

## Tesis de Posgrado

# Contribución al estudio del grupo Coli-Aerogenes en las heces humanas

Kempny, José Carlos

1944

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:**

Kempny, José Carlos. (1944). Contribución al estudio del grupo Coli-Aerogenes en las heces humanas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0360\\_Kempny.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0360_Kempny.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Kempny, José Carlos. "Contribución al estudio del grupo Coli-Aerogenes en las heces humanas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1944.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0360\\_Kempny.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0360_Kempny.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Junio 22/1944

Presentada en la fecha. Conste.



1. Et Spina  
FORMA

Buenos Aires, Junio 22/1944

Para la Comisión examinadora  
Grupo 2º, lo presente tesis cuyo exámen  
José C. Kemény, a los efectos del  
Art. 2º del Digesto.

Carbunero  
Kemény

Tesis: 360

Buenos Aires, Julio 21/1944

Los miembros de la Comisión re-  
spectiva, que suscriben, han considerado la  
presente tesis y acuerdan aceptarla

de: El

*Morón*

Samboriano

Juan Juan *Mulopu*

CONTRIBUCION

al

OPERA

ESTUDIO

del

GRUPO COLI-AEROGENES

en las

HECES HUMANAS

José Carlos Kempny

Quede aquí consignada la expresión de mi profundo agradecimiento a mi padrino de tesis, Profesor Doctor Rogelio Trelles, Inspector General del Laboratorio de las Obras Sanitarias de la Nación y al Profesor Doctor Raúl Ferramola, Jefe de la Sección Microbiología de Aguas del referido Laboratorio, por la inestimable ayuda prestada en la elección del tema del presente trabajo, las indicaciones científicas recibidas y la revisión del texto definitivo del mismo. Agradecimiento que hago extensivo a las autoridades superiores del Laboratorio de las Obras Sanitarias de la Nación, que deferentemente me han permitido la realización de la parte experimental correspondiente.

# FEYBA.

## Introducción

El objeto de esta tesis es presentar datos sobre la distribución de bacterias coliformes en materias fecales de adultos, sin afección del tracto intestinal ni trastornos de cualquier índole, con el fin de que puedan ser de utilidad para la interpretación de los exámenes bacteriológicos de sustancias factibles de sufrir contaminación fecal (agua, leche etc.).

## Grupo Coli-Aerogenes

El primer organismo perteneciente al grupo coli-aerogenes, encontrado por Escherich en 1885, es el *Bacterium coli commune* Escherich, Fermentador de sacarosa que fué descrito por Buchner y Weisser.

En 1886 Escherich aisló el *Aerobacter aerogenes* de materias fecales de lactantes y lo consideró como fermentador obligado de la leche.

Estas dos bacterias son los representantes principales del grupo coli-aerogenes. Además, existen muchas formas intermedias que difieren en sus características de ambos tipos fundamentales precitados. De las investigaciones hechas durante los últimos 30 años resulta que hay también numerosas formas intermedias, tanto entre la bacteria *Escherichia coli commune* y la bacteria *Eberthella typhi*, como asimismo entre la bacteria *Aerobacter aerogenes* y la bacteria *cloacae* (Jordan) que licuan gelatina.

En base a las investigaciones de Mac Conkey, Clemesha, Johnson, Levine, Koser y de otros autores, queda hoy día demostrado que la bacteria *Aerobacter aerogenes* se encuentra principalmente en el suelo, encontrándose raras veces en heces humanas, al contrario de la bacteria *Escherichia coli commune* que habita en el intestino; cuando la bacteria *Aerobacter aerogenes* se halla en las materias fecales humanas, es casi siempre debido solo a la alimentación lactea. Mac Conkey encontró únicamente cuatro cepas de la última entre 241 cepas aisladas de materias fecales humanas.

# FOENBA

Poco antes del hallazgo de la bacteria *Escherichia coli* commune por Escherich, Hueppe había descubierto un organismo en la leche acidificada espontáneamente, al estudiar la fermentación del ácido láctico, que Zopf denominó bacteria ácido láctica (Hueppe) y que, en vista de su descripción poco detallada y de su gran parecido con la bacteria *Aerobacter aerogenes*, fué considerada idéntica a la misma por muchos autores, como ser Kruse, Lehmann y Neumann, Löhnis, Conradi y Bierast.

Como una variante de la bacteria ácido láctica (Hueppe) que no forma un sedimento tan denso y viscoso en la leche, es considerado el *N. pneumoniae* (Friedlaender).

A fines del siglo XIX se conocían ya muchas variantes de la bacteria *Escherichia coli*, empero en su mayor parte apenas someramente detalladas (véase Scholl, Migula, Lembke, Kruse y Bernardo Fischer).

La separación del típico *B. coli* fecal (la bacteria *Escherichia coli* commune) de la bacteria *Aerobacter aerogenes* fué hecha por Escherich, basándose en sus diferentes cualidades morfológicas y la distinta forma de sus colonias cultivadas en placas de gelatina.

Gilbert y Lion constataron en 1893 diversas variaciones diferenciales del tipo normal, tanto en la bacteria *Escherichia coli* commune como en la bacteria *Aerobacter aerogenes*, hecho que los indujo a establecer una división sistemática de las bacterias del grupo coli-aerogenes, tomando en cuenta, principalmente, la movilidad y la formación de indol, además su crecimiento en caldo lactosado y en leche para las bases esenciales de su diferenciación.

Smith, durante sus investigaciones sistemáticas sobre las bacterias del grupo coli-aerogenes obtenidas del agua potable, se fijaba preferentemente en la capacidad de fermentación de hidratos de carbono, sobre todo de dextrosa, lactosa y sacarosa, determinando la cantidad del gas de fermentación formado por las bacterias y la composición cuantitativa en hidrógeno y anhídrido carbónico, evidenciando grandes diferencias. La bacteria *Aerobacter aerogenes* produce en el caldo glucosado mucho más gas que la bacteria *Escherichia coli*; generalmente es mayor la proporción de anhídrido carbónico for-

mado con respecto a la de hidrógeno; en cambio, al tratarse de la bacteria *Escherichia coli*, el gas se compone más o menos de tres partes de hidrógeno por dos de anhídrido carbónico. Estos resultados investigados por Smith en el caldo glucosado, fueron confirmados más tarde por Burri y Duggeli, Fieber, Rogers, Clark, Davis y Evans.

