectado. Normalmente la infección se produce por medio de esporas recogidas por el animal al ingerir forrajes o aguas contaminadas, sin embargo, una vez en el animal estas esporas pasan a su forma vegetativa o bacilo, el cual se multiplica en el torrente sanguíneo de un huésped, provocando un envenenamiento de la sangre, ya que produce un potente complejo tóxico que causa alteraciones irreversibles en diversos tejidos (Vázquez y col, 2006).

Adicionalmente la endospora es una estructura especializada resistente a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos. En consecuencia, las bacterias forman esta estructura para resistir las condiciones adversas del ambiente, también la pueden llegar a formar como una defensa metabólica (Foster, 2001). Por lo tanto, la formación de la endospora está dada por las condiciones del medio en que se encuentran estas bacterias (Schelegel, 1997).

La endospora característica de *B. anthracis* es de forma redondeada y de situación central, sin deformar la célula. Es frecuente encontrar esporas en productos derivados de animales como lana y las mismas suelen predominar en suelos alcalinos. La esporulación que no ocurre en animales vivos, requiere la presencia de oxígeno, pero no así la germinación de las esporas (Contreras, 2000).

En efecto el *B. anthracis* constituye la especie con mayor potencial patógeno dentro del género *Bacillus*, es un bacilo grampositivo, de gran tamaño, mide de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de espesor, por 4 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud), inmóvil, encapsulado, de forma contraria a la mayoría de especies del género; está dispuesto en cadenas y la forma rectangular de cada bacteria integrante confiere a las cadenas de *B. anthracis* un aspecto de tren (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger y Winn, 2004).

Entre las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, catalasa positiva, de metabolismo fermentativo; además cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno (Holt et. al., 1994). Una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias, es que presentan una potencial capacidad para producir antibióticos (Castillo et. al., 2004).

Las colonias aisladas de *B. anthracis* en Agar Sangre Humana (ASH) tienen un diámetro de 2 a 5 mm, son planas o provistas de ligera convexidad, irregularmente redondas con los bordes tenuemente ondulados y presentan una apariencia de vidrio pulido. Se observa la presencia de pequeñas proyecciones en los bordes de la colonia, que se describe como la «cabeza de Medusa» (Koneman et al., 2006).

Otras características de las colonias de *B. anthracis* es que poseen una consistencia densa, no son hemolíticas, a diferencia de las colonias de otros bacilos como *B. cereus* o *B. thuringiensis*. Sin embargo, se puede observar una hemólisis débil en áreas de crecimiento confluyente en cultivos viejos, lo cual no debe ser confundido con  $\beta$ -hemólisis (Koneman et al., 2006).

El *B. anthracis*, debido a la presencia de una capsula pasa a ser un microorganismo extracelular capaz de eludir la fagocitosis, invadir la corriente sanguínea y multiplicarse rápidamente hasta alcanzar una gran masa de microorganismos y provocar en poco tiempo la muerte. El polipéptido capsular y la toxina antranócica, son los principales factores de virulencia de *B. anthracis*. La cápsula de *B. anthracis* está formada por ácido poli-D Glutámico y le confiere resistencia frente a la fagocitosis. La toxina antranócica consta de tres proteínas llamadas Antígeno Protector (AP), Factor de Edema (FE) y Factor Letal (FL). (Frobisher, Hinsdill, Crabtree y Goodheart, 1978).

De hecho, el fragmento mayor AP situado sobre la superficie celular actúa como receptor específico y facilita la entrada de FE o FL. Los efectos biológicos del FE consisten en la formación de edema en las lesiones de ántrax y la inhibición de los leucocitos polimorfonucleares son mediados por el Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPC) que se forma en el interior de la célula por acción enzimática del FE. La entrada del FL está dado por el AP en las células diana

susceptibles, lo que conduce a la muerte celular por un mecanismo desconocido (Koneman et al, 2004).

En todo caso, la mejor manera de prevenir la enfermedad en el ganado es por medio de la vacunación. En Colombia se comercializa una bacterina contra el ántrax, denominada Rayolab, que ha sido utilizada en Venezuela, la cual contiene 20 millones de esporas avirulentas por mililitro. También en Venezuela se ha utilizado la cepa Sterne una bacterina que contiene una suspensión de 50 millones por centímetro cúbico de esporas avirulentas, ambas vacunas protegen contra el desarrollo de la enfermedad y están dirigidas al factor antígeno protector, pero deben aplicarse anualmente (Contreras, 2000).

Sin duda alguna cuando esta enfermedad afecta al ganado genera un impacto negativo para el hombre, puesto que el ántrax es considerado un riesgo ocupacional de trabajadores ganaderos o agrícolas que manipulan animales infectados. Donde la mayoría de las infecciones naturales (95%) se producen por el contacto entre la piel del huésped y los tejidos de animales que han muerto de la enfermedad, como pelo, cuero, lana, etc., e incluso, por productos elaborados con estos tejidos (Acha y Szyfres, 2003).

Por consiguiente el ántrax es una zoonosis transmisible al hombre quien se infecta por contacto directo con animales enfermos, a partir del suelo o por ingesta o inhalación de material infectado. El ántrax en el humano tiene tres formas de manifestaciones clínicas (a) cutánea, (b) pulmonar y (c) gastrointestinal, en cualquiera de los casos se usa como tratamiento antibióticos como penicilina G y Ciprofloxacino en adultos y doxiciclina en niños (Pumarola, Rodríguez, García y Piedrola, 1999).

