

## Tesis de Posgrado

# Investigación de bacterias coliformes en el agua : modificaciones al medio de Mac Conkey

Leiguarda, Ramón Héctor

1942

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Leiguarda, Ramón Héctor. (1942). Investigación de bacterias coliformes en el agua : modificaciones al medio de Mac Conkey. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0284\\_Leiguarda.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0284_Leiguarda.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Leiguarda, Ramón Héctor. "Investigación de bacterias coliformes en el agua : modificaciones al medio de Mac Conkey". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1942. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0284\\_Leiguarda.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0284_Leiguarda.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

INVESTIGACION DE BACTERIAS COLIFORMES EN EL AGUA

MODIFICACIONES AL MEDIO DE MAC CONKEY

-----oO-----

Tesis presentada por:

Ramón Héctor Leiguarda.

a la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y  
Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

*Tesis*: 284

Mayo - 1942.

-----o-----

**El autor manifiesta su profundo agradecimiento al Doctor Regilio A. Trelles, Jefe de los Laboratorios de Ceras Sanitarias de la Nación, y al Doctor Raúl Ferramola, Jefe de la Sección "Bacteriología" de los mismos, por haber permitido y dirigido la realización de este trabajo.-**

# FOFNA

## INTRODUCCION

### Antecedentes de los medios con bilis y del caldo de Mac Conkey.

Los medios de enriquecimiento para análisis bacteriológico del agua pueden clasificarse en dos grandes grupos. Uno en el cual se encuentran aquellos que permiten el desarrollo de todas las bacterias, sean éstas del grupo coli aerogenes o no. Y otro que comprende a los que poseen sustancias que inhiben el desarrollo de las bacterias que fermentan la lactosa y que no tienen significado en la apreciación del valor sanitario del agua.

Dentro del primer grupo, el más importante es el caldo lactosado, que se emplea como medio de enriquecimiento en el método de la Asociación Americana de Salud Pública. La causa principal por la que no satisface el caldo lactosado es que da un gran porcentaje de tubos falsos positivos que aumentan innecesariamente la tarea y el consumo de material.

Al segundo grupo corresponden una serie de medios cuyo poder inhibitor se debe a la acción de colorantes, como el caldo lactosado con azul de metileno y bromo cresol púrpura (Dominik y Neuter 1929), el caldo lactosado con cristal violeta (Salle 1930), y el caldo lactosado con fucsina (Ritter 1931); o de otras sustancias como el caldo lactosado con bilis (Mac Conkey 1908), el caldo lactosado con bilis y verde brillante (Jordan 1927) y el caldo con formatos y ricinoleatos (Stark y England 1935).

Los medios con bilis han sido objeto de profundo estudio a partir del año 1900 en que Mac Conkey empleó taurocolato de sodio comercial para la diferenciación del B. coli y del B. typhosus en las heces.

Mac Conkey y Hill (1), en 1901, usaron este medio con gran éxito para el aislamiento de bacterias de líquidos cloacales.

Jackson (2), en 1907, como resultado de un estudio efectuado con cinco mil muestras de agua sembradas en un medio biliado llegó a la conclusión de que la acción

inhibidora de la sal de bilis era selectiva pues favorecía el crecimiento y reproducción del *B. coli*, retardaba el crecimiento de ciertos estreptococos y mataba la mayoría de otras especies que se desarrollan a 37° C.

Hale y Melia (3), en 1910, encontraron que la sal de bilis en el caldo lactosado con bilis causaba un grado apreciable de inhibición en el desarrollo de los *B. coli* que era mas notorio cuando estaban atenuados; pero, que también daba un número mayor de ensayos presuntivos reales para *B. coli* que cualquier otro medio conocido.

Jackson y Muer (4), en 1911, observaron que todas las especies del grupo *coli* producían gas en el caldo con lactosa y bilis, mientras que otras bacterias que normalmente fermentan la lactosa no lo hacían en estas condiciones, a excepción del *B. welchii* que se puede distinguir fácilmente del *B. coli* por examen microscópico.

Además mostraron que dicho caldo era ligeramente inhibitor sólo para formas atenuadas de *B. coli*, de modo que la mayoría de los ensayos positivos indicaban contaminación reciente del agua.

Jordán (5), en 1913, llegó a la conclusión de que la bilis inhibe de un tercio a un medio de los *B. coli* presentes, provenientes tanto de cultivos recientes como de cultivos viejos, y por lo tanto, su uso siempre implica la supresión de un cierto número de bacterias coliformes.

Obst (6), en 1916, prefirió el caldo lactosado standard al caldo con lactosa y bilis, por la dificultad en encontrar bilis fresca de composición uniforme y porque la bilis estacionada se deterioraba progresivamente perdiendo calidad.

Bunker (7), en 1916, mostró que un medio compuesto por 1 % de peptonas, 1 de lactosa y de 2 a 5 % de bilis seca, era en la mayoría de los casos, más seguro que el caldo de lactosa standard para la determinación de microorganismos intestinales.

Salter (8), en 1919, hizo notar la importancia que tiene la concentración de la sal de bilis en el medio, pues 0,5 % estimulaba el desarrollo del *B. coli* común mientras que concentraciones mayores, por ejemplo de 1 %, tenían un marcado efecto inhibitor sobre el mismo.

Muer y Harris (9), en 1920, demostraron la mayor sensibilidad de un medio -

conteniendo 5 % de bilis de buey seca, sobre otro con un 10 %.

Levine (10), en 1921, observó que las sales biliares estimulaban el crecimiento del *B. coli* cuando la concentración era menor que 0,5 %, pero, mostraban un marcado efecto inhibitor si la concentración subía del 0,7-1 %.

El mismo Levine (11), en 1922, hizo experiencias con taurocolato de sodio — "Merk" y bilis evaporada "Difco", estableciendo que las concentraciones óptimas de taurocolato para *B. coli* oscila entre 0,5 y 0,75 % y para *B. aerogenes* es de 0,75 %. En la bilis evaporada "Difco" las concentraciones óptimas son: para el *B. coli* 1-2 % y para *B. aerogenes* 1 %. Para el *B. coli* 5 % no es perjudicial, mientras que para el *B. aerogenes* concentraciones mayores al 1 % inhiben su desarrollo.

Sinslow y Dilloff (12), en 1922, observaron que la producción de gas era mayor en el caldo lactosado con bilis que en el caldo lactosado "standard" en cualquier pH.

D.R. y St.R. (13), en 1923, recomendaron el medio de bilis con motivo de su sensibilidad y la comodidad con que se puede emplear. Indicaron tres medios biliados, entre ellos el de Mac Conkey.

Cunningham y Raghavachari (14) y (15), en 1924 y 1926, y Raghavachari en 1926 afirmaron que el caldo de Mac Conkey era el medio más favorable para el aislamiento de las bacterias coliformes de las heces, la tierra, la leche y el agua.

Dunham (16), en 1925, observó que la bilis evaporada puede estimular o no el crecimiento de las bacterias del grupo coli según sea la concentración y la reacción del medio; que las distintas muestras de bilis no presentan el mismo poder inhibitor y que en caldo lactosado el crecimiento máximo era en pH 6,1, mientras que en un caldo lactosado con bilis el pH óptimo oscilaba entre 7,5 y 7,8.

Cameron (17) y Ey (18), en el año 1930, efectuaron separadamente dos trabajos comparativos entre el caldo lactosado con y sin bilis. Cameron estableció la superioridad del caldo lactosado con bilis mientras que Ey obtuvo una pequeña ventaja con el caldo lactosado.

Kuchhoft (19), estudiando un medio "buffer" con 2 % de bilis y pH 7,6-7,8, encontró que era muy bueno en cuanto a selectividad pero pobre en sensibilidad.

Gettrust y Hostettler (20), en 1930 y 1931, efectuaron un ensayo comparativo

entre un caldo lactosado con bilis y el lactosado standard, en leando aguas de cinco plantas de purificación, y llegaron a la conclusión de que el caldo lactosado con bilis era más sensible y selectivo, ya que daba un porcentaje mayor de tubos positivos confirmados y muy pocos tubos falsos positivos.