Smith distinguió dos variedades de bacterias *Escherichia coli*, que solo diferían en la fermentación de sacarosa: la variedad a) formadora de ácido y gas en el caldo sacarosado y la variedad b) sin desarrollo en dicho caldo.

Durham investigó en forma muy extensa la capacidad de fermentación de las bacterias del grupo coli-aerogenes, encontrando en sus pruebas resultados parecidos a los de Smith. El esquema sistemático de las bacterias del grupo coli establecido por Durham en 1901, es el primer resumen gráfico de subdivisión útil de las bacterias del grupo coli-aerogenes y que actualmente, con la modificación de Bergey, es de importancia general. Ulteriormente se han intercalado algunas ampliaciones hechas por Mac Conkey, Bergey, Deehan Jackson, Kligler, Levine, Castellani, Chalmers, Winslow y Rothberg. Estas incluyen la prueba de fermentación de dulcita y salicina, la reacción de Voges-Proskauer, la prueba del rojo de metilo, así como el examen mediante la lichenación de gelatina y la reducción de nitrato.

Bergey distribuyó las bacterias del grupo coli-aerogenes en varios géneros de la familia de las bacteriaceae. Los dos géneros principales, el género *Escherichia* con 22 especies y el género *Aerobacter* con 7 especies corresponden a los subgrupos de la bacteria *Escherichia coli* y bacteria *Aerobacter aerogenes*. Bergey resumió las cepas de *Aerobacter aerogenes* capsuladas en un solo grupo especial llamado género *Klebsiella*. Además, él separó las cepas fitopatógenas del grupo coli-aerogenes, incluyéndolas conjuntamente con otras bacterias del todo extrañas al caso, en el género *Erwinia*. Rahn llamó la atención sobre esta disposición inconveniente de subdivisión indicada por Bergey.

Posteriormente algunos investigadores americanos, por ejemplo Werkmann y Gillen, y Parr suelen considerar las bacterias del

grupo coli-aerogenes positivas al citrato como pertenecientes a un nuevo género: Citrobacter.

Sin embargo, es dudoso si conviene subdividir todavía más el grupo ya tan numeroso de bacterias coli-aerogenes en géneros inferiores al género Escherichia y género Aerobacter, teniendo bien presente que mediante nuevos métodos de diferenciación se logrará subdividir siempre más el grupo coli-aerogenes.

Al respecto es interesante mencionar la prueba de Eijkman, según la cual la bacteria Escherichia coli es capaz de desarrollar a 46° C en medios glucosados, produciendo una apreciable cantidad de ácido y gas, mientras que la bacteria Aerobacter aerogenes es incapaz de hacerlo.

De todos estos antecedentes se deduce que actualmente, por razones prácticas, en los análisis de agua y de leche especialmente se definió el grupo coli-aerogenes no por sus caracteres morfológicos, sino por una serie de reacciones bioquímicas, como ser la de la prueba de Voges-Proskauer, de la prueba del indol, de la prueba del citrato, etc., las que, relacionadas entre sí, dan lugar a las reacciones características de cada representante del grupo.

El Ministerio de Salud Británico recomienda en su "Memorandum la clasificación siguiente:

Bacterias : -		Indol	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Koser	Gelatina
B. coli	tipo I	+	+	-	-	-
B. "	" II	-	+	-	-	-
B. intermediario	" I	-	+	-	+	-
B. "	" II	+	+	-	+	-
B. aerogenes	" I	-	-	+	+	-
B. "	" II	+	-	+	+	-
B. cloacae		±	-	+	+	+

Los métodos standard de los Estados Unidos de Norte América recomiendan en cambio una clasificación basada en las mismas reacciones, pero observando una distinta correlación de acuerdo con el cuadro siguiente:



Combinación de reacciones	Posible interpretación cuando se aísla por método Standard		Fuente ordinaria
	Usual	Ocasional	
Indol-RM-VP-Koser			Coli-aerog.-solo
+ + + -	E. coli ( B. coli )		Domina en heces. 50% aguas cloacales.
- + - -	( B. coli )	Extraños al grupo.	Poco en heces.
- + - +	Mezcla	Intermediario considerado a veces B. coli atípico.	Poco en tierra, raro en heces.
- + - +	Intermediario	Mezcla o aerog. de reacción lenta.	Suelo, poco en cloacales y heces.
+ + + +	Mezcla	Atípicas	Suelo, cloacales
+ - - +	Mezcla		
+ - + +	Mezcla	Cloacae.	Suelo, poco en cloacales y heces.
- + + +	B.aerogenes	Mezcla.	Suelo, vegetales
- - + +	B.aerogenes		50% de los del grupo en aguas cloacales.
- - - +	Formas extrañas	Aerogenes.	Poco en heces.

La clasificación adoptada por nosotros ha sido la aconsejada por Wilson, cuyo cuadro respectivo figura en la página siguiente, quien tomó por base la clasificación del Ministerio de Salud Británico, a la que se agregó como nueva característica la incubación durante 48 horas en caldo de Mac Conkey a 44° C.

Por consiguiente, el número de bacterias coliformes se duplica según dicha clasificación, sin embargo, no se han podido aislar las bacterias correspondientes a cada una de las combinaciones paralelas.