El ántrax cutáneo comienza al penetrar las esporas de *B. anthracis* en la piel a través de pequeños cortes, abrasiones o picaduras de insectos. Las esporas

germinan en horas, y los elementos vegetativos comienzan a multiplicarse y a elaborar la toxina antranócica. La lesión histológica del ántrax cutáneo se caracteriza por necrosis, congestión vascular, hemorragias y edema gelatinoso (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

Por su parte, en el ántrax pulmonar las esporas de *B. anthracis* son transportadas por el aire en partículas de menos de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y se depositan en los alvéolos o los conductos alveolares. Dichas esporas son fagocitadas por los macrófagos alveolares, y algunas son transportadas hasta los ganglios mediastínicos donde germinan. Rápidamente, puede aparecer una necrosis hemorrágica de los ganglios, junto con una mediastinitis hemorrágica y una bacteriemia fulminante por *B. anthracis* (Vazquez y col, 2006).

Otra forma de ántrax en el ser humano lo constituye el ántrax digestivo, suele producirse al consumir carne poco cocida de animales infectados con el bacilo del ántrax. La infección primaria puede localizarse en el intestino, donde germinan las esporas que logran sobrevivir tras su paso por el estómago, aunque se ha descrito una forma orofaríngea de la enfermedad. Las lesiones faríngeas e intestinales suelen acompañarse de una linfadenitis hemorrágica (Vázquez y col, 2006).

Datos estadísticos provienen en su mayoría de Argentina ya que es una zona endémica del ántrax. Indican que en el año 2006 se identificaron 15 brotes de bovinos muertos por ántrax. Durante el período de 1977-2006 se tiene datos estadísticos de un total de 397.000 reses muertas por esta enfermedad. Durante los últimos 5 años esa cantidad ha disminuido, hecho que se está logrando gracias a la vacunación y eliminación de cadáveres de bovinos muertos por ántrax (Vázquez y col, 2006).

Por otro lado, la enfermedad en el Perú también es endémica. De 1990 a 1992 se notificaron 460 casos de ántrax. Se han continuado observando casos en los últimos años en forma esporádica. Se sospecha que bajas coberturas de vacunación del ganado bovino, caprino y ovino estarían relacionadas con el problema (Acha y Szyfres, 2003).

En Venezuela, se han dado casos de ántrax, son pocos los datos estadísticos que se tienen acerca de ello, sin embargo se conoce que a principios del siglo XX Rafael Rangel demostró experimentalmente la presencia de *B. anthracis* en cabras (Delgado, 1946).

Cabe destacar que no se han realizado muchos estudios sobre el ántrax y su agente etiológico, y donde se han llevado a cabo es porque la enfermedad es endémica de esa área. Donde se han realizado diversos estudios acerca del ántrax, es en países como Argentina donde Mugueta y Bayala desde 1999-2000, llevaron a cabo una serie de excavaciones por medio de las cuales obtuvieron 1422 muestras, correspondientes a restos óseos de *Bos taurus* y *Equus caballus*, con la finalidad de encontrar *B. anthracis*. Utilizaron como medio de cultivo la siembra directa en agar sangre, donde lograron aislar los bacilos: *subtilis*, *cereus* y *megaterium*, aunque ninguna muestra del *B. anthracis*. Por último, procedieron a la inoculación de las muestras en ejemplares del roedor *cavia* aperea variedad *albinus* vía subcutánea, evidenciando que no desarrollaba la enfermedad en el roedor.

Vazquez y col. (2005) describieron un brote de ántrax rural en Argentina donde 25 bovinos murieron a pesar de tener 120 días de haberse colocado la vacuna contra la enfermedad. Utilizaron métodos de microbiología tradicionales, además de otros métodos genéticos más específicos para identificar al *B. anthracis*. Usaron como muestra huesos largos de los animales muertos súbitamente y con las características típicas de la muerte por ántrax, así como también tomaron muestras de los suelos circundantes al animal muerto logrando



identificar el causante de su muerte, el *B. anthracis*. Entre sus conclusiones determinaron que existe una etapa en el año, la estación seco-lluviosa en la que los animales se hacen mas susceptibles a la infección por ántrax.

Un año más tarde, Vazquez y col. (2006), llevaron a cabo una investigación, que tuvo como objetivo utilizar un Sistema de Información Geográfico (SIG) para el análisis epidemiológico del Carbunco Rural, aplicado a un ecosistema ganadero, integrado por 618.000 bovinos, distribuidos en 1.350 establecimientos del partido de Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina. se logró identificar 54 brotes de carbunco, entre los años 1989 al 2005. En el cual se buscó relacionar las vías de desagüe con la aparición de los brotes. El diagnóstico de *B. anthracis* se realizó a partir de muestras de hueso de animales muertos y se encontró que el 93 % de los brotes de carbunco ocurrieron en establecimientos que comparten vías de avenamiento, mientras que el 7 % restante ocurrió en establecimientos ganaderos ubicados fuera del área de influencia de estas vías.

La ganadería en los llanos Venezolanos, también constituye una buena fuente de carnes, al igual que son áreas en donde se podría encontrar microorganismos como *B. anthracis* por su relación directa con el hábitat bovino. Áreas ganaderas ubicadas en el Estado Zulia, quienes trabajan con las vacas bajo la modalidad de ganadería extensiva, han estado en contacto con el *B. anthracis*, lo que les ha ocasionado pérdidas considerables, en esta área existen por lo tanto altas probabilidades de conseguir al Bacilo del ántrax (Contreras, 2000).

En efecto las granjas ganaderas, pueden estar en contacto con ántrax sin darse cuenta hasta que ocurre una verdadera epidemia o endemia de la enfermedad, ya que la muerte por ántrax en los animales ocurre de manera brusca. Por su parte la sequía favorece aún más la permanencia a nivel de los suelos de esporas de *B. anthracis*, en donde puede ocurrir una especie de ciclo puesto que al morir un animal infectado, puede aumentar el depósito de esporas en el suelo e

incrementar las probabilidades de infección para el ganado sano (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

Es cierto que el ántrax maligno o carbunco, es una zoonosis típica de Venezuela, por lo cual se hace necesario realizar investigaciones acerca de su agente etiológico *B. anthracis*, ya que no se han ejecutado de una manera constante en Venezuela, lo que provoca que causas de muerte súbita en bovinos, pasen por alto cuando podrían estar relacionadas con el ántrax (Contreras, 2000).

Por tal motivo es de gran importancia detectar al *B. anthracis* para evitar daños no sólo al ganado bovino sino también a los hombres que laboran en este contexto, para lo cual se debe demostrar su existencia en determinadas áreas de Venezuela (Delgado, 1946).

Por lo anteriormente expuesto, se considera importante dar respuesta a las siguientes interrogantes:

¿Estará presente el *B. anthracis* a nivel de suelo, y mucosas de los animales en la agropecuaria "La Veneta" ubicada en el Estado Zulia, en el año 2007?

¿Qué otras especies de *Bacillus* estarán presentes en las muestras de suelo y animal?

¿Existirá alguna relación entre las bacterias del género *Bacillus* aisladas en el suelo y las aisladas en el animal?

Es por ello que existe una vacuna para prevenir el ántrax en los animales y así evitar su transmisión hacia el hombre, por lo que ha disminuido la incidencia de la enfermedad, sin embargo, en las granjas, es común que los animales se enfermen; y en consecuencia no son utilizados en la producción ganadera. En la mayoría de los casos, el personal encargado de los animales ignora de que

podieran estar enfermos y si ocurre la muerte del animal simplemente es enterrado en los suelos de la misma granja (Vazquez y col, 2006).

Es importante detectar el *B. anthracis* en suelos y animales para así saber que las enfermedades que pudieran adquirir las vacas son causadas por *B. anthracis* u otras bacterias. De ser positivo el aislamiento de esta bacteria, se debería alertar a los ganaderos y veterinarios acerca del peligro que causa el enterrar animales muertos por infección de *B. anthracis*; y así evitar que se establezca una acumulación latente de esporas en los suelos, que pueda traer consecuencias negativas tanto para los animales como para la salud de las personas. En el caso de que este ambiente esté sano, es decir, libre de *B. anthracis*, es importante ya que se estaría dando una tranquilidad a los dueños de la granja, haciéndoles saber que sus tierras están sanitariamente aceptables.

## OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### Objetivo General

Establecer la relación entre la presencia del *Bacillus anthracis* en muestras de suelos y mucosas de ganado vacuno de una granja ganadera ubicada en el Estado Zulia.

### Objetivos Específicos

- Determinar la presencia del *B. anthracis* en muestras de suelos de una granja agropecuaria ubicada en el Estado Zulia.
- Determinar la presencia del *B. anthracis* en muestras de mucosas del ganado vacuno.
- Determinar taxonómicamente otras cepas de *Bacillus* aisladas a partir de muestras de suelo.
- Determinar taxonómicamente otras cepas de *Bacillus* aisladas a partir de muestras del ganado vacuno.
- Comparar las especies aisladas en las muestras del suelo con las especies aisladas en las muestras del animal.

## METODOLOGIA

### **Tipo de investigación:**

Este trabajo se realizó bajo un diseño no experimental, debido a que no se manipularon ninguna de las variables en estudio de forma deliberada. Los hechos se observaron tal y como se presentan en su contexto real y en un tiempo determinado o no, para posteriormente analizarlos (Stracuzzi y Pestana, 2003).

De igual manera la investigación que se desarrolló adoptó un diseño de tipo descriptivo-correlacional, es descriptivo, ya que se determina como es y como está un fenómeno, lo que permite ordenar el resultado de las observaciones, las conductas, las características, los factores, los procedimientos y otras variables de fenómenos y hechos (Orazco, Labrador y Montañés, 2002). Es correlacional, porque su finalidad es conocer el grado de relación entre dos variables en estudio, en este caso los animales y el suelo (Arias, 2004).

La investigación que se desarrolló, es del tipo transeccional o transversal, debido a que la recolección de los datos se hizo en un solo momento, en un único tiempo, cuyo propósito es describir las variables y su interrelación en un momento dado, además es de campo ya que se centra en hacer el estudio donde el fenómeno se da de manera natural, de este modo se busca conseguir la situación lo más real posible (Hernández, Fernández y Baptista, 2003).

**Población:**

La población para la presente investigación estuvo conformada por los suelos y animales de la agropecuaria "La Veneta" ubicada en el sector el Venado, del Estado Zulia. La misma cuenta con una extensión de 200 hectáreas de tierra donde habitan 150 reses.

**Muestra:**

Para el estudio se tomaron 120 muestras, distribuidas de la siguiente manera: (a) 60 muestras provenientes del suelo, cubriendo una extensión de aproximadamente 1 hectáreas de la finca y, (b) 60 muestras provenientes de las mucosas del animal, estas últimas correspondían a 30 muestras de las fosas nasales y otras 30 provenientes de las encías de las reses.

Todas las muestras del animal fueron recolectadas de forma aleatoria de la población antes mencionada. Las diferentes porciones del suelo se seleccionaron de modo intencional, en base a recomendaciones del personal obrero, tomando en cuenta los lugares donde frecuentan las reses como componentes de la muestra

**Metodología:**

Para la obtención de los datos de nuestro estudio, se siguió una metodología estándar, en la que se especifican los procedimientos a seguir en la determinación de *B. anthracis*. (Koneman et al., 2004).