Poe (21), en 1938, estableció que la mejor concentración de bilis para el crecimiento de las bacterias del grupo coli-aerogenes es alrededor de 6-7 % y recomendó el pH 7. Además observó que la clase de la bilis empleada no tenía influencia alguna.

El caldo de Mac Conkey (22) interesa especialmente por ser el medio de enriquecimiento con bilis más antiguo, y el más empleado en el examen sanitario del agua, ya que es el medio que se usa en el Método del Ministerio Británico de Salud y en el de Wilson, actualmente muy difundido gracias a sus múltiples ventajas.

La fórmula original de dicho caldo, data del año 1908 y es la siguiente:

Taurocolato de sodio .....	5 g.
Glucosa .....	5 g.
Peptona .....	20 g.
Agua .....	1.000 ml.
Ternasol (solución).	

Más tarde el Metropolitan Water Board substituyó la glucosa por lactosa porque la primera es fermentada por un gran número de microorganismos cuya presencia en el agua no indica contaminación. La fórmula establecida fué la siguiente:

Taurocolato de sodio .....	5 g.
Lactosa .....	10 g.
Peptona .....	20 g.
Agua .....	900 ml.
Ternasol (sol. al 0,5 %) ...	100 ml.

Savage (23) había propuesto substituir el ternasol por el rojo neutro, no sólo porque es un indicador más satisfactorio de la fermentación ácida, sino también porque muchos organismos coliformes producen una fluorescencia típica en un medio con lactosa o glucosa que lo contenga. Esta modificación fué aceptada por el Ministerio Británico de Salud, el cual en Report n° 71 recomendó la fórmula:

Taurocolato de sodio .....	5 g.
Lactosa .....	10 g.
Peptona .....	20 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Agua destilada .....	1.000 ml.
Sol. rojo neutro al 1 % ....	10 ml.

Esta es la fórmula que actualmente se emplea, ajustada a pH 7,4 y pudiéndose sustituir el tamocoato de sodio comercial por Bacto oxgall "Difco".

Las dos propiedades fundamentales que deben tenerse en cuenta para juzgar un medio de enriquecimiento para análisis de agua, son sensibilidad y selectividad. El medio ideal sería aquel que, revelando la presencia de todas las bacterias del grupo coli aerogenes existentes en la cantidad de agua sembrada, impida el desarrollo de cualquier otro microorganismo que fermenta la lactosa.

El medio reconocido como más sensible es el caldo lactosado, por lo cual suele tomarse como base en trabajos comparativos para apreciar el valor de los demás, pero su sensibilidad no es total, sobre todo cuando se trabaja con aguas que contienen microorganismos que pueden impedir el desarrollo de las bacterias del grupo coli-aerogenes o, provocar la muerte de las mismas antes de que produzcan gas. Uno de estos casos posibles de interferencia es el estudiado por Norton y Barnes (24), que observaron que el *C. welchii* cuando se encuentra en caldo lactosado junto con *B. coli*, causa una rápida producción de ácido y gas. Y cuando la acidez alcanza un pH de 4,2-4,3 en 24 horas el reconocimiento del *B. coli* es incierto, pues no soporta esa acidez al cabo de las 48 horas de incubación.

Varios trabajos comparativos entre el caldo lactosado y el de Mac Conkey se han realizado en distintos países y las conclusiones a que permitieron llegar los mismos no son en general concordantes.

Raghavachari y Seetharama Iyer (25), empleando la fórmula del caldo de Mac Conkey adoptada por Clemesha, y trabajando con aguas de ríos, de galerías de infiltración, de lagos, y con aguas filtradas y cloradas, obtuvieron los resultados indicados a continuación:

Nº de muestras	Caldo de Mac Conkey		Caldo lactosado	
	Tubos presuntivos +	Confirmados y %	Tubos presuntivos +	Confirmados y %
86	67	67 100	74	60 81

en base a los cuales y a otras determinaciones, afirmaron que el caldo de Mac Conkey es el medio de elección en la rutina de la bacteriología de aguas por: 1) es muy sensible y selectivo en su acción; 2) estimula el crecimiento de las formas coli-aerógenas, particularmente de las primeras en las 24 horas iniciales; 3) permite un conocimiento seguro de la contaminación 24 horas después de sembrada la muestra y sin necesidad de una confirmación posterior; 4) se ha encontrado que revela la presencia del *E. coli* en el 85 % de los tubos presuntivos positivos en 24 horas mientras que el caldo lactosado sólo lo hace en un 71 %.

Farrel (26), trabajando con cultivos puros de bacterias del grupo coli-aerógenas y con diluciones muy altas, estableció que el caldo de Mac Conkey inhibe el desarrollo de un 15 % de las bacterias nombradas, comparándolo con el caldo lactosado.

Medio de cultivo.	Total de tubos +	% con respecto al caldo lactosado
Caldo lactosado estándar	170	100
Caldo de Mac Conkey preparado de acuerdo a la fórmula original de 1902.	145	85

Además observó que no existe diferencia cuando el número de microorganismos presentes es mayor de 4 por ml. También estudió el poder inhibitor del caldo de Mac Conkey para los esporulados que a menudo son responsables de la producción de gas, para lo cual empleó cultivos puros de varios aerobios y anaerobios y obtuvo los siguientes datos:

Medio de cultivo.	Tubos positivos		% con respecto al caldo lactosado	
	anaerobios	aerobios	anaerobios	aerobios
Caldo lactosado.-	51	56	100	100
Caldo de Mac Conkey.-	10	0	32,2	0

Atkinson y Wood (27), en Australia, basándose en el siguiente estudio sobre 54 muestras de aguas no tratadas

Medio de Cultivo	Nº de tubos +	Nº de tubos confirmados
Caldo lactosado standard.	305	247
Caldo de Mac Conkey.-	216	174

Diferencia 42 %

calificaron al caldo de Mac Conkey como un medio poco sensible para el grupo de las bacterias coliformes y que da un número elevado de tubos falsos positivos.

Mac Crady (28), publicó los siguientes datos de una comparación experimental efectuada con aguas de New York, Toronto, Maryland y Quebec.

Nº de muestras	Caldo de Mac Conkey		Caldo Lactosado	
	Tubos +	Confirmados y %	Tubos +	Confirmados y %
221	851	631 74,1	1.070	645 60,1

(El número de tubos positivos y confirmados sólo es 1,9 % menor en el caldo de Mac Conkey).

El autor llegó a la conclusión que el juzgar un tubo positivo sólo por la aparición de gas dentro de las 48 horas no es correcto, porque el caldo de Mac Conkey da un gran número de tubos falsos positivos.

Ferramola (29), comparando el método americano "standard" con el de Wilson, con aguas profundas y superficiales sin tratamiento y cloradas obtuvo los datos finales que siguen:

Nº de muestras	Caldo lactosado		Caldo de Mac Conkey	
	Tubos +	Confirmados y %	Tubos +	Confirmados y %
499	1258	556 29	423	375 88

La diferencia a favor del caldo de Mac Conkey en tubos positivos y confirmados es de 4,55 %.

Alrededor del 80 % de los tubos falsos positivos debíanse a bacterias coliformes que no fermentaban lactosa en las placas de eosina-azul de metileno dentro de las 24 horas. El autor consideró probable que dichos organismos fueran en realidad bacterias coliformes cuya propiedad de fermentar la lactosa hubiera sido modificada por las condiciones no favorables del transporte o por la acción del cloro en los provenientes de aguas cloradas. Según comunicación personal, el examen microscópico de estas colonias atípicas en agar eosina azul de metileno, correspondía a bacterias Gram negativas morfológicamente iguales al *B. coli* y que fermentaban lactosa tardíamente (48 - 96 horas).

De los cinco trabajos mencionados el de Raghavachari y Seetharama Iyer y el de Ferramola dieron resultados favorables para el caldo de Mac Conkey, pero los tres restantes lo critican por falta de sensibilidad o de selectividad. Es necesario tener en cuenta que los cinco estudios se efectuaron en distintas condiciones, ya que en unos se hizo con cultivos puros de bacterias coliformes y en otros, con aguas de diferentes tipos y lugares más variados de extracción.

## P A R T E   E X P E R I M E N T A L

### Introducción

En el presente trabajo se ha tratado de mejorar el caldo de MacConkey, aumentando la sensibilidad del mismo para las bacterias coliformes, la cual no es tan pronunciada como la del caldo lactosado, según algunos autores ya citados; y agudizando su selectividad, con el objeto de disminuir el porcentaje de tubos falsos positivos.

Para ello se ha ensayado variar el pH del medio, agregarle fosfatos, sustituir la peptona por triptona y probar la influencia de las distintas marcas de peptona.

Varios son los autores que se han referido a uno u otro de los factores citados.

Thompson (30), en 1927, recomendó dar poder regulador al caldo lactosado mediante el agregado de 2 gramos de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  por litro, para eliminar los fermentadores falsos de lactosa.

Jenzig y Montak (31), en 1928, disminuyeron en un 47 % la cantidad de ensayos falsos positivos aumentando el pH del caldo lactosado de 6,8 a 8,0.

Ruchhoft, Hollis y Ben Chinn (32), en 1951, observaron que los cultivos del grupo coli-aerogenus en caldo lactosado al cabo de 48 horas de incubación a 37° C., alcanzan un pH de 4,7 - 4,6 término medio; que no hay un desarrollo suficiente de las bacterias coliformes en caldo lactosado con pH = 4,8 como para que se produzca gas en 48 horas de incubación a 37° C. y que algunas cepas mueren en estas condiciones. Trabajando con caldo lactosado con concentraciones variadas de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , llegaron a la conclusión de que es evidente que la acción reguladora del fosfato acelera el crecimiento de las bacterias coliformes y también la producción de gas, lo cual facilita los métodos de rutina para análisis bacteriológico de aguas.

Clark (33), en 1951, hizo ensayos paralelos con 114 muestras usando caldo lactosado de pH 6,8 y 8,1 y observó que no había diferencia apreciable en el número de tubos falsos positivos, pero que el caldo con pH 8,1 daba 11 % menos de tubos positivos y confirmados. (Ensayó 4 muestras menos que en el caldo con pH 6,8).

Cisneros (34), en 1956, dedujo que se pueden alcanzar las condiciones óptimas de desarrollo del b. coli y de fermentación de la lactosa, agregando al medio una cantidad apropiada de tampón de fosfatos de potasio de pH 6,8.

Darby y Mallama (35), en 1959, encontraron que: a) el caldo lactosado con Bacto-triptosa es superior al caldo lactosado con Bacto-peptona para el desarrollo de S. coli; b) la concentración de 2 % de Bacto-triptosa da la mayor velocidad de reproducción durante el comienzo de la fase logarítmica de crecimiento; c) la adición de una mezcla "buffer" de fosfatos causa un desarrollo mucho más rápido en la parte final de la fase logarítmica de crecimiento y algo más rápido también durante el período estacionario inicial, que un medio sin sustancias reguladoras del pH; d) la velocidad de crecimiento durante la fase estacionaria inicial es mayor en un pH 6,8.

Ferramola (36), observó que el agregado de fosfatos a las muestras de agua prolongaba la supervivencia de las bacterias coliformes en las mismas, y que ese hecho no se debía a la acción "buffer" de los fosfatos sino que era una propiedad específica del ión fosfato.

- I -

A) ENSAYO DE SUSTITUCION DE LA TRIPTONA POR TRIPTONA, DISMINUCION DEL pH Y AGREGADO DE FOSFATOS EN EL CALDO DE MAL CONKEY. SELECCION DEL MEDIO MAS SENSIBLE.-

Las pruebas se efectuaron con cultivos puros de Escherichia coli y Aerobacter aerogenes aisladas de muestras de aguas llegadas al Laboratorio de C.S.N.- Las características de estas cepas se indican en el cuadro nº 1. Las suspensiones de bacterias fueron preparadas a partir de cultivos en agar inclinado de 24 horas, a los cuales se les agregó agua estéril y agitó suavemente. De estas suspensiones se hicieron diluciones sucesivas al décimo, en agua estéril (+), hasta llegar a una concentración mínima

(+) Agua de consumo de la ciudad de Buenos Aires.-

Cuadro N° 1.-

algunas características de las cepas de *E. coli* y *A. aerogenes* empleadas.-

	<i>E. coli</i>	<i>A. aerogenes</i>
Almidón	—	AG
Arabinosa	AG	AG
Dulcitol	—	AG
Eritritol	—	—
Galactosa	AG	AG
Glucosa	AG	AG
Inositol	—	AG
Inulina	—	—
Isodulcitol	AG	AG
Lactosa	AG	AG
Levulosa	AG	AG
Maltosa	AG	AG
Manitol	AG	AG
Manosa	AG	AG
Rafinosa	AG	AG
Sacarosa	AG	AG
Salicilato	—	AG
Sorbitol	AG	AG
Xilosa	AG	AG
SH <sub>2</sub> (agua de peptona)	+	+
Indol	+	—
Rojo metilo	+	—
Citrato (Koser)	—	+
44° C. (Mac Conkey)	+	—
Voges Proskauer	—	+
Gelatina	—	—

AG: fermenta el azúcar con formación de ácido y gas.

Ag: fermenta el azúcar con formación de ácido y poco gas.

Considerando solamente los datos de la clasificación de Wilson las bacterias en leg-  
das son: *E. coli* fecal tipo I y *A. aerogenes* tipo I.-

(1-3 bacterias por ml.). La cantidad de bacterias presentes se conoció colocando 1 ml. de cada dilución en placas de Petri esterilizadas, agregando agar sobrefundido, dejándolas solidificar, incubando 24 horas a 37° C. y haciendo recuento de colonias.

Mientras tanto (24 horas) las suspensiones fueron mantenidas en la cámara -- fría (2-4° C.) hasta el momento de ser usadas.

1.- Influencia de la substitución de peptona por triptona.— Esta modificación fue basada en el trabajo de Darby y Hallmann, ya citado, en el cual los autores observaron que el *B. coli* desarrolla más rápidamente en el caldo lactosado con "Bacto-triptona" que con "Bacto-peptona" y que la concentración óptima de "Bacto-triptona" es de 2 %.

La prueba se efectuó sembrando 1 ml. de las suspensiones de *E. coli* y *A. aerogenes*, preparadas según se indicó, en una serie de tubos conteniendo los medios en estudio. Todos los datos se detallan en el cuadro n° 2.-

Cuadro n° 2.

Resultados del estudio comparativo del desarrollo de *E. coli* y *A. aerogenes* en el medio de Mac Conkey y en el mismo, en el cual se ha substituido la peptona por triptona. Incubación: 48 horas a 37° C. Cantidad de medio por tubo: 5 ml.-

MEDIO de CULTIVO	N° de bacterias sembradas	N° de tubos sembrados		N° de tubos positivos		
		<i>E. coli</i>	<i>A. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. aerogenes</i>	Total
Mac Conkey	5	40	45	34	40	74
	1 - 2	80	70	20	11	31
	Totales	120	115	54	51	105
Mac Conkey Triptona	5	40	45	36	38	74
	1 - 2	80	70	22	10	32
	Totales	120	115	58	48	106

2.- Influencia del pH.- Este estudio está fundamentado en el de Clark que encontró una leve ventaja para un caldo lactosado con pH 6,8 sobre otro con pH 8,1, y el de Cianci que recomendó para el B. coli un caldo con fosfatos y pH 6,8 como ya se comentó. El ensayo se realizó de la misma manera que el anterior y se detalla en el cuadro n° 3.-

Cuadro n° 3

Resultados del estudio comparativo del desarrollo de E. coli y A. aerogenes en el medio de Mac Conkey y el mismo en el cual se ha disminuido el pH a 6,8.- Incubación: 48 horas a 37° C.- Cantidad de medio por tubo: 5 ml.-

MEDIO de CULTIVO	N° de bacterias sembradas	N° de tubos sembrados		N° de tubos positivos		
		E.coli	A.aerogenes	E.coli	A.aerogenes	Total
Mac Conkey (pH:7,4)	5	55	25	48	17	65
	1 - 3	50	60	15	10	25
	Totales	105	85	63	27	90
Mac Conkey (pH:6,8)	5	55	25	44	20	64
	1 - 3	50	60	6	10	16
	Totales	105	85	50	30	80

3.- Influencia del agregado de fosfatos.- Como ya se ha comentado, Thompson, Kuchholt, Kallas y Ben Chinn, Cianci y Darby y Kallmann, son partidarios de medios a los cuales se les ha dado poder regulador mediante el agregado de fosfatos. Por tal motivo en este trabajo se ensayó el agregado de fosfatos al medio de Mac Conkey y se experimentó trabajando de la misma manera que en las determinaciones anteriores.-

Cuadro nº 4

Resultados del estudio comparativo del desarrollo de E. coli y A. serogenes en el medio de Mac Conkey, y en el mismo al cual se ha agregado una mezcla de fosfatos de potasio.- Incubación: 48 horas a 37° C.- Cantidad de medio por tubo: 5 ml.-

MEDIO de CULTIVO	Nº de bacterias sembradas	Nº de tubos sembrados		Nº de tubos positivos		
		E.coli	A.sero genes	E.coli	A.sero genes	Total
Mac Conkey	5	30	30	27	22	49
	1 - 2	50	60	20	11	31
	Totales	80	90	47	33	80
Mac Conkey fosfatos	5	30	30	23	28	51
	1 - 2	50	60	17	12	29
	Totales	80	90	40	40	80

4.- Ensayo de las combinaciones posibles de las modificaciones efectuadas con triptona, pH y fosfatos.- Dado el poco éxito obtenido con las modificaciones anteriores - se ensayó combinar las mismas y trabajando en condiciones semejantes se obtuvieron los resultados detallados en el cuadro nº 5.-

Cuadro nº 5

Resultados del estudio comparativo del desarrollo de E. coli y A. serogenes en los medios citados más abajo. Incubación 48 horas a 37° C.- Cantidad de medio por tubo: 5 ml.

MEDIO de CULTIVO.-	Nº de bacterias sembradas	Nº de tubos sembrados		Nº de tubos positivos		
		E.coli	A.sero genes	E.coli	A.sero genes	Total
Mac Conkey	5	40	30	36	26	62
	1 - 2	50	50	14	6	20
	Totales	90	80	50	32	82
Mac Conkey triptona (pH:6,8)	5	40	30	34	26	60
	1 - 2	50	50	14	10	24
	Totales	90	80	48	36	84
Mac Conkey triptona - fosfatos (pH:7,4)	5	40	30	28	25	53
	1 - 2	50	50	13	5	18
	Totales	90	80	41	30	71
Mac Conkey triptona fosfatos (pH:6,8)	5	40	30	36	28	64
	1 - 2	50	50	17	17	34
	Totales	90	80	53	45	98
Mac Conkey fosfatos (pH:6,8)	5	40	30	36	27	63
	1 - 2	50	50	17	16	33
	Totales	90	80	53	43	96

5.- Nuevo ensayo comparativo entre el caldo de Mac Conkey, el de Mac Conkey - fosfatos - (pH:6,8) y el de Mac Conkey - triptona - fosfatos - (pH:6,8).- Este ensayo se hizo con el mayor número de tubos para poder decidir sobre el medio más sensible. Se operó en la misma forma que en los ensayos anteriores.-

Cuadro N° 6

Resultados del estudio comparativo del desarrollo de E. coli y A. aerogenes en el caldo de Mac Conkey, el de Mac Conkey - fosfatos - (pH:6,8) y el de Mac Conkey - triptona - fosfatos - (pH:6,8).- Incubación: 48 horas a 37° C.- Cantidad de medio por tubo: 5 ml.-

MEDIO de CULTIVO	N° de bacterias sembradas	N° de tubos sembrados		N° de tubos positivos		
		E.coli	A.aerogenes	E.coli	A.aerogenes	Total
Mac Conkey	1 - 3	90	70	64	46	110
Mac Conkey fosfatos (pH:6,8)	1 - 3	90	70	68	58	126
Mac Conkey triptona fosfatos (pH:6,8)	1 - 3	90	70	67	55	122

Existe poca diferencia entre los dos medios con fosfatos pero se eligió para continuar el estudio, el medio con peptona por ser ésta una sustancia más empleada y de precio inferior a la triptona.-

6.- Influencia de las distintas marcas de peptona en el medio seleccionado (Mac Conkey - fosfatos - pH:6,8).- Siendo varias las marcas de peptona, se pensó que quizá existiera alguna diferencia entre el mismo medio preparado con distintas peptonas por lo cual se efectuó la prueba detallada en el cuadro n° 7.-

La técnica seguida fue la misma que en los ensayos anteriores.-

Cuadro n.º 7

Resultados del estudio comparativo del desarrollo de *E. coli* y *A. aerogenes* en el medio de MacConkey - fosfatos - (pH:6,8) ensayando distintas marcas de peptona.- Incubación: 48 horas a 37° C.- Cantidad de medio por tubo: 5 ml.-

MARCA de PEPTONA	Nº de bacterias sembradas	Nº de tubos sembrados		Nº de tubos positivos		
		<i>E. coli</i>	<i>A. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. aerogenes</i>	Total
"Merke Davis"	4	60	30	48	25	73
	1 - 2	40	20	12	11	23
	Totales	100	60	60	36	96
"Facto- leptona" "Difco"	4	60	30	44	25	69
	1 - 2	40	20	11	11	22
	Totales	100	60	55	36	91
"Sitta".	4	60	30	43	24	67
	1 - 2	40	20	10	10	20
	Totales	100	60	53	34	87
"Colle- mann y Bell".	4	60	30	45	22	67
	1 - 2	40	20	12	11	23
	Totales	100	60	57	33	90

**B) ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI Y A. AEROGENES EN EL CALDO DE MAC CONKEY Y EN EL MODIFICADO.-**

El estudio comparativo del crecimiento de las bacterias coliformes en el caldo de Mac Conkey y en el modificado fué efectuado debido a la gran importancia práctica que encierra.

Ya que la apreciación de un tubo positivo se hace por la cantidad de gas que queda aprisionado dentro del tubito de fermentación, un medio será tanto mejor cuanto más valoz sea el crecimiento de las bacterias coliformes en él, y mayor la producción de gas. Al mismo tiempo, debe tener un poder regulador suficiente para evitar un rápido y pronunciado descenso del pH y por consiguiente, el peligro de que mueran o no desarrollen normalmente las bacterias coliformes. Dicho estudio se divide en tres partes.

1) Velocidad de desarrollo.- Para cada bacteria (E.coli y A.aerogenes) se trabajó de la manera indicada a continuación:

Se sembró 1 ml. de una suspensión en agua estéril de la bacteria en estudio, en 4 erlenmeyer conteniendo cada uno 100 ml. de caldo Mac Conkey y en otros cuatro con la misma cantidad del medio de Mac Conkey modificado. De cada erlenmeyer se extrajo 1 ml. del cultivo a las 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas de incubación a 37° C.; se juntaron por separado las porciones de una misma hora de cada serie de erlenmeyer, se agitaron suavemente, se hicieron las diluciones necesarias en agua estéril, y, a partir de estas diluciones o directamente del caldo (a las 2, 4 y 6 horas), se hizo recuento de colonias en placas de Petri que se sembraron en agar común por duplicado, después de 24 horas de incubación a 37° C.-

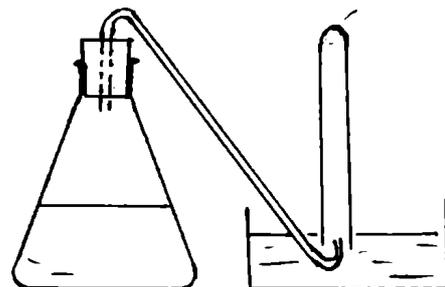
Cuadro nº 8

Estudio de la velocidad de desarrollo de E.coli y A.aerogenes en el medio de Mac Conkey y en el de Mac Conkey modificado.- Cantidad inicial de bacterias: 50 en 100 ml. de medio.-

Tiempo de incubación (37° C.)	Número de E.coli por ml.		Número de A.aerogenes por ml.	
	Mac Conkey	Mac Conkey modificado	Mac Conkey	Mac Conkey modificado
2 horas.	6,5	6,5	0,5	0,5
4 horas.	16	17	4,5	5
6 horas.	500	550	210	270
8 horas.	30.000	35.000	6.500	7.000
24 horas.	550.000.000	710.000.000	450.000.000	450.000.000
48 horas.	590.000.000	400.000.000	850.000.000	910.000.000

2.- Producción de gas.- La producción de gas se comparó recogiendo el mismo dentro de un tubo de ensayo de 2 cm. de diámetro, lleno de agua y sumergido boca abajo en agua, según muestra el esquema.

Se aplicó a las 8 horas de incubación un dispositivo semejante a cada uno de los erlenmeyer sembrados para el ensayo anterior y se midió la altura de gas en los tubos colectores tomando como dato el promedio de las lecturas.-



Cuadro n.º 9

Estudio de la producción de gas por *E. coli* y *A. aerogenes* en el medio de Mac Conkey y en el modificado.-

Tiempo de incubación	Altura de gas en cm.			
	<i>E. coli</i>		<i>A. aerogenes</i>	
	Mac Conkey	Mac Conkey modificado	Mac Conkey	Mac Conkey modificado
24 horas iniciales	15,5	16,0	7	9,5
24 horas siguientes	7,5	7,5	13,5	11,5
Total	23,0	23,5	20,5	21,0

3.- Variación del pH.- Además de conocer el pH producido por las bacterias coliformes al cabo de 24 y 48 horas de incubación, interesaba decidir si la mayor sensibilidad del medio de Mac Conkey modificado se debía a la acción reguladora de los fosfatos o simplemente a una propiedad específica del ión fosfato.

Con tal objeto se determinó el pH de los cultivos potenciométricamente y empleando electrodo de vidrio.

Para averiguar el pH al cabo de las 24 primeras horas de incubación a 37° C. se empleó el líquido proveniente de los erlenmeyer<sup>de</sup> conteniendo la misma cantidad de medio y sembrados con el mismo número de bacterias que en las determinaciones de velocidad de desarrollo y producción de gas; y para conocer el pH al cabo de las 48 horas de incubación a 37° C., se usó los cultivos de los ensayos de velocidad de crecimiento y producción de gas.

Los datos obtenidos se detallan en el cuadro n.º 10.-

Cuadro nº 10

Estudio del pH producido por E.coli y A.aerogenes en el medio de Mac Conkey y en el -  
modificado, al cabo de 24 y 48 horas de incubación a 37° C.-

Tiempo de incubación	pH del cultivo			
	E. coli		A. aerogenes	
	Mac Conkey	Mac Conkey modificado	Mac Conkey	Mac Conkey modificado
24 horas	5,2	5,3	5,6	5,6
48 horas	5,2	5,25	5,3	5,3

- II -

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SENSIBILIDAD DEL CALDO MAC CONKEY MODIFICADO CON LA DEL CALDO BACTERIAL STANDARD.-

Como ya se comentó en la introducción del trabajo, el caldo lactosado es considerado el medio de mayor sensibilidad para las bacterias coliformes, sobre todo cuando se trabaja con cultivos puros. Por ello, y por ser el medio de enriquecimiento empleado en el método de la Asociación Americana de Salud Pública, es que se ha comparado - con él el medio de Mac Conkey modificado a fin de estudiar la sensibilidad del mismo.

Se trabajó siguiendo la misma técnica que en todos los ensayos de la parte - I - A y se obtuvieron los resultados que se detallan en el cuadro nº 11.-

Cuadro nº 11

Resultados del estudio comparativo de la sensibilidad del caldo de Mac Conkey modificado con la del caldo lactosado "standard".- Incubación: 48 horas a 37° C.- Cantidad de medio por tubo: 5 ml.-

MEDIO de CULTIVO	Nº de bacterias sembradas	Nº de tubos sembrados		Nº de tubos positivos			% de tubos positivos con respecto al caldo lactosado
		E.coli	A.aero. genes	E.coli	A.aero. genes	Total	
Mac Conkey modificado	4 1 - 2	90	90	75	74	149	
		45	45	23	25	48	
	Totales	135	135	98	99	197	98
Caldo lactosado "standard"	4 1 - 2	90	90	77	71	148	
		45	45	26	27	53	
	Totales	135	135	103	98	201	100

Se observó una mayor producción de gas en el caldo de Mac Conkey modificado a las 24 y 48 horas de incubación a 37° C.-

- III -

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL MEDIO DE MAC CONKEY Y EL MEDIO DE MAC CONKEY MODIFICADO EN EL EXAMEN DE AGUAS NATURALES Y PURIFICADAS.-

La mejor prueba para juzgar un medio de enriquecimiento para análisis bacteriológico del agua es emplearlo directamente frente a aguas de distintos tipos y procedencia. Por ello es que, a pesar de que el medio de Mac Conkey modificado ha demostrado ser superior al Mac Conkey frente a cultivos puros de E. coli y A. aerogenes, - se ha hecho una comparación entre ambos, usando a tal efecto muestras de aguas profundas y superficiales, cloradas y no cloradas, de distintos sitios del país (ver mapa). Dichas muestras fueron enviadas al laboratorio en frascos esterilizados de 250 ml. - con tapa de vidrio esmerilado y rodillos de hielo. En general llegaron al laboratorio y fueron sembradas dentro de las 24 horas siguientes a la de extracción. Se aplicó para el estudio el método de Wilson que es el seguido por los Laboratorios de Obras Sanitarias de la Nación (ver apéndice). Cada tubo positivo a 37° C. en cada uno de los medios se confirmó pasando un asa del mismo a una placa con agar eosina azul de metileno, incubando hasta 48 horas a 37° C. y observando la presencia de colonias típicas -



- REPUBLICA ARGENTINA -

Islas Malvinas

cas. Se consideró no confirmado, por la ausencia de colonias características de *E. coli* y *A. aerogenes* en este medio, aunque es probable que la ausencia de colonias típicas en agar eosina azul de metileno no signifique necesariamente falta de bacterias coliformes, pero se ha adoptado este temperamento a fin de ajustarse a las normas de la Asociación Americana de Salud Pública de E.E.UU.

Se analizaron en total 635 muestras y los resultados obtenidos se detallan en los cuadros Nos. 12, 13, 14 y 15.-

Cuadro n.º 12

Datos comparativos del número de muestras positivas en uno y otro medio.-

Clases de aguas.	N.º de muestras	Muestras positivas en los dos medios	Muestras positivas sólo en Mac Conkey modificado	Muestras positivas sólo en Mac Conkey
Profundas	114	22	10	6
Profundas cloradas	131	12	5	5
Superficiales	153	133	11	1
Superficiales cloradas	237	19	9	6
Totales	635	106	35	18

Total de muestras positivas en el caldo Mac Conkey modificado: 219  
 Total de muestras positivas en el caldo de Mac Conkey: 204  
 Diferencia % en favor del caldo de Mac Conkey modificado: 7,35

Las muestras que dieron positivas en un medio y no en el otro correspondían a aguas que tenían el límite mínimo de contaminación (1 tubo de 10 ml. positivo).-

Datos comparativos del número de tubos positivos en el medio de Mac Conkey y en el modificado

Clases de aguas.	Nº de muestras	Caldo de Mac Conkey						Caldo de Mac Conkey modificado					
		Nº de tubos positivos			Nº de tubos no confirmados			Nº de tubos positivos			Nº de tubos no confirmados		
		24 h.	48 h.	Total	24 h.	48 h.	Total	24 h.	48 h.	Total	24 h.	48 h.	Total
Profundas	114	26	87	113	-	17	17	32	105	137	-	10	10
Profundas cloradas.	131	11	20	31	-	2	2	13	31	44	-	9	9
Superficiales	153	216	133	351	3	13	16	257	145	402	2	3	5
Superficiales cloradas	237	21	50	71	-	14	14	20	50	70	-	10	10
Totales.	635	274	292	566	3	46	49	322	331	653	2	32	34

La diferencia de tubos positivos a favor del caldo de Mac Conkey modificado es de 15,37 %.-  
 El porcentaje de falsos positivos en el caldo de Mac Conkey es: 8,65 %  
 El porcentaje de falsos positivos en el caldo de Mac Conkey modificado es: 5,37 %

De los falsos positivos en Mac Conkey un 70 % correspondía a cocobacilo Gram negativos que fermentaban lentamente la lactosa y el 30 % restante eran esporulados Gram positivos aerobios y anaerobios.  
 De los falsos positivos en Mac Conkey modificado el 100 % eran fermentadores lentos, morfológicamente iguales a las bacterias coliformes.-

Con el objeto de determinar si el caldo Mac Conkey modificado es superior análogamente al original en la prueba de incubación a 44°C. destinada a evidenciar la presencia de B. coli fecal, se realizó esta prueba con caldo Mac Conkey original y modificado y con material proveniente de los tubos positivos a 37°C. en Mac Conkey original y modificado.-

C u e d r o N.º 14

Prueba de 44°C.

Clases de Aguas.	Tubos + a 37°C. en caldo de Mac Conkey modificado (655 tubos)			Tubos + a 44°C. en caldo de Mac Conkey (566)				
	24 horas (222)		48 horas (111)	24 horas (274)		48 horas (292)		
	Tubos + a 44°C. en caldo de Mac Conkey modificado	Totales	Tubos + a 44°C. en caldo de Mac Conkey	Totales	Tubos + a 44°C. en caldo de Mac Conkey	Totales		
	24h. 48h. Total	24h. 48h. Total	24h. 48h. Total	24h. 48h. Total	24h. 48h. Total	24h. 48h. Total		
Profundas	12 1 13	4 10 14	27	9 4 13	3 8 11	24 11 35	6 5 11	25
Profundas cloradas.	10 - 10	- 2 2	12	7 1 8	- - -	8 7 15	1 2 3	11
Superficiales	104 45 227	35 5 40	267	177 43 220	52 7 59	155 48 203	42 9 51	254
Superficiales cloradas.	14 3 17	6 - 6	23	14 3 17	6 - 6	10 4 14	5 1 6	20
Totales	220 47 267	45 17 62	329	207 51 258	41 15 56	183 56 239	54 17 71	310

El medio modificado aprecia un 4.42% más de B. coli que el Mac Conkey en la prueba a 44°C. Estos datos también indican que en el nuevo medio desarrollo a 37°C. un 1.61% más de B. coli.-

Como dato complementario y a los efectos de establecer el comportamiento del medio de cultivo frente al nuevo medio se efectuaron los pases correspondientes de los tubos positivos en Mac Conkey (378 C.) y en Mac Conkey modificado (379 C.).— Los resultados obtenidos se consignan en el cuadro n.º 15.—

C u a d r o N.º 15

Clases de Aguas.	Tubos positivos a 37½ C. en caldo de Mac Conkey modificado (653 tubos)						Tubos positivos a 37½ C. en caldo de Mac Conkey (566 tubos)						
	24 horas (322)			48 horas (331)			24 horas (274)			48 horas (292)			Totales
	Tubos + en medio de Koser a 37½ C.						Tubos + en medio de Koser a 37½ C.						
	24 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.	Totales
Profundas	52	-	-	96	3	-	29	-	-	65	3	-	109
Profundas coloradas.	12	1	-	28	1	-	7	1	1	24	3	-	36
Superficiales	229	13	3	121	11	10	168	31	3	120	15	4	341
Superficiales coloradas	21	1	-	35	1	-	16	2	1	27	1	3	50
<b>Totales</b>	<b>294</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>280</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>220</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>236</b>	<b>24</b>	<b>7</b>	<b>536</b>

## DISCUSION

Cuando la peptona se substituye por triptona en el caldo lactosado "standard" aumenta la velocidad de desarrollo de *E. coli* en dicho medio, según lo indican Darby y Hallmann (35). La misma substitución aplicada al caldo de Mac Conkey no ha demostrado mejorar notoriamente su sensibilidad para las bacterias coliformes.

En efecto, según se desprende de los resultados consignados en el cuadro N° 2, el número de tubos positivos en ambos medios es prácticamente el mismo. Las diferencias obtenidas son tan reducidas que deben atribuirse a variaciones experimentales. Estos resultados no significan necesariamente que la substitución de peptona por triptona carezca de acción en lo que se refiere a velocidad de desarrollo, pero siendo el objetivo principal de este trabajo la obtención de un medio más sensible para las bacterias coliformes, esta propiedad (velocidad de desarrollo) tiene una importancia secundaria en este caso.

La disminución del pH de 7,4 a 6,8 en el caldo de Mac Conkey no dió resultado favorable como lo demuestra la pérdida de más de un 10 % de sensibilidad (cuadro n° 3). Tampoco el agregado de fosfatos al caldo de Mac Conkey mejoró la sensibilidad del mismo para demostrar la presencia de las bacterias coliformes.

Pero si bien es cierto que ni la disminución del pH a 6,8 ni el agregado de fosfatos, por separado, mejoraron al caldo de Mac Conkey, ambas modificaciones combinadas dieron al mismo un aumento de sensibilidad notable cuando se probó frente a cultivos puros y a un gran número de muestras de aguas.

Este resultado está de acuerdo con el trabajo de Cianci (34) que recomendó para las bacterias coliformes un medio con fosfatos y pH 6,8 y, con el de Darby y Hallmann (35) que encontraron que el mejor caldo lactosado era aquel con triptona, fosfatos y pH 6,8.

El mismo medio con triptona en lugar de peptona también resultó ser más sensible que el caldo de Mac Conkey, pero se continuó el estudio con el medio con peptona por los motivos ya indicados (precio y facilidad para conseguirla).

La velocidad de crecimiento, la producción de gas y la disminución del pH del medio son tres fenómenos estrechamente vinculados. Así lo han confirmado las experiencias hechas al respecto. El desarrollo es ligeramente más rápido en el medio modificado tanto para *E. coli* como para *A. aerogenes*.

La producción de gas por *E. coli* es más rápida que por *A. aerogenes* en ambos medios. Al cabo de 48 horas de incubación la cantidad de gas producida, tanto por *E. coli* como por *A. aerogenes*, es ligeramente mayor en el medio de Mac Conkey modificado.

El pH disminuye en forma más pronunciada y veloz en los medios sembrados con *E. coli* lo cual concuerda con el comportamiento de estos organismos en otros medios similares (caldo glucosado con fosfato).

Al cabo de 48 horas de incubación a 37° C., el pH en ambos medios es prácticamente igual. Ello indica que la mayor sensibilidad del medio de Mac Conkey modificado, no se debe a la acción reguladora de la mesala de fosfatos agregada, sino a una propiedad específica de las mianca, lo cual confirma lo observado por Ferranola acerca de una mayor supervivencia de las bacterias coliformes en aguas ricas en ión fosfato.

Es interesante hacer notar la concordancia que existe entre los datos obtenidos por Farrel (26) y los de este trabajo. Farrel comparando el caldo lactosado standard con el de Mac Conkey, frente a cultivos puros de bacterias coliformes, llegó a la conclusión de que la sensibilidad del caldo de Mac Conkey es un 15 % inferior que la del lactosado "standard".

En el estudio comparativo entre el caldo de Mac Conkey y el modificado frente a cultivos puros de bacterias coliformes se obtuvo una ventaja de 14,5 % en sensibilidad a favor del medio modificado. Y en la prueba entre el caldo lactosado "standard" y el medio de Mac Conkey modificado, también frente a cultivos puros de bacterias coliformes, se encontró que la sensibilidad del nuevo medio sólo era un 2 % inferior a la del caldo lactosado "standard".

Los resultados obtenidos en el estudio comparativo entre el caldo de Mac Conkey y el de Mac Conkey modificado con aguas de distintas clases, son la mejor prueba de las ventajas que han conferido al caldo de Mac Conkey el agregado de fosfatos y la disminución del pH.

En efecto, al mismo tiempo que la sensibilidad del caldo ha mejorado notablemente (un 15,37 %, según lo indica el cuadro nº 13), el poder inhibitor del mismo para los organismos que fermentan lactosa y que no pertenecen al grupo coli-aerogenes, se ha hecho más agudo por lo cual el número de tubos falsos positivos se ha reducido

a un 5,37 %, y aún no se puede afirmar que a los 5,37 % no sean bacterias coliformes - pues morfológicamente son iguales a las mismas y sólo se diferencian en que fermentan lentamente la lactosa y en consecuencia no dan colonias típicas en agar-oscina azul - de metileno.

Estos fermentadores lentos de lactosa, según bibliografía reciente, presentan gran importancia higiénica, y el hecho de que pasen desapercibidos al efectuar el examen de una agua según los métodos "standard" de E.E.UU. de N.A. es una de las principales deficiencias de estos.

En cuanto a las cualidades del nuevo medio para realizar la prueba de incubación a 44° C., destinada a evidenciar la presencia de B. coli fecal, ellas se manifiestan por los resultados del cuadro n° 14.- Sobre 655 tubos positivos a 37° C. (bacterias coliformes totales) obtenidos con el caldo de MacConkey modificado, 529 han acusado B. coli fecal utilizando la incubación a 44° C. con el medio modificado y sólo 314 con el medio original.

La causa de estos resultados son de difícil explicación, pero el aumento relativamente grande de tubos positivos que se obtiene con el nuevo medio no puede atribuirse a causas experimentales.

Finalmente, el cuadro n° 15 indica que la selectividad y sensibilidad del medio modificado para las bacterias coliformes intermedias, aerógenas y oligococcos (I. A.C.) no es menor que la del medio de MacConkey y, por el contrario, sobre 655 muestras de agua analizadas, se han obtenido un 19,0 % más de tubos con bacterias citrato positivas.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- La substitución de peptona por triptona en el caldo de Mac Conkey no aumenta la sensibilidad del mismo para las bacterias coliformes.-
- 2.- La disminución del pH del caldo de Mac Conkey de 7,4 a 6,8 lo hace menos sensible para las bacterias coliformes.-
- 3.- El agregado de una mezcla de  $\text{P}_2\text{O}_5\text{K}_2$  y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  al caldo de Mac Conkey no influye en su sensibilidad para las bacterias coliformes.-
- 4.- Un medio con triptona, fosfatos y pH 6,8 y otro con peptona, fosfatos y pH 6,8 tienen una sensibilidad mayor, para las bacterias coliformes, que el caldo de Mac Conkey (aproximadamente un 14 %). De ellos el de peptona parece ser levemente superior.-
- 5.- Las distintas marcas de peptona, ensayadas en el medio con peptona, fosfatos y pH 6,8, no influyen mayormente sobre su sensibilidad, aunque parece existir una leve ventaja cuando se usa peptona "Parke Davis".-
- 6.- La diferencia de sensibilidad entre el caldo de Mac Conkey modificado (peptona, fosfatos y pH 6,8) y el caldo lactosado utilizado en los métodos "standard" de EE.UU., para el examen del agua es mínima ya que sólo es de un 2 % a favor del caldo lactosado standard.-
- 7.- No existe una diferencia marcada en la velocidad de crecimiento de *E. coli* y *A. aerogenes* en el caldo de Mac Conkey y el modificado.-
- 8.- La producción de gas por *E. coli* es prácticamente igual en el caldo de Mac Conkey y en el modificado; pero, para *A. aerogenes* es mayor en el medio modificado durante las 24 primeras horas de incubación, igualándose al cabo de 48 horas de incubación.-
- 9.- El pH del cultivo disminuye paralelamente en ambos medios, pero la disminución es más rápida y pronunciada en los medios sembrados con *E. coli* que con *A. aerogenes*.-
- 10.- El examen de 655 muestras de aguas naturales y purificadas empleando el método de tilaco, muestra que:
  - a) la sensibilidad del caldo de Mac Conkey modificado es 15,57 % superior a la del de Mac Conkey.-
  - b) la selectividad del caldo de Mac Conkey modificado también es superior a la del de Mac Conkey ya que mientras aquél da un 5,57 % de tubos falsos positivos, éste da un 8,65 %.-
  - c) el aumento de sensibilidad y selectividad del nuevo medio se traduce en el encuentro de un 7,55 % más de muestras de aguas contaminadas.-
  - d) el medio modificado aprecia un 4,42 % más de *E. coli* que el Mac Conkey en la prueba de 44° C.-
  - e) en el nuevo medio desarrolla un 19,0 % más de las formas aerogenas, intermedias y cloacas que en el caldo de Mac Conkey, y un 1,61 % más de *E. coli*.-

A P E N D I C EDetalle de la composición de los medios con que se trabajó.

Caldo de Mac Conkey	Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
	Lactosa .....	10 g.
	Peptona "Parke Davis" .....	20 g.
	Cloruro de sodio .....	5 g.
	Agua destilada .....	1.000 ml.
	Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
	pH .....	7,4
Caldo de Mac Conkey triptona	Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
	Lactosa .....	10 g.
	Triptona .....	20 g.
	Cloruro de sodio .....	5 g.
	Agua destilada .....	1.000 ml.
	Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
	pH .....	7,4
Caldo de Mac Conkey (pH 6,8)	Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
	Lactosa .....	10 g.
	Peptona "Parke Davis" .....	20 g.
	Cloruro de sodio .....	5 g.
	Agua destilada .....	1.000 ml.
	Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
	pH .....	6,8
Caldo de Mac Conkey fosfatos	Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
	Lactosa .....	10 g.
	Peptona "Parke Davis" .....	20 g.
	Cloruro de sodio .....	5 g.
	Fosfato ácido bipotásico .....	4 g.
	Fosfato ácido monopotásico .....	1,5 g.
	Agua destilada .....	1.000 ml.
Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.	
pH .....	7,4	

Caldo de Mac Conkey  
triptona (pH 6,8).

Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
Lactosa .....	10 g.
Triptona .....	20 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Agua destilada .....	1.000 ml.
Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
pH .....	6,8

Caldo de Mac Conkey  
triptona-fosfatos  
(pH 7,4)

Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
Lactosa .....	10 g.
Triptona .....	20 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Fosfato ácido bipotásico .....	4 g.
Fosfato ácido monopotásico .....	1,5 g.
Agua destilada .....	1.000 ml.
Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
pH .....	7,4

Caldo de Mac Conkey  
triptona-fosfatos  
(pH 6,8)

Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
Lactosa .....	10 g.
Triptona .....	20 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Fosfato ácido bipotásico .....	4 g.
Fosfato ácido monopotásico .....	1,5 g.
Agua destilada .....	1.000 ml.
Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
pH .....	6,8

Caldo de Mac Conkey  
fosfatos (pH 6,8)

Bacto-oxgall "Difco" .....	5 g.
Lactosa .....	10 g.
Peptona "Parke Davis" .....	20 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Fosfato ácido bipotásico .....	4 g.
Fosfato ácido monopotásico .....	1,5 g.
Agua destilada .....	1.000 ml.
Rojo neutro. Sol. al 1 % .....	10 ml.
pH .....	6,8

Este último medio fue ensayado con Bacto-peptona "Difco"; peptona "Witte" y peptona -  
"Colleman y Bell".-

En las drogas en que no se menciona marca se ha empleado la calidad purísima. Todos los medios fueron preparados en forma semejante según la técnica siguiente:

La mezcla de todos los componentes indicados en las fórmulas, a excepción del rojo neutro, fue calentada en el esterilizador a vapor o en autoclave abierta durante dos horas y se dejó luego una noche en la cámara fría. Se filtró estando aún a baja temperatura y se ajustó al pH deseado. Se agregaron 10 ml. de sol. de rojo neutro al 1 %, se distribuyó a razón de 5 ml. en tubos de ensayo provistos de tubitos de fermentación Durham y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a una atmósfera.-

#### Método de Wilson (IV)

**Siembras:** Para siembras de un ml. o menos de agua se usó el medio común. Para siembras de 10 ml. de agua, se usó el mismo medio, pero de concentración doble y a razón de 10 ml. por tubo.

Para aguas profundas, profundas cloradas y superficiales cloradas se sembraron cinco tubos con 10 ml. de muestra, uno con 1 ml. y uno con 0,1 ml..

Para aguas superficiales no purificadas se sembraron un tubo con 10 ml. de la muestra, uno con 1 ml. y tres con 0,1 ml.

**Grupo coli-aerogenes:** Se incubaron a 37 ° C. los tubos sembrados, efectuando lecturas a las 24 y 48 horas. Se consideró positivo todo tubo que mostró presencia de ácido y de gas (más del 10 % del volumen del tubito de fermentación).

**B. coli tipo fecal:** De cada cultivo positivo en caldo Mac Conkey a las 24 y 48 horas, se retiró una porción con el asa y se sembró en un tubo con caldo Mac Conkey; y de cada cultivo positivo en caldo de Mac Conkey modificado se pasó un asa del mismo a un tubo con caldo Mac Conkey y otra a otro tubo con el medio modificado. Los tubos así sembrados se incubaron durante 48 horas en un baño de agua a temperatura constante de 44° C. (variación máxima: ± 0,5° C.).

Se consideraron positivos los tubos que mostraron presencia de ácido y de gas (más del 10 % del volumen del tubito de fermentación). En estas condiciones sólo desarrollan los organismos del tipo B. coli fecal.

**Gérmenes intermediarios aerogenes y cloacales:** Al mismo tiempo que se efectuaron los pasajes al caldo Mac Conkey y el modificado para su incubación a 44° C., se sembró también en medio citratado de Rogosa para determinar la presencia de organismos de carácter no fecal. Para ello de todos los tubos positivos a 37° C. se retiró una porción del cultivo, sumergiendo el asa recta 2 a 3 milímetros, y pasando luego al medio de Rogosa, que se incubó des ués a 37° C. durante 72 horas. Se consideraron positivos los tubos que indicaron desarrollo de gérmenes (turbidez del medio).

El medio citratado de Kocser tiene la siguiente composición:

Cloruro de sodio .....	5 g.
Sulfato de magnesio .....	0,2 g.
Fosfato mono-amónico .....	1 g.
Fosfato dipotásico .....	1 g.
Agua destilada .....	1.000 ml.

A esta mezcla que forma una solución límpida con pH 6,8, se agregó 2 g. de ácido cítrico, llevó nuevamente a pH 6,8 mediante solución N de CHNa, distribuyó a razón de 5 ml. por tubo y esterilizó en autoclave durante 10 minutos a una atmósfera.-

-----cc-----

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Mac Conkey, A., y Hill, C.A.- Thompson Yates Lab. Rep., 4, 151. (1901).- (+)
- 2.- Jackson, D.D., Suppt. Jour. Inf. Dis. 2, 30. (1907).- (+)
- 3.- Hale, F.E. y Malia, T.W., Amer. Jour. Pub. Health Assoc. 20, 622. (1910).- (+)
- 4.- Jackson, D.D. y Muer, T.C., Amer. Jour. Pub. Health Assoc. 1, 927. (1911).- (+)
- 5.- Jordan, E.C., Jour. of Inf. Dis. 12, 326. (1913).- (+)
- 6.- Obst, M.M., Jour. Bact. 1, 85. (1916).-
- 7.- Bunker, G.C., Jour. Bact. 1, 85. (1916).-
- 8.- Salter, R.C., Jour. Inf. Dis. 24, 276. (1919).- (+)
- 9.- Muer, T.C. y Harris, R.L., Amer. Jour. Pub. Health, 10, 874. (1920).- (+)
- 10.- Levine, M., Amer. Jour. Pub. Health, 21, 21. (1921).-
- 11.- Levine, M., Amer. Jour. Pub. Health, 9, 612. (1922).-
- 12.- Sinslow, C.E.A. y Dolloff, A.F., Jour. Inf. Dis. 31, 302. (1922).-
- 13.- D.R. y Et.R., Revue d'Hygiene. 45, 60. (1923).-
- 14.- Cunningham, J. y Raghavachari, T.N.S., Ind. Jour. Med. Res. 12, 75. (1924).-
- 15.- Cunningham, J. y Raghavachari, T.N.S., Ind. Jour. Med. Res. 14, 47. (1926).-
- 16.- Dunham, H.G., Jour. Amer. W. Works Assoc. 14, 535. (1925).-
- 17.- Cameron, A.B., 10th Rep. Ohio Conf. Water Purif. 63. (1930).- (+)
- 18.- Ey, L.F., 10th Rep. Ohio Conf. Water Purif. 57. (1930).- (+).
- 19.- Buchhoft, C.C. y col., Jour. Bact. 21, 407. (1931)
- 20.- Gettrust, J.S. y Hostettler, C.C., 10th. Annual Rep. Ohio Conf. Water Purif. 62. (1930).- (+)
- 21.- Poe, C.F., Univ. of Cal. Studies. 25, 209. (1938).-
- 22.- Mac Conkey, A.T., Jour. Hyg. 8, 322. (1908).-
- 23.- Savage, W.G., Jour. Hyg. 1, 437. (1901).-
- 24.- Horton, J.A. y Barnes, M., Jour. Amer. W. Works Assoc. 19, 729. (1938).-
- 25.- Raghavachari, T.N.S. y Seetharama Iyer, P.V., Ind. Jour. Med. Res. 23, 619. (1936)
- 26.- Ferrel, M.A., Jour. Amer. W. Works Assoc. 28, 611. (1936).-
- 27.- Atkinson, H. y Wood, E.J.F., Australian J. Exper. Biol. M. Sc. 16, 103. (1938) (")
- 28.- Mac Crady, M.H., Amer. Jour. Pub. Health. 29, 1253. (1939).-
- 29.- Ferrenola, R., Amer. Jour. Pub. Health. 30, nr 9. sept. (1940).-
- 30.- Thompson, R.E., Jour. Bact. 13, 209. (1927).-
- 31.- Jansig, A.C. y Montank, I.A., Jour. Amer. W. Works Assoc. 20, 684. (1928).-

# F O R N A

- 52.- Buschhoff, C.C., Kallas, J.C. y Ben Chinn., Jour.Amer.#.Works. Assoc. 23, 566. (1931).-
- 53.- Clark, E.S., Jour.Amer. W.Works. Assoc. 23, 580. (1931).-
- 54.- Cianci, V., Boll. Soc. Italiana Biol. Sperimentale. 11, 935. (1936).-
- 55.- Derby, C.W. y Mallmann, W.D., Jour.Amer. W.Works Assoc. 31, nº 4 abril. (1939).
- 56.- Ferramola, R., Comunicación personal.-

(+) Citado por Raghavachari y Seetharama Iyer, Ind.Jour.Med.Res. 23, 619. (1936).-

(") Citado por Mac Crady, M.H., Amer. Jour. Pub. Health. 29, 1253. (1939).-

*Ramón A. Liguero*

30-V-1942.