

Tesis de Posgrado

Medios de cultivo sólidos, utilizados para la investigación directa de bacterias coliformes en aguas : estudio de un nuevo medio para tal fin

Huerin, Raquel

1952

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Huerin, Raquel. (1952). Medios de cultivo sólidos, utilizados para la investigación directa de bacterias coliformes en aguas : estudio de un nuevo medio para tal fin. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0741_Huerin.pdf

Cita tipo Chicago:

Huerin, Raquel. "Medios de cultivo sólidos, utilizados para la investigación directa de bacterias coliformes en aguas : estudio de un nuevo medio para tal fin". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0741_Huerin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS, UTILIZADOS PARA LA
INVESTIGACION DIRECTA DE BACTERIAS COLIFORMES
EN AGUA.

ESTUDIO DE UN NUEVO MEDIO PARA TAL FIN

Resumen de la tesis para optar
al título de Doctor en Ciencias
Naturales presentada por

RAQUEL HUERIN

- 1 9 5 2 -

TESIS 1711

FOENBA.

RESUMEN

La determinación de bacterias coliformes, mediante siembra directa del agua en medios de cultivo sólidos no ha alcanzado gran difusión a pesar de las ventajas que reporta este método de examen. Ello se debe fundamentalmente a la falta de un medio de cultivo sólido que permita diferenciar con certeza bacterias que fermentan lactosa con producción de ácido y gas, propiedad esta última característica de las bacterias coliformes.

Las ventajas que se obtendrían si se dispusiera de un medio altamente selectivo y desprovisto de acción inhibitoria para las bacterias coliformes, serían apreciables, pues la cuenta de colonias en agar es un método más exacto que el de las diluciones sucesivas en medio líquido. Por otra parte sería posible conocer la distribución relativa de los distintos tipos coliformes en la muestra, dato que no es posible establecer usando medios líquidos, debido a la diferencia de velocidad con que desarrollan las distintas especies.

La rapidez con que se obtienen los resultados finales y lo innecesario de realizar numerosas diluciones para la siembra, son otras ventajas adicionales.

El medio que es objeto de este trabajo, presenta a nuestro juicio ventajas sobre los que se han propuesto para este fin y se basa en la observación que el ion fosfato (Ferramola) (1) influye favorablemente en la viabilidad y reproducción de las bacterias co-

(1) Comunicación personal.

FOYBA

liformes. Esta observación ha sido aprovechada por Leiguarda para mejorar el medio líquido de Mac Conkey, incorporándole fosfato de sodio, con lo que se logra disminuir su ligero poder inhibitorio sobre bacterias coliformes, sin alterar su alta selectividad.

Las experiencias se realizaron partiendo de un medio basal constituido por agar-peptona-extracto de carne-tornasol y lactosa.

Este medio, desprovisto de sustancias inhibitorias, pudo ser mejorado notablemente agregándole una cantidad apropiada de fosfatos alcalinos, lo que permitió el desarrollo de mayor número de colonias en siembras con suspensiones puras de bacterias coliformes.

Posteriormente, se investigó el comportamiento de agentes selectivos con el fin de eliminar en lo posible los organismos no coliformes y finalmente se estudió la influencia de la concentración de los componentes del medio (peptona, extracto de carne, lactosa) como también de la temperatura de incubación. Una serie de ensayos comparativos, efectuados con aguas de distinto origen permitió comprobar su eficiencia.

El medio definitivo tiene la siguiente composición: peptona 1 g., extracto de carne 0,6 g., fosfatos alcalinos 0,6 g., taurocolato de sodio 0,4 g., lactosa 1 g., agar 2 g., eosina amarilla (solución acuosa al 2 %) 2 ml., azul de metileno (soluc. acuosa al 0,325 %) 2 ml., agua destilada 100 ml.

Para la determinación de bacterias coliformes en una muestra de agua, se siembra una porción adecuada de ésta (5 ml, 1 ml. o el mismo volumen de una dilución decimal en agua esteril), se

FOEN-BA.

distribuye sobre la superficie del medio previamente solidificado en una caja de Petri y después de evaporar el exceso de agua a 37° C., se incuba durante 48 horas a la misma temperatura.