**1. Suelo:**

Para recolectar las muestras de suelo, se utilizaron instrumentos de jardinería (pala pequeña) y se colocaron en bolsas plásticas de cierre hermético

para luego ser transportados al laboratorio. Como se mencionó anteriormente, los lugares de toma de muestra del suelo, fueron elegidos de acuerdo a la frecuencia con que las reses, que forman parte de la muestra pasan el tiempo en esos lugares.

Con un hisopo estéril, humedecido con Solución Salina Fisiológica 0,85%, se tomó una porción bien mezclada de la muestra, y se introdujo en un caldo nutritivo, se mezclaron y homogeneizaron obteniendo una muestra única, dejando el hisopo dentro del tubo, se incubó por 24 h, a 35° C.

Una vez obtenido el crecimiento en los caldos, se procedió a inocular los mismos en placas de agar nutritivo, las cuales se incubaron a 35 ° C por 24 h. Transcurrido este tiempo, se analizó el crecimiento y a las colonias sospechosas de *B. anthracis* se les practicó una coloración de Gram, para comprobar la presencia de bacilos grampositivos. Posteriormente, se reaislaron esas colonias en un tubo de agar nutritivo inclinado, y se incubaron a la misma temperatura y el mismo tiempo de incubación, con el fin de obtener las cepas aisladas para practicárseles las pruebas bioquímicas de identificación.

## **2. Animales:**

Se utilizaron hisopos grandes, de elaboración en el laboratorio, los cuales consisten en una torunda de algodón, cubierta con una gasa y amarrada a un aplicador de plástico con pabilo. Estos hisopos, fueron introducidos en las fosas nasales y encías de cada una de las reses; y luego colocados en bolsas plásticas de cierre hermético, las cuales contenían glicerina, con la finalidad de mantener humedecida la muestra hasta su llegada al laboratorio.

Se tomó un hisopo pequeño, estéril y se humedeció en Solución Salina Fisiológica 0,85%, y se rotó por toda la superficie del hisopo grande, para obtener

la mayor cantidad de muestra posible, y se introdujo en caldo nutritivo, dejando el hisopo dentro del tubo, se aplicó vortex y se incubó por 24 h, a 35° C.

Una vez obtenido el crecimiento en los caldos, se procedió a inocular los mismos en placas de agar sangre humana, colocando un inóculo con el hisopo sobre la placa y luego estriando con un asa de platino por agotamiento para así obtener colonias aisladas. Una vez sembradas las placas, se incubaron a 35 ° C por 24 h; transcurrido este tiempo, se analizó el crecimiento, se observó el patrón de hemólisis, características de las colonias, y a las colonias sospechosas de *B. anthracis* se les practicó una coloración de Gram, para comprobar la presencia de bacilos grampositivos. Luego se reaislaron esas colonias en un tubo de agar nutritivo inclinado, y se continuó con el mismo procedimiento que las muestras de suelo, para su posterior identificación.

#### **Pruebas bioquímicas para la detección de *B. anthracis*:**

La identificación de las bacterias se realizó tomando en cuenta características morfológicas, además se realizó la diferenciación bioquímica respectiva de acuerdo a lo establecido en el Manuales de Bergey's of Determinative Bacteriology (1994) y Mac Faddin (2003), que incluye; reacción de coloración de Gram, motilidad, catalasa, reducción de nitratos, Voges-Proskauer, hidrólisis del almidón, O-F glucosa, y lecitinasa.

#### **Coloración de Gram:**

Esta tinción permite ver si las bacterias en estudio pertenecen a bacterias Gram positivas o negativas. Para esto se utilizó: violeta de genciana, lugol, alcohol acetona y safranina o fucsina de básica (Valenzuela, 2003).



Un inóculo de la muestra se extendió en un portaobjeto con la ayuda de un asa de siembra y se fijó con la flama del mechero. Posteriormente la muestra se depositó en una horquilla de alambre para agregar violeta de genciana por un minuto, a continuación se lavó con abundante agua y se agregó lugol por un minuto, este último cumple la función de mordiente. Posteriormente se lavó con abundante agua y se agregó alcohol acetona por 10 segundos, se volvió a lavar y se agregó fucsina básica o safranina por 60 segundos. Una vez pasado el tiempo se lavó con agua y se procedió al secado de la muestra en la flama del mechero.

Las preparaciones fijadas y teñidas se observaron al microscopio con un aumento de 100X para su clasificación en Gram positivas (color violeta) o negativas (color rosado o rojo), dejando solo las Gram positivas ya que esa es una condición que presentan las bacterias del género a estudiar.

### **Prueba de Movilidad usando medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina):**

Es un medio semisólido que permite evaluar la movilidad bacteriana, cualidad consecuente de la presencia de flagelos.

Para esta prueba se sembró por picadura un inóculo de la bacteria en estudio en el medio MIO, posteriormente se incubó las muestras a 35°C por 24 horas.

La prueba de movilidad se interpreta haciendo un examen macroscópico del medio, es positivo por la presencia de una zona difusa de crecimiento que se proyecta sobre y fuera de la línea de inoculación indicando positividad de la reacción. Es negativa cuando solo crece en el sitio de la punción

**Prueba de la catalasa:**

La catalasa es una enzima que tienen la mayoría de las bacterias, cuya función es catalizar la ruptura del agua oxigenada, liberando oxígeno al ambiente (Valenzuela, 2003).

Para esta prueba se tomó un portaobjeto y se depositó un inóculo de las bacterias a examinar, sobre éstas se depositó una gota de agua oxigenada, la reacción es positiva si existe liberación de burbujas. Generalmente esta prueba es positiva para el género *Bacillus*.

**Prueba de reducción de nitratos:**

Esta es una reacción que pueden llevar a cabo los microorganismos anaerobios facultativos, formando compuestos tales como nitritos, amoníaco y óxido nitroso (Mac Faddin, 2003).

Para esta prueba se debió sembrar por picadura un inóculo de la bacteria en estudio en agar nitrato, las cuales se incubaron a 35°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se agregó 0.5 mL de la solución A (0,8 g. ácido sulfanílico en 100 mL ácido acético 5N) y B (0,5 g. alfa naftilamina en 100 mL ácido acético 5N) del reactivo nitrato. La reacción es positiva si el contenido del tubo se torna de color violeta o café ladrillo.

**Prueba de Voges-Proskauer:**

Con esta prueba es posible observar si la bacteria en estudio realiza una fermentación fórmica de tipo butilenglicol o llamada de tipo Aerógenes (Mac Faddin, 2003).

Un inóculo de la bacteria en estudio se sembró en tubos que contenían caldo glucosado, tras lo cual se incubaron a 35°C por 24 horas, luego se agregó a cada tubo el reactivo de Barrit, 0.5 mL de la solución A (naftol al 5% diluido en alcohol etílico 95%) y 0.2 mL de la solución B (KOH al 40%). Se esperaron aproximadamente 10 minutos para ver si la reacción es o no positiva, si el contenido del tubo se torna color rosado, la reacción es considerada positiva.

### **Hidrólisis del almidón:**

El resultado de esta prueba permite observar si la cepa bacteriana en estudio es capaz de utilizar el almidón, secretando amilasas para la degradación de éste (Mac Faddin, 2003).

La cepa bacteriana se sembró en solución almidón que se encontraba en placas de Petri, posteriormente se incubaron a 35°C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación agregó al interior de la placa solución de yodo para ver si la reacción era positiva (color yodo) o negativa (color azul o violeta).

### **Hidrólisis de hidratos de carbono (OF glucosa):**

En esta prueba se buscó determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de la glucosa. (Valenzuela, 2003).

Para esto se sembró la cepa bacteriana en estudio, en el tubo provisto del medio, durante 24 horas a 35°C. Reacción positiva se denota por un cambio de color de verde a amarillo indicando la producción de ácidos y negativa se mantiene el color original del medio. Los microorganismos oxidativos producen ácidos sólo en el tubo abierto, en tanto que los microorganismos fermentadores producen ácidos en ambos tubos y las bacterias no sacarolíticas son inertes en este medio.

**Prueba de la Lecitinasa:**

Se realizó en medios sólidos preparados en placas de Petri, inoculados con asa de platino a través de una estriación bien compacta, las cuales fueron incubadas a 35°C por 24 horas. La interpretación se realizó en base a la aparición de un halo claro alrededor de la colonia es una reacción positiva y ausencia del mismo describe una reacción negativa.

### **Análisis de los datos:**

Para efectos de análisis y comprensión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se utilizaron tablas de distribución de frecuencias relativas, puesto que en los mismos se describe la frecuencia con que se presenta un fenómeno de interés, en este caso la presencia del *B. anthracis* o bacterias del género *Bacillus* en muestras de suelo y animal. También se utilizó un cuadro y un gráfico de barras proporcionadas, con la finalidad de comparar las distintas especies de *Bacillus* que se aislaron entre las variables estudiadas animal y suelo (Puertas y col, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Suelo

Del total de cepas aisladas ( $n = 60$ ), que fueron recolectadas en suelos de granja ganadera, de acuerdo a los test bioquímicas realizados y a las claves de el Manual de Bergey's, se determinaron un total de ocho especies: *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. sphaericus*.

En la tabla 1, se muestra la distribución porcentual de probables taxas de bacterias recolectadas en un suelo de la Agropecuaria La Veneta.

TABLA N° 1

**Bacterias del género *Bacillus* aisladas a partir de muestras de suelos**

<b>Germen aislado</b>	<b>Frecuencia (f)</b>	<b>F.R (%)</b>
<i>B. polymyxa</i>	24	40
<i>B. subtilis</i>	14	23
<i>B. brevis</i>	12	20
<i>B. licheniformis</i>	5	8
<i>B. pumilus</i>	2	3
<i>B. megaterium</i>	1	2
<i>B. cereus</i>	1	2
<i>B. sphaericus</i>	1	2
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>

**Fuente:** Datos Obtenidos del Presente Estudio

En la tabla 1 se observan las distintas especies probables del género *Bacillus* presentes en suelos de la Agropecuaria La Veneta que fueron recolectadas durante el mes de septiembre del año 2007. Todas las bacterias de esta tabla, están identificadas con un porcentaje de certeza de un 85% con respecto a las pruebas bioquímicas realizadas.

Dentro de este muestreo se recolectaron 8 especies, como se puede observar la especie que predominó es *B. polymyxa* (40%) en segundo lugar está *B. subtilis* (23%) y *B. brevis* (20%), las de menor porcentaje fueron *B. licheniformis* (8%), *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. sphaericus* todas con un (2%).

En las muestras de suelo, no se aisló el *B. anthracis*, lo que no significa que este bacilo este ausente en esos suelos, ya que existen diversos factores que influyen en su detección como la cantidad de muestra, los métodos diagnóstico utilizados, así como también el saneamiento ambiental que pudo ser practicado en las zonas de toma de muestra, como es la quema de grandes áreas de terreno lo cual ocurre con cierta frecuencia, debido a la altas temperaturas que predominan en la región.

Dentro de las cepas aisladas con mayor frecuencia en el presente estudio está en primer lugar *B. polymyxa* (40%) y en segundo lugar *B. subtilis* (23%), este último también se ha encontrado en gran cantidad en otros suelos, tal como lo describe (Romero-Tabarez, 2006), quien aisló esta cepa bacteriana de suelos, e investigó su producción de antibióticos bacteriostáticos (7-O- Malonyl macrolactina A) que inhibe un número de patógenos bacterianos Gram positivos, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Enterococci*.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en el presente estudio difieren de lo reportado por Bastias en el año 1981 quien encontró un predominio de *B. subtilis* en muestras de suelo, en el presente estudio se encontró que *B. polymyxa*

puede ser fácilmente aislado de muestras de suelo, debido a que se presentan en alta frecuencia en los sectores en que se realizó el estudio.

### Animal

A continuación se presenta una tabla con las bacterias aisladas de las muestras provenientes del animal:

TABLA N° 2:

**Bacterias del genero *Bacillus* aisladas de las muestras provenientes de los animales**

<b>Germen aislado</b>	<b>Frecuencia (f)</b>	<b>F.R (%)</b>
<i>B. polymyxa</i>	26	43
<i>B. brevis</i>	15	25
<i>B. coagulans</i>	5	8
<i>B. cereus</i>	4	6,5
<i>B. subtilis</i>	3	5
<i>B. alvei</i>	1	2
<i>B. pumilus</i>	1	2
<i>B. sphaericus</i>	1	2
Otros bacilos grampositivos	4	6,5
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>

**Fuente:** Datos Obtenidos en el Presente Estudio

En la tabla 2, todas las bacterias, están identificadas con un porcentaje de certeza de un 85% con respecto a las pruebas bioquímicas realizadas. Las



bacterias clasificadas como otros bacilos grampositivos, son bacterias de ese tipo que no cumplieron con el mínimo de pruebas necesarias para la identificación de las mismas.

Se observa que en la tabla 2, hay una distribución que favorece en casi la mitad de las muestras al aislamiento de *B. polymyxa*, bacilo común del suelo, que se alimenta de restos vegetales y posiblemente llega a la mucosa bucal de la res al momento que esta se alimenta de los pastos; así como también los demás bacilos aislados en menor porcentaje.

Las muestras provenientes del animal al igual que las muestras provenientes del suelo no arrojaron resultados positivos acerca del aislamiento de *B. anthracis*, lo que no significa que este bacilo esté ausente en todos los animales, ya que existen diversos factores que inciden en su detección, situación similar a la confrontada por Mugueta y Bayala quien en un trabajo cuyo objetivo fue aislar el *B. anthracis*, en restos óseos de ganado vacuno, sólo lograron aislar *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. megaterium*.

En relación a los resultados del presente estudio es preciso acotar que *B. polymyxa* y *B. brevis* además de ser bacterias saprofitas del suelo, son consideradas bacterias biocontroladoras (Foster, 2001), indicó que estas especies del genero *Bacillus* "tienen un efecto biocontrolador sobre bacterias y hongos patógenos" *in Vitro*, lo cual se debe demostrar en futuras investigaciones. Si bien, no se puede asegurar este efecto *in Vivo*, lo cual es posible, existe la probabilidad de que haya ocurrido este efecto *in Vitro* en la presente investigación lo cual dificultó el aislamiento de *B. anthracis*.

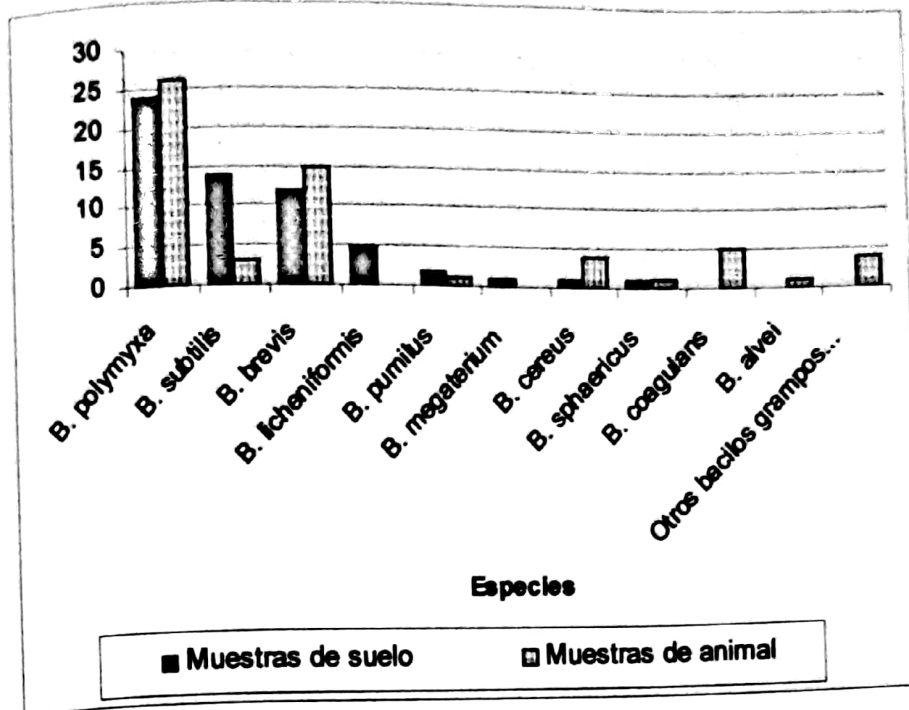


Gráfico N° 1. Comparación de frecuencias de las especies de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en muestras de suelos y animales.

Fuente: Datos obtenidos en el presente estudio

En el gráfico 1, se observa que dentro de cada muestreo se recolectaron especies similares de bacterias del género *Bacillus* tanto en las muestras provenientes del suelo como las del animal y se conserva el predominio de *B. polymyxa* en ambas muestras.

Estas diez especies encontradas en total sugieren el predominio del género *Bacillus* en la zona estudiada, aun cuando se encuentren en distintos porcentajes. Por lo descrito anteriormente se puede señalar, que iguales especies de bacterias del género *Bacillus* se pueden encontrar en el suelo muestreado debido a que sus estructuras de resistencias les permiten soportar distintas condiciones.

Cabe mencionar que las probables especies: *B. licheniformis* y *B. megaterium* se aislaron sólo en muestras de suelos, en tanto que los *B. coagulans*

y *B. Alvei* sólo se encontraron en el animal. Esto ocurrió probablemente debido a que se muestrearon suelos que tal vez no fueron frecuentados por los animales en estudio.

Dentro de las factibles especies de bacterias que presentaron un mayor porcentaje fueron *B. polymyxa* con un promedio de (42%) y *B. brevis* (23%) de promedio (ver anexo A). Estudios indican que las bacterias de este género se encuentran naturalmente en el suelo formando la microflora propia de estos. Tal como lo indica Sackenheim (1996) quien a partir de muestras de suelo, pudo descifrar que la gran variedad de especie del género *Bacillus* es amplia en los suelos, lo cual coincide con este estudio en que las especies de este género están ampliamente distribuidas y que son fácilmente aislables mediante los mismos métodos utilizados en ambos estudios.

Se demostró que la mayoría de las bacterias presentes en el suelo, colonizan la mucosa del animal, lo cual es importante ya que en el caso de haber bacterias patógenas estrictas en los suelos, existen grandes posibilidades que el animal se infecte y sea un potencial agente contaminante para el hombre.

## CONCLUSIONES

No se detectó *B. anthracis*, en las muestras provenientes del suelo y mucosas del animal.

Se identificó otros bacilos presentes en las muestras de suelo como: *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. sphaericus*. Así como también se detectó otras especies provenientes del animal como: *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. alvei*, *B. pumilus* y *B. sphaericus*.

Se infiere que la ausencia de *B. anthracis*, en las muestras de suelo se deba a tratamiento previo en la hacienda muestreada, tal como la practica del saneamiento ambiental.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere ampliar el estudio y muestrear un área de los suelos de mayor extensión debido a las dimensiones que presenta la finca.

También se recomienda utilizar una mayor cantidad de pruebas bioquímicas, para obtener una identificación más precisa de las bacterias.

Ampliar la investigación en busca de esporas del *B. anthracis* en muestras de suelos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, PN y Szyfres B. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. (3a. ed.). Volumen III. OPS.
- Arias F. (2004). *El proyecto de investigación, introducción a la metodología científica*. Editorial Episteme, Caracas-Venezuela.
- Bastias P. (1981). *Especies del Género Bacillus cohn (1872) (Buchanan et al. 1974) en dos habitats de la zona de Valdivia*. Tesis de título para profesor de Biología y Química. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 30 p.
- Basualdo J, Coto C. y De Torres R. (1996). *Microbiología biomédica*. Editorial Altante Argentina, S.R.L. Buenos Aires-Argentina.
- Castillo, C., Sosa, B y Scorza, J. (2004). *Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género Bacillus*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 24, num 1-2, p 65-67.
- Contreras, J. (2000). *Enfermedades causadas por agentes virales, bacterianos, rickettsiales y protozoarios: diagnóstico, tratamiento y control* (2a. ed.). Barquisimeto. Edo Lara.
- Delgado, H. (1946). *Contribución al estudio de la inmunización del ántrax*. Tesis de Doctorado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay, Venezuela.
- Foster, A. (2001). Magazine: *Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species*. Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK. 91(2):364-72.
- Frobisher M, Hinsdill R, Crabtree K. y Goodheart C. (1978). *Microbiología*. (5a. ed.). SALVAT Editores, S.A.-Mallorca, 41-Barcelona (España).
- Hernández R, Fernández C. y Baptista P. (2003). *Metodología de la investigación*. (3ra. Ed.). Editorial Mc Graw Hill Interamericana, México D.F.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J. y Williams S. (1994). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. (9na. ed.). Editorial Williams y Wilkins.
- Hoogesteijn, R. y Mazzei, L. (2002). *Planes sanitarios para rebaños de producción bovina de carne*. *Venezuela bovina*. N° (55), 8-17.

- Joklik W, Willet H, Amos B, Wilfert. y cols. (1994). *Zinsser microbiología* (20a. ed.). Buenos Aires-Argentina. Editorial Médica Panamericana, S.A. (p. 834).
- Kenneth, R. y George, R. (2005). *Microbiología médica* (4a. ed.). Editorial Mc Graw- Hill. Interamericana Editores, S.A. de CV: México.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P. y Winn W. (2004). *Diagnóstico microbiológico* (5a. ed.). Editorial Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires-Argentina.
- Mac Faddin, J. (2003). "*Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*" (3a. ed.). Editorial Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires-Argentina.
- Mugueta, M. y Bayala, P. (1999a). *Investigaciones arqueológicas en el Cantón Tapalqué Viejo: aquella solitaria vaca engripada. Primer Informe*. Actas de III Jornadas Chivilcoyanas en Ciencias Sociales y Naturales. Instituto Municipal de Investigaciones Antropológicas de Chivilcoy, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP). La Plata. Disponible: <http://www.antropologia.com.ar/> [Consulta: 2007, Septiembre 20]
- Mugueta, M. y Bayala, P. (1999b). *Investigaciones arqueológicas en el cantón Tapalqué Viejo: aquella solitaria vaca engripada. Segundo informe*. Segundas Jornadas Regionales de Historia y Arqueología del siglo XIX. UNLP, UNCPBA y Casa de la Cultura. Guaminí. Disponible: [www.arqueologia.com.ar](http://www.arqueologia.com.ar) [Consulta 2007, Septiembre20]
- Orozco C, Labrador M. y Montañés A. (2002). *Metodología. Manual teórico práctico para tesis, asesores, tutores y jurados de trabajos de investigación y ascenso* (1ra. Ed.). Venezuela.
- Osbaldiston, G. (1981). *Técnicas de Laboratorio en Bacteriología Clínica Veterinaria*. Editorial Acribia-zaragoza (España).
- Puertas E, Urbina J, Blanck E, Granadillo D, Blanchard M, García J, Vargas P y Chiquito A. (1998). *Bioestadística, Herramienta de la Investigación*. Editado por: CDCHT-UC. Venezuela.
- Pumarola A, Rodríguez A, García J. y Piedrola G. (1999). *Microbiología y parasitología médica* (2a. ed.). Editorial Masson, S.A. Barcelona (España).
- Romero-Tabarez, M. (2006). *7-O<sub>2</sub>-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from Bacillus subtilis active against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococci, and a small-*

*colony variant of Burkholderia cepacia*. Division of Microbiology, German Research Centre for Biotechnology, Braunschweig, Germany. Antimicrobial agents and chemotherapy. 50(5): 1701-1709.

Sackenheim, R. (1996). *Efectos de la solarización y de la fumigación sobre la población natural de Bacillus spp., Pseudomonas spp., Fusarium spp. y Fusarium oxysporum en el Valle de Azapa, primera región de Chile*. Investigación agrícola. v. 16(1-2) p. 57-66. (Summary).

Schlegel, H. (1997). *Microbiología general*, Ediciones Omegas, S.A., Barcelona. 654 p.

Stracuzzi S. y Pestana F. (2003). *Metodología de la investigación cuantitativa* (1ra. Ed.). Venezuela.

Valenzuela, E. (2003). *Guía Pasos Prácticos Microbiología 112*, edita Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, 40 p.

Vazquez, P., Nosedá, R., Combessies, G., Cordeviola, J., Bigalli, C., Fiscalini, B., Bardon, J. y Martínez, A. (2005). *Programa de alertas y respuestas ante una epidemia de ocurrencia natural, Accidental o Deliberada de B. anthracis Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 12, Veterinaria.org® - Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Vazquez, P., Nosedá, R., Combessies, G., Cordeviola, J., Bigalli, C., Fiscalini, B., Bardon, J. y Martínez, A. (2006). *Bacillus anthracis, utilización de un Sistema de Información Geográfico (SIG), para el análisis espacio temporal de 54 brotes de carbunco rural en el partido de Azul, Bs. As., Argentina*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 12, Veterinaria.org® - Comunidad Virtual Veterinaria.org® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020206.html> [Consulta, 2007 Agosto 14]



ANEXO A

TABLA N° 3.

Resumen de las distintas especies de *Bacillus* encontradas en muestras de suelo y animal.

Germen aislado	Suelo		Animal		Total
	f	F.R	f	F.R	
<i>B. polymyxa</i>	24	40%	26	43%	50
<i>B. subtilis</i>	14	23%	3	5%	17
<i>B. brevis</i>	12	20%	15	25%	27
<i>B. licheniformis</i>	5	8%	0	0%	5
<i>B. pumilus</i>	2	3%	1	2%	3
<i>B. megaterium</i>	1	2%	0	0%	1
<i>B. cereus</i>	1	2%	4	6,50%	5
<i>B. sphaericus</i>	1	2%	1	2%	2
<i>B. coagulans</i>	0	0%	5	8%	5
<i>B. alvei</i>	0	0%	1	2%	1
Otros bacilos grampositivos	0	0%	4	6,50%	4
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100%</b>	<b>60</b>	<b>100,00%</b>	<b>120</b>

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio

ANEXO B

TABLA N° 4. Clave para la taxonomía bacteriana

Especies	Catalasa	Motilidad	Lecitinasa	OF glucosa	Almidón	Nitrato	VP
<i>B. anthracis</i>	+	-	+	F		+	V
<i>B. cereus</i> y <i>B. mycoides</i>	+	+	+	F	V	V	V
<i>B. megaterium</i>	+	V	-	F	+	-	-
<i>B. licheniformis</i>	+	V	+	F	+	+	V
<i>B. subtilis</i>	+	V	-	F	V	V	V
<i>B. firmus</i>	+	+	-	F	V	V	-
<i>B. pumilus</i>	+	+	-	F	-	-	V
<i>B. macerans</i>	+	V	-	F	+	+	-
<i>B. polymyxa</i>	+	+	-	F	+	+	+
<i>B. circulans</i>	+	+	-	F	+	V	-
<i>B. stearothermophilus</i>	+	+	-	F	+	+	-
<i>B. laterosporus</i>	+	+	-	F	-	+	-
<i>B. alvei</i>	+	+	-	F	+	V	V
<i>B. brevis</i>	+	+	-	OF	V	V	-
<i>B. sphaericus</i>	+	+	-	OF	V	V	-
<i>B. coagulans</i>	+	+	-	F		-	+
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	-	F		+	-
<i>B. lentus</i>	+	+	-	F		-	-

Fuente: Koneman et al., 2006 (pp. 642-643). Abreviaturas para reacciones: +, 90% o más reacciones positivas; -, 90% o más reacciones negativas; V 11-89% de reacciones positivas, algunas reacciones demoradas. Los espacios en blanco indican que no se dispone de datos.