Clasificación de cepas coliformes establecida por G. S. Wilson

Tipos de bacterias	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato	Indol	Caldo MacConkey 44°C	Licuação gelatina
B. coli tipo I	+	-	-	+	+	-
B. " tipo II	+	-	-	-	-	-
B. intermediario tipo I	+	-	+	-	-	-
B. " tipo II	+	-	+	+	-	-
B. aerogenes tipo I	-	+	+	-	-	-
B. " tipo II	-	+	+	+	-	-
B. cloacae	-	+	+	-	-	+
B. irregular tipo I (semejante a B. coli tipo I) .....	+	-	-	+	-	-
B. irregular tipo II (semejante a B. coli tipo II) .....	+	-	-	-	+	-
B. irregular tipo III (semejante a B. coli tipo II) .....	+	-	-	-	-	+
B. irregular tipo IV (semejante a B. intermediario) .....	+	-	+	-	-	+
B. irregular tipo V (semejante a B. aerogenes tipo I) .....	-	+	-	-	-	-
B. irregular tipo VI (semejante a B. aerogenes tipo II) .....	-	+	+	-	+	-
B. irregular tipo VII .....	-	-	+	+	-	-
B. " tipo VIII .....	-	-	-	-	-	-

## I d e n t i f i c a c i ó n

### Prueba del indol.

Fué Kitasato quien descubrió la capacidad de la bacteria *E. coli* de origen intestinal de producir indol en medios nutritivos que contienen proteína (para diferenciarlas de bacterias del tifus). Desde el hallazgo de formas *E. coli*, indol negativas, por Ehrenfest y Lembke, este procedimiento eficaz presta buenos servicios a la clasificación de muchas especies del grupo coli-aerogenes.

Según Gersbach, la comprobación del indol se efectúa en cultivos de caldos con tripsina, incubados durante 72 horas a 37° C.

De los numerosos procedimientos técnicos empleados en la práctica con el objeto de hallar indol, se prefieren los de Kovács y de Gottsacker.

Kovács comunicó que la prueba del indol tiene también buen resultado con alcohol amílico en los cultivos comunes en caldos, mientras que la reacción Ehrlich-Böhme falla a menudo en estos casos. La prueba con nitroprusiato sódico, modificada por Gottsacker, se distingue de todas las demás reacciones del indol por su gran sensibilidad. Pues el p-dimetilaminobenzaldehído utilizado en la prueba del indol, según Kovács, obra no solo sobre el indol sino también sobre el alfa-metil indol, mientras que el nitroprusiato sódico reacciona solamente con indol y no con alfa-metil indol.

La capacidad de formación del indol representa en las especies productoras del mismo, en cierto sentido, una función de la intensidad del crecimiento, y depende de los siguientes tres factores:

- 1.) del pH del medio (la reacción del medio debe ser débilmente alcalina);
- 2.) de una temperatura de incubación favorable y
- 3.) de la presencia de oxígeno.

Además, la prueba del indol tiene buen resultado en un cultivo con proteína, únicamente en el caso de que las proteínas hayan sido desdobladas en parte a triptofano, mediante un proceso de división enzimática. Solamente a partir de este aminoácido, el triptofano, la bacteria *E. coli* puede producir indol.

La bacteria *E. coli* no dispone de encimas trípticas para poder descomponer las proteínas dando triptofano en soluciones libres de tripsinas o de pepsinas. Por este motivo, no tiene éxito la prueba del indol, como ha sido demostrado en cultivos en leche, por no encontrarse aquí las condiciones necesarias para la formación del mismo.

Asimismo resulta negativa a menudo la prueba del indol en caldo de tripsina, cuando se encuentran presentes hidratos de carbono, hecho sobre el cual ya llamaron la atención Graaf y A. Fischer.

Técnica de Böhme.- A un cultivo en agua peptonada, incubado a 37° C durante 96 horas consecutivas se le agrega 1 ml de éter sulfúrico. Se agita bien y luego que por distinta densidad quedan separados los líquidos, se adicionan 10 gotas del reactivo N° 1:

Paradimetilaminobenzaldehido	1 gr.
Alcohol amílico 95°	95 ml.
Acido clorhídrico concentrado	20 ml.

y 10 gotas del reactivo N° 2: Solución acuosa saturada de persulfato de potasio.

Si hay indol, se forma una coloración roja violácea que se origina en los primeros 5 minutos y que pasa al éter, sobre todo si se imprime al tubo ligeros movimientos.

La técnica utilizada por nosotros fué empleando solamente el reactivo N° 1, pero en lugar de alcohol amílico se empleó alcohol etílico. Por las paredes del tubo inclinado se hizo deslizar lentamente el reactivo, de modo de formar dos capas bien definidas. En el límite de las mismas se apreciaba a los pocos segundos una coloración roja violácea.

#### Prueba del rojo de metilo.

La prueba del rojo de metilo, según Clark y Lubs sirve para distinguir las diferencias de acidez producidas por las diversas especies.

En contraste con la bacteria típica *A. aerogenes*, la bacteria típica *E. coli* fecal produce más ácido en soluciones azucaradas, así que la prueba del rojo de metilo resulta positiva, o sea que se presenta la coloración roja en cultivos con caldo glucosado, incubados durante varios días con bacterias *E. coli* y tratados con dos o tres gotas del indicador propuesto por Clark y Lubs.

No hay que dar una importancia excesiva diferencial diagnóstica a la prueba del rojo de metilo, puesto que ella suministra muchas veces valores inconstantes debido a la variación continua de la capacidad acidificante.

Determinación de pH en caldo de glucosa-fosfato para bacteria *E. coli*, *B. intermediario* y *A. aerogenes-cloacae*:

Días de incubación a 37°C	<i>E. coli</i> pH	<i>B. intermediario</i> pH	<i>A. aerogenes cloacae</i> pH
0	7,5	7,5	7,5
1	5,3	5,1	5,8
2	5,2	5,2	6,4
3	5,2	5,2	6,9
4	5,2	5,3	7,1
5	5,2	5,3	7,3

El comentario de Singer de que algunas cepas de *A. aerogenes* son aptas para producir ácido en abundancia, mientras que otras especies del grupo coli-aerogenes desarrollan muy poco ácido, es un factor que disminuye también el valor de la prueba del rojo de metilo. También Demeter y Sauer, luego de haber hecho sus ensayos con el grupo coli-aerogenes, quedaron igualmente convencidos de que la prueba del rojo de metilo no es un método exacto de diferenciación.

Técnica : A un cultivo de 72 horas de incubación a 37° C se agregan 5 gotas de una solución de rojo de metilo al 0,02%. Se agita bien; la reacción es positiva cuando aparece una coloración roja y negativa cuando es amarilla. El indicador varía entre pH 4,0 y 6,3.

#### Prueba de Voges-Proskauer.

Bergey ha utilizado esta prueba como principal factor de diferenciación en la separación de su género *Escherichia* del género *Aerobacter*. La reacción de Voges-Proskauer ha tenido cada vez mayor aplicación en los últimos años, sobre todo motivada por las publicaciones en pro de ella de varios investigadores ingleses y americanos como Durham, Mac Conkey, Harden y colaboradores. Levine, Johnson y Levine, Koser y otros.

Vinculada a la prueba del indol, a la prueba del rojo de metilo y a la prueba del citrato de Koser, dicha reacción represen-

ta un medio auxiliar importante para diagnosticar diferencias, contribuyendo hasta cierto grado a deducir conclusiones acertadas sobre el caracter de la contaminación en cada caso. Los resultados de las investigaciones de Clemesha, Mac Conkey, Koser, Levine, Johnson y Levine, así como de Ruchhoft, Kallas, Chinn y Coulter, justifican la aseveración de que la bacteria *A.aerogenes* es habitante típico del suelo y la bacteria *E.coli* un microorganismo intestinal. Especies Voges-Proskauer positivas han sido encontradas relativamente raras veces por los precitados autores en materias fecales humanas y animales.

La aparición de la coloración roja-eosina en los cultivos con glucosa, al añadir potasa diluída, fué observada primeramente por Voges y Proskauer en 1899.

En lo inherente al proceso muy complicado de la reacción de Voges-Proskauer se conoce bien sólo la primera parte de su transcurso por los trabajos de Harden, Walpole, Norris, Horowitz, Rodinowa y Wlassowa.

Según el informe de Harden, los microorganismos del grupo coli-aerogenes producen 2,3-butilenglicol ( $\text{CH}_3\text{-CHOH-CHOHCH}_3$ ) que se oxida por la actividad de crecimiento de la bacteria *A.aerogenes* y de algunas formas intermedias del grupo coli-aerogenes, transformándose en acetilmetilcarbinol ( $\text{CH}_3\text{-CHOH-CO-CH}_3$ ). La típica bacteria *E.coli* no podría activar este proceso de oxidación. Después de mezclar los cultivos de *A.aerogenes* en el caldo glucosado con una solución sódica o potásica, se forma paulatinamente el diacetilo ( $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$ ) del acetilmetilcarbinol, en presencia del oxígeno atmosférico. Pero el diacetilo es poco estable en soluciones alcalinas y se transforma en su estructura quinónica. Los procesos que ocurren en los grupos amídicos de las proteínas, debido al efecto causado por la solución concentrada de álcali y que ocasiona finalmente la formación del colorante rojo (estructura quinónica), no han sido aclarados todavía.

Existe una modificación de la reacción de Voges-Proskauer que consiste en la adición de alfa-naftol, con el consiguiente aumento de variación de la coloración y de mayor sensibilidad, sin perder, hasta donde ha sido posible comprobarlo, la especificidad. Con esta prueba se ha encontrado que ciertas bacterias que dan reacción negativa con la prueba de Voges-Proskauer ordinaria o con

la modificación de Barrit, producen acetilmetilcarbinol.

Naturaleza de la reacción del alfa-naftol: Se supone que el alfa-naftol forma un compuesto con la unión diacetilopeptona; el producto resultante es colorado de rojo. Parece que el alfa-naftol debe combinarse rápidamente en esta reacción, porque se ha demostrado que si se deja actuar HOK sobre una mezcla de peptona y diacetilo hasta obtener una coloración salmón rosada, la subsiguiente adición de alfa-naftol no produce ninguna alteración del color. Al efectuar esta prueba, es por consiguiente conveniente agregar el alfa-naftol antes que el HOK y evitar un exceso de éste último.

#### Técnicas:

a) Variante de O'Meara: Un cultivo en caldo de glucosa-fosfato (5 ml) se incuba durante 3 días a 37° C y con un cortaplumas se echan unos miligramos de creatina, agregando luego HOK al 40%. El tubo se agita y se pasa una pequeña porción del mismo a un vidrio de reloj. En media hora las pruebas positivas desarrollan una coloración roja rosada que vuelve a desaparecer a las dos horas. Las pruebas negativas permanecen incoloras. Las reacciones se controlan con el resto del tubo, donde las coloraciones tardan más en producirse, pero en cambio son más estables.

b) Técnica de Barrit: Luego de incubar durante 3 días a 37° C se pasa 1 cc a un tubo de ensayos al que se agregan 0,6 ml de alfa-naftol (solución alcohólica al 5%) y 0,2 ml de HOK al 40%. Se obtienen también buenos resultados con 0,5 ml de una solución al 6% de alfa-naftol y 0,5 ml de KOH al 16%. Luego de añadir cada reactivo, se agita bien. La presencia de acetilmetilcarbinol se pone de manifiesto en unos 10 - 15 minutos por una coloración rosada salmón.

#### Prueba de Koser .

Koser fué el primero quien estudió la capacidad de bacterias del grupo coli-aerogenes de utilizar sales del ácido cítrico como única fuente de carbono. El efectuó un estudio muy detallado de cepas obtenidas de materias fecales y del suelo, llegando así a la conclusión de que la bacteria E.coli era incapaz de desarrollarse en este medio; en cambio, se desarrollaron en él la bacteria A. aerogenes, B. cloacae y B. intermedia.

La bacteria *E. coli* no produce turbidez a los 3 días de incubación a 37° C en el medio citratado de Koser, que es una solución límpida e incolora. En caso de producirse un pequeño sedimento, debe considerarse causado por contaminación, pues al hacer nuevamente un trasplante a una placa con un medio selectivo con eosina-azul de metileno, no se produce ningún desarrollo. Para evitar falsos resultados debido al agregado de elementos nutritivos al medio citratado, en este caso del agua con peptona, se hace el trasplante sumergiendo unos milímetros un ansa recta en el agua con peptona.

La bacteria *A. aerogenes*, *B. cloacae* y *B. intermedia* producen turbidez ya a las 24 horas en la mayoría de los casos. Pero, para mayor seguridad, se observan los resultados a las 48 horas de incubación a 37° C.

#### Prueba de la licuación de la gelatina.

Es la prueba diferencial de *A. aerogenes* y *A. cloacae* que depende del poder proteolítico del segundo sobre la gelatina.

Se incubó a 37° C durante siete días en una siembra por punción. Se efectuaron siembras por punción de todas las cepas indol + rojo de metilo - , Voges-Proskauer + y Koser + . Si a los siete días no se observó la licuación de la gelatina, se hizo una última observación a los siete días subsiguientes, incubando a 37° C.

#### Incubación a 44° C en caldo de Mac Conkey.

Eijkman fué uno de los primeros en utilizar temperaturas de incubación superiores a 37° C en la diferenciación de *E. coli* del *A. aerogenes*, empleando un medio glucosado en que incubaba a 46° C.

Numerosos investigadores posteriores llegaron a la conclusión de que la temperatura de 46° C era demasiado elevada, debido a que a esta temperatura no se desarrollan bien algunas cepas de *E. coli*. La experiencia demostró la eficacia de la incubación a 44° C. A temperaturas superiores el número de cepas de *E. coli* que se desarrollaban, se reducía sensiblemente, mientras que temperaturas inferiores permitían la producción de gas por otros tipos de bacterias coliformes.

El profesor G. S. Wilson obtuvo una mejor concordancia con el medio de Mac Conkey que con el caldo glucosado, con cuyo medio obtuvo los siguientes resultados:



	I	M	Vi	C				
de 233 cepas	-	+	-	-	189	( 81 % )	eran Eijkman	+
" 193 "	+	+	-	-	180	( 93 % )	" "	+
" 117 "	-	-	+	+	0	( 0 % )	" "	-
" 149 "	+	-	+	+	1	( 0,7% )	" "	-

Es decir que todos los intermediarios y, con una sola excepción, todas las bacterias A. aerogenes y cloacae eran Eijkman negativas, mientras que una gran proporción de E. coli era Eijkman positiva.

Sin embargo, hya una discrepancia en cuanto a la utilidad de la prueba para la diferenciación. Algunos investigadores, tales como Leiter, Perry, Minkewitsch, Lind, Williams, Weaver, Sheraige, Levine, Epstein y Vaughn, Skinner y Brown, la consideran de gran valor para diferenciar las bacterias coliformes.

Por otra parte, Ruchhoft, Kallas, Chinn y Coulter, Burke Gaffney, Webster y Raghavachari la creen poco practicable.

Discrepancias de tal magnitud se deben generalmente a variaciones de técnica. Lo más probable es que no se mantenga constante la temperatura durante la prueba. Parece ser que los investigadores que encontraron practicable la prueba como un medio de diferenciación, trabajaban con estufas que mantenían una temperatura constante de 44° C, mientras que aquellos otros no del tdo de acuerdo con dicha prueba, efectuaban sus experiencias con temperaturas demasiado altas, bajas o poco constantes.

Cuando se precisa la temperatura de 44° C, se indica la del medio y no la del incubador. Para obtener resultados constantes y comparables, empleamos un baño calentado electricamente con un termoregulador ideado por el Profesor A. Sordelli (ver Ferramola y Monteverde).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

Se utilizaron 100 muestras de materia fecal provenientes de personas residentes en la Capital Federal, con alimentación mixta normal y de las cuales 60 del sexo masculino y 40 del sexo femenino. Las muestras se examinaron en el día de su obtención o a lo sumo al siguiente.

### Método de estudio.

El material en estudio se recibió en un tubo esterilizado, en el cual se hizo una suspensión en suero fisiológico de las materias fecales. Se hicieron varias siembras por estría en placas de Petri, con un medio selectivo de eosina-azul de metileno y de lactosa tornasol.

Se incubaron a 37° C durante 24 horas. Fué imposible predecir el desarrollo en colonias según la consistencia de la suspensión. La placa de Petri con lactosa tornasol se utilizó únicamente como prueba de que las colonias desarrolladas fermentaban lactosa, dando una reacción ácida (hacen virar el medio). Las bacterias del grupo coli-aerogenes desarrollaron en el medio de eosina-azul de metileno en forma típica; colonias generalmente lisas, oscuras y con brillo metálico. Las bacterias A. aerogenes y cloacae eran las azuladas, rodeadas por un halo blanco.

De cada placa de agar eosina-azul de metileno se aislaron diez colonias típicas que se incubaron en agua peptonada durante 24 horas a 37° C (cuyo desarrollo debe ser uniformemente turbio sin velo ni depósito). De este medio se transplantó nuevamente a agar eosina-azul de metileno para purificar la colonia. Se incubó a 37° C durante 24 horas. Se aisló una colonia de cada placa de Petri, la que se incubó en agua peptonada. A las 24 horas de incubar a 37° C se efectuaron los siguientes transplantes:

- 1.) a un tubo con agua con peptona-glucosa-fosfato;
- 2.) " " " " medio citratado de Koser;
- 3.) " " " " caldo de Mac Conkey simple con campana Durham de fermentación (para la prueba de Eijkman modificada por Wilson) y
- 4.) a un tubo con agar inclinado, para la conservación de la cepa.

El tubo con agua con peptona se siguió incubando durante 72 horas a 37° C, al cabo de las cuales se investigó en él la presencia de indol. El tubo con peptona-glucosa-fosfato también se incubó durante 72 horas a 37° C. Se pasó luego 1 ml de la suspensión a un nuevo tubo para la observación de la presencia de acetil-metil-carbinol; con el resto del residuo en el tubo se observó la reacción al rojo de metilo.

A las 48 horas se observó la turbidez producida en el tubo con el medio citratado de Koser, que había sido incubado a 37° C. En el tubo de Mac Conkey se observó la posible formación de ácido y gas a las 48 horas de haberse incubado a 44° C.

Se agruparon luego las bacterias de acuerdo a la clasificación aconsejada por el Ministerio de Salud Británico. Todas las colonias que no eran bacteria E. coli fecal del tipo I, fueron nuevamente purificadas y analizadas hasta la concordancia de las pruebas.

Para diferenciar A. aerogenes de cloacae se hizo la prueba de la licuación de la gelatina, que se observó luego de incubar durante 15 días a 37° C.

I

Cepas aisladas	<u>1.000</u>
Muestras con B. coli únicamente	86
" " " y B. aerogenes	13
" " " , B.aerogenes y B.cloacae	1
" " " y B. cloacae	0
" " " y B. intermediarios	<u>0</u>
Número total de muestras	<u>100</u>

II

Distribución de bacterias coliformes en materias fecales de personas adultas ( de acuerdo con el Ministerio de Salud Pública Británico ) : -

B. coli fecal	tipo I	923 cepas
B. " "	" II	39 "
B. intermediarios	" I	0 "
B. "	" II	0 "
B. aerogenes	" I	33 "
B. "	" II	4 "
B. cloacae		1 "
	<u>Total</u>	<u>1.000 cepas</u>

III

Distribución de las mil cepas con bacterias coliformes en materias fecales humanas (correspondientes a 60 muestras del sexo masculino y 40 muestras del sexo femenino) de acuerdo a la clasificación recomendada por Wilson:-

B a c t e r i a s	Sexo masculino		Sexo femenino		T O T A L		
	Número	%	Número	%	Número	%	%
	B. coli fecal	546	91,0	361	90,2	907	90,7
B. " "	0	0,0	0	0,0	0	0,0	96,2
B. irregular	2	0,3	14	3,5	16	1,6	
B. " "	21	3,5	18	4,5	39	3,9	
B. intermedio	0		0		0		0
B. " "	0	0	0	0	0	0	
B. irregular	0		0		0		
B. aerogenes	5	0,8	1	0,3	6	0,6	
B. " "	3	0,5	1	0,3	4	0,4	3,7
B. irregular	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
B. " "	22	3,7	5	1,2	27	2,7	
B. cloacae	1		0		1		0,1
Totales : -	600	100 %	400	100 %	1.000	100 %	100 %

IV

Distribución de las cepas en función de la reacción del indol:

	Sexo masculino		Sexo femenino		T o t a l	
	Número	%	Número	%	Número	%
B. coli fecal tipo I	546	91,0	361	90,2	907	90,7
B. irregular " I	2	0,3	14	3,5	16	1,6
B. aerogenes " I/II	3	0,5	1	0,3	4	0,4
	551	91,8	376	94,0	927	92,7

V

Correlación de las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo:

Bacterias : -	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	Número de cepas	Correlación %
B. coli fecal tipo I	+	-	907	90,7
B. irregular " I	+	-	16	1,6
B. " " II	+	-	39	3,9
B. aerogenes " I	-	+	6	0,6
B. " " II	-	+	4	0,4
B. irregular " VI	-	+	27	2,7
B. cloacae	-	+	1	0,1
<u>Total : -</u>			1.000	100 %

VI

Distribución de bacterias del grupo coli-aerogenes con relación a su incubación a 44° C : -

	IMViC	Sexo masculino	Sexo femenino	Total
1.) Bacterias que producen ácido y gas (obs.1) a 44° C : -				
B. coli Tipo I	+ + - -	546	361	907
B. irregular " II (semejante a coli del tipo II) .....	- + - -	21	18	39
B. irregular Tipo VII (semejante a aerogenes del tipo II)....	- - + +	22	5	27
<u>Suma</u> : -		589	384	973
2.) Bacterias que no producen ácido ni gas a 44° C : -				
B. coli Tipo II	- + - -	0	0	0
B. intermedio " I	- + - +	0	0	0
B. " " II	+ + - +	5	1	6
B. aerogenes " I	- - + +	3	1	4
B. " " II	+ - + +	2	14	16
B. irregular " I (semejante a coli del tipo I) .....	+ + - -	1	0	1
B. cloacae .....	- - + +	0	0	0
y otras B. irregulares .	- - - -	0	0	0
<u>Suma</u> : -		11	16	27
3.) <u>T o t a l</u> : -		600	400	1.000
4.) Total de + + - - (IMViC) es decir Bacteria coli tipo I y B. irregular " I .....		548	375	923

(obs.1) Observación: "Gas" significa la cantidad suficiente para llenar la porción hemisférica del tubo de Durham, o sea aproximadamente un 10% de su capacidad. Cualquier cantidad de gas inferior a la indicada, significa que la temperatura de incubación es demasiado cercana a la de muerte, para considerarlo como resultado positivo a los efectos de investigación, como ya lo han demostrado otros investigadores (Clegg y Sherwood, 1939).

### Consideraciones finales.

Se ha estudiado la distribución de las bacterias del grupo coli-aerogenes-cloacae en materias fecales de personas adultas (entre 20 y 55 años de edad) de la Capital Federal, bacterias que fueron aisladas en agar eosina-azul de metileno.

La clasificación de dichas bacterias se ha efectuado de acuerdo a lo aconsejado por el Ministerio de Salud Británico y a la clasificación recomendada por Wilson.

Las muestras han sido obtenidas del Hospital Militar y del Instituto de Perfeccionamiento Médico Quirúrgico, de personas ya internadas durante cierto tiempo, con el objeto de que hayan recibido una alimentación mixta normal varios días antes del análisis de la muestra. Se han elegido sujetos sin afecciones al aparato digestivo ni con trastornos funcionales de cualquier índole.

El estudio de mil cepas provenientes de 100 muestras de materias fecales, de las cuales 60 de personas del sexo masculino y 40 del sexo femenino, demuestra que hay alguna variación en la así llamada flora coliforme normal.

Encontramos un 90,7 % de bacterias coli fecal del tipo I, sin haber hallado mayor diferencia en los porcentajes en materias excrementales de personas del sexo masculino o femenino.

No hemos hallado bacterias del tipo intermedio.

Dentro de la sección aerogenes-cloacae ( 3,8 % ) prevalece el B. irregular del tipo VI con un 2,7 %; le sigue luego el A. aerogenes del tipo I ( 0,6 % ) y luego el A. aerogenes del tipo II ( 0,4 % ). Finalmente tenemos una sola cepa de las mil aisladas, licuadora de gelatina : B. cloacae.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos, cabe destacar la prueba del indol, pues tenemos 927 cepas con bacterias productoras de indol, hecho que habla en favor de esta prueba como índice de contaminación fecal. Sin embargo, se encontraron dos muestras con coli anindólico únicamente, pero productoras de gas



en el medio de Mac Conkey a 44° C.

Las pruebas de Voges-Proskauer y la del rojo de metilo dieron una correlación negativa absoluta. No se obtuvieron cepas irregulares, como ser:

Voges Proskauer + rojo de metilo -  
o Voges Proskauer - rojo de metilo +

También todas las cepas Voges-Proskauer positivas fueron siempre citrato-positivas, pudiendo por lo tanto considerarse la prueba del citrato como un excelente medio de diferenciación del *Bacterium coli* del aerogenes, intermedio o cloacae.

Respecto a la incubación a 44° C, con relación a la prueba del citrato, (método IV de Wilson), no se corresponden tan exactamente. Hemos encontrado 16 discrepancias en 55 combinaciones - - + + IMViC. Pero cabe hacer notar que 10 de ellas provenían de una única muestra.

De 918 cepas del *Bacterium coli* fecal I, de acuerdo con la clasificación + + - - IMViC, 16 o sea 1,7 % no producían ácido y gas a 44° C. Por lo tanto, hemos hallado una mayor concordancia que la encontrada por Wilson, quien encontró un 7 % de *B. coli* fecal que no desarrollaba a 44° C en el medio de Mac Conkey.

Sherwood y Clegg encontraron también una mayor concordancia entre las dos pruebas: de 1065 cepas investigadas 1036 ( 97,3 % ) produjeron gas en el medio de Mac Conkey a 44° C.

Asimismo nos vemos frente al hecho de que todos los *B. coli* anindólicos dieron un desarrollo positivo cuando incubados en el caldo de Mac Conkey a 44° C, lo que comprueba el acierto de la incubación a 44° C en el caldo de Mac Conkey como medio de diferenciación de *B. coli* fecal de las demás bacterias del grupo.

Donde se observó mayor irregularidad, fué con la bacteria A. aerogenes. Esta debe ser negativa a 44° C, pero sobre un total de 38 cepas pertenecientes al grupo aerogenes-cloacae, tenemos 27 cepas productoras de ácido y gas a 44° C. Sin embargo, hay que hacer destacar que existe una diferencia notable en la producción de gas entre estas bacterias y las del grupo coli. En efecto el gas producido por las primeras alcanza apenas a llenar la parte hemisférica del tubo de Durham a las 48 horas de su incubación. En cambio, el gas producido por la bacteria B. coli típica llena completamente la campana de Durham a las 24 horas de su incubación en la mayoría de las cepas.

Por lo tanto, puede obtenerse una diferenciación mediante esta prueba bastante concordante con las demás. Además, para esta prueba bastan 48 horas a lo sumo para obtener los resultados deseados, lo que no sucede con las pruebas del indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer o del citrato, las que necesitan como mínimo 72 horas de incubación.

Conclusiones

1.- Se han estudiado 1000 cepas de bacterias del grupo coli-aerogenes-cloacae, provenientes de 100 muestras de materias fecales humanas.

2.- Entre estas mil cepas aisladas en agar eosina-azul de metileno hemos encontrado:

- 90,7 % de B. coli fecal del tipo I,
- 5,5 % de B. irregular de los tipos I y II,
- 0,6 % de B. aerogenes del tipo I,
- 0,4 % de B. aerogenes del tipo II,
- 2,7 % de B. irregular del tipo VI y
- 0,1 % de B. cloacae.

3.- No hay diferencia apreciable en la distribución de bacterias de origen masculino o femenino, humano.

4.- Las distintas pruebas han dado los siguientes resultados:-

indol positivas .....	92,7 %
correlación negativa del rojo de metilo y Voges-Proskauer .....	100 %
citrato positivas .....	3,8 %
caldo de Mac Conkey a 44° C positivas .....	97,3 %

*Jose C. Kempay*

Bibliografía

**B. O. F. N. A.**

- Barrit - (1936) J. Path. and Bact., 42, 441.
- Bergey - (1923) Manual of Determinative Bacteriology.
- Bergey D.H. y Deehan S.Y. - (1908) J.med.Res., 19, 175-200.
- Böhme A. - (1905) Zentr.Bl.Bakt. I.Abt.Orig., 40, 129-133.
- Buchner H. - (1885) Arch. f. Hyg., 3, 361-442.
- Bulír J. - (1907) Arch. f. Hyg., 62, 1-13.
- Burke-Gaffney - (1932) J. Hyg. Camb., 32, 85.
- Burri R. y Düggelli - (1909) Z. Bakt. Parasitenk., 49, 145-174.
- Castellani y Chalmers - (1919) Manual of Tropical Med. 942.
- Clark W.M. y Lubs H.A. - (1915) J.Infect.Dis., 17, 160-173.
- Clark W.M. y Lubs H.A. - (1919) J.Bact., 2, 1 y 109.
- Clemesha E. (citado por Levine en J.Bact.1916, 1, 153-163).
- Conradi H. y Bierast W. - Kolle Wassermann, path.Mikroorganism.
- Demeter K.J. y Sauer Fr. - (1934) Milchwirtschaftl. Forsch. 16, 236-276.
- Durham H. E. - (1898) Brit. Med. J. 1387.
- Durham E. H. - (1901) J. Exptl. Med. 5, 353-396.
- Ehrenfest H. - ( ) Arch. f. Hyg., 26, 369-385.
- Eijkman C. - (1904) Zentr.Bl.Bakt. I Orig., 37, 742-752.
- Eijkman C. - (1914) Zentr.Bl.Bakt. IIte Abt. 39, 75.
- Escherich Th. y Pfaundler - en Kolle Wassermann Tomo II (1903).
- Ferramola R. y Monteverde J.J. - (1938) Bol.O.S.N.Bs.Aires 12, 611 y 15, 265.
- Ferramola R. y Monteverde J.J. - (1939) Bol.O.S.N.Bs.Aires 21, 248.
- Fischer A. - (1915) Biochem. Zeitschr., 70, 105-118.
- Fischer B. - (1902) Zt. f. Hyg., 39, 447-510.
- Frieber W. - (1913) Zentr.Bl.Bakt., I Orig., 71, 534-542.
- Frieber W. - (1921) " " " I " 86, 58-60.
- Gilbert A. y Lion G. - (1893) Sem. medicale, 13, 97.
- Gottsacker E. - (1933) Zentr.Bl.Bakt. I Orig., 49, 517-520.

- Graaf W. C. - (1909) Zentr. Bl. Bakt. I Orig. 49, 173-178.
- Harden A. - (1905) J. Hyg., 2, 488-493.
- Harden A., - (1906) Proceed. Royal Soc. Serie B, 77, 424-425.
- Harden A. y Walpole G. S. - (1906) Proc. Royal Soc. London Serie B 77, 399-405.
- Harden A. y Norris Dorothy - (1912) Proc. Royal Soc. London Serie B 84, 492-499 y 85, 73-78.
- Horowitz, Wlassowa y Rodinowa - (1932) Zentr. Bl. Bakt. II 87, 333-339.
- Hueppe F. - (1884) Mittlgn. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt Berlin.
- Jackson D. - (1911) J. Infect. Dis., 8, 241-249.
- Johnson B.R. - (1916) J. Bact., 1, 96.
- Kitasato S. - (1889) Ztschrift. Hyg., 7, 515-520.
- Kligler Y. - (1914) J. Infect. Dis., 15, 187-204.
- Koser S.A. - (1924) J. Infect. Dis., 35, 14-22 y 315-322.
- Kovacs N. - (1928) Ztschrift. Immun. Fortsch., 55, 311-315.
- Kovacs N. - (1931) Zentr. Bl. Bakt. I Orig. 123, 391-397.
- Kruse en: Flüggle C. "Die Mikroorganismen" II. parte - (1896) 336-350.
- Lehmann K.B. y Neumann R. - (1896) Bakteriolog. Diagnostik.
- Lehmann K.B. y Neumann R. - (1926) Bakteriologie, 7. Aufl. I y II.
- Leiter L.W. - (1929) Amer. J. Hyg., 9, 705.
- Lembke W., - (1896) Arch. f. Hyg., 26, 293-328.
- Lembke W. - (1896) Arch. f. Hyg., 27, 394-391.
- Levine M. - (1916) J. Bact., I, 153-164 y 619-621.
- Levine M. - (1916) J. Infect. Dis., 18, 358-367.
- Levine, Epstein y Vaughn - (1934) Amer. J. publ. Hlth. 24, 505.
- Lind G. - (1932) Arch. Hyg., 107, 234.
- Löhnis F. - (1907) Zentr. Bl. Bakt. II, 18, 97-149.
- Mac Conkey A. - (1905) J. Hyg., 2, 333-379.
- Mac Conkey A. - (1909) J. Hyg., 9, 86-104.
- Migula W. - System der Bakterien II Jena.

- Minkewitsch J. E. - (1932) Zbl.Bakt., 124, 61-62.
- Monteverde J.J. - (1940) Tesis estudio grupo coli-aerogenes.
- O'Meara R.A.Q. - (1931) J.Path. and Bact., 34, 401.
- Parr L. W. - (1934) J. Bact., 27, 42-43.
- Perry C. A. - (1929) Amer. J. Hyg., 10, 580.
- Rahn O. - (1929) Zentr.Bl.Bakt. II, 78, 1-21.
- Rogers L.A., Clark W.M. y Davis B.J. - (1914) J. Infect.Dis., 14, 411-425.
- Rogers L.A., Clark W.M. y Evans A.C. - (1914) J. Infect. Dis., 15, 99-123.
- Ruchhoft C.C., Kallas J.G., Chinn B. and Coulter E.W. - (1931) I. Bact., 21, 407-440 y 22, 125-181.
- Scholl H. - (1891) "Die Milch" Wiesbaden.
- Skinner C.E. y Brown J.W. - (1934) J. Bact., 27, 191.
- Smith Th. - (1895) Zentr.Bl.Bakt. I Orig., 18, 1-9.
- Smith Th. - (1895) Amer. J. Med. Science 11, 283-302.
- Singer E. - (1929) Zentr.Bl.Bakt., I Ref. 95, 385-405 y 433-449.
- Sordelli A. - (ver: Ferramola R. y Monteverde J.J.)
- Voges O. y Proskauer B. - (1898) Ztschrft.f.Hyg., 28, 20.
- Webster W.J. y Raghavachari T.N.S. - (1934) Indian J.med.Res., 21, 525.
- Weisser - (1886) Ztschrft.f.Hyg. I, 315-362.
- Werkmann C.A. y Gillen - (1932) J. Bakt., 23, 167.
- Williams W.L., Weaver R.H. and Scherago M. - (1933) Amer.J.Hyg. 17, 432.
- Wilson G.S. - (1935) The Bacteriological Grading of Milk, London.
- Winslow C.A., Kligler J.G. y Rothberg W. - (1938) Bol. J. Bact. 4, 429-501.