En el nuevo medio Esch. coli produce colonias de aproximadamente 0,5 cm. de diámetro (48 hs/ a 37° C.), chatas, secas de color violeta oscuro en toda la superficie y con reflejos metálicos. El Aerobacter aerogenes en cambio, origina colonias elevadas, mucoides, confluentes, de tamaño similar al anterior y de color violeta en el centro, pero blanquecinas en la periferia.

Los tipos intermediarios son de diferenciación incierta.

La distinta morfología que presentan las colonias de Esch. coli y A. aerogenes permite determinar en forma aproximada la distribución relativa de estos tipos coliformes en la muestra examinada.

La simplicidad de la preparación del medio y de la técnica de siembra son ventajas adicionales del nuevo medio.

MINISTERIO DE EDUCACION

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS, UTILIZADOS PARA LA INVESTIGACION

DIRECTA DE BACTERIAS COLIFORMES EN AGUAS

ESTUDIO DE UN NUEVO MEDIO PARA TAL FIN

Buterado
J.M.
26 X 1.52

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Naturales
presentada por

RAMON HUERLI

TRAB. FINAL: 741

FCFBA

Al Dr. Raúl Ferramola todo mi agradecimiento por el honor que me ha dispensado con su dirección y acertadas críticas en el transcurso del presente trabajo.

Mi reconocimiento al Señor Director del Laboratorio de Obras Sanitarias de la Nación Dr. Rogelio A. Trelles por su gentileza al permitir la realización de esta tesis en dicha dependencia.

OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO

La determinación de bacterias coliformes, mediante siembra directa del agua en medios de cultivos sólidos no ha alcanzado gran difusión a pesar de las ventajas que reporta este método de examen. Ello se debe fundamentalmente a la falta de un medio de cultivo sólido que permita diferenciar con certeza bacterias que fermentan lactosa con producción de ácido, de las que lo hacen con producción de ácido y gas, propiedad esta última característica de las bacterias coliformes.

Las ventajas que se obtendrían si se dispusiera de un medio altamente selectivo y desprovisto de acción inhibitoria para las bacterias coliformes, serían apreciables, pues la cuenta de colonias en agar es un método más exacto que el de las diluciones sucesivas en medio líquido. Por otra parte sería posible conocer la distribución relativa de los distintos tipos coliformes en la muestra, dato que no es posible establecer usando medios líquidos, debido a la diferencia de velocidad con que desarrollan las distintas especies.

La rapidez con que se obtienen los resultados finales y lo innecesario de realizar numerosas diluciones para la siembra, son otras ventajas adicionales.

El medio que es objeto de este trabajo, presenta a nuestro juicio ventajas sobre los que se han propuesto para este fin y se basa en la observación que el ión fosfato (Ferrasola ') influye favo-

(') Comunicación personal

NOTA

rablemente en la viabilidad y reproducción de las bacterias coliformes. Esta observación ha sido aprovechada por Leiguarda para mejorar el medio líquido de Mac Conkey, incorporándole fosfato de sodio, con lo que se logra disminuir su ligero poder inhibitorio sobre bacterias coliformes, sin alterar su alta selectividad.

CAPITULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Entre los medios sólidos utilizados en el análisis bacteriológico de aguas señalamos los siguientes, que dividiremos en dos tipos: 1º) Medios para confirmar la presencia de bacterias coliformes en un medio de enriquecimiento y 2º) Medios utilizados para la siembra directa del agua a analizar.

1º) Medios confirmatorios

Agar Endo: S. Endo en 1904 publicó los detalles para la preparación de su conocido medio destinado a identificar las bacterias del grupo coli-tífico.

La composición del medio es la siguiente:

Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	3.5 g.
Peptona	10.0 g.
Agar	30.0 g.
Agua destilada	1000 ml.
Lactosa C.P.	10.0 g.
Fucsina	5.0 g.
Solución de sulfito de sodio al 10 %	2.5 ml.
Solución de carbonato de sodio al 10 %	10.0 ml.

En este medio se observa que Esch. coli produce colonias de color rojo fucsina iridiscentes mientras que A. aerogenes muestra colonias de color rosado. Sh. dysenteriae y S. paratyphi dan colonias rojo pálido y S. typhi colonias incoloras.

Según Gennig y Thompson las distintas clases de organismos del grupo coli-tífico presentan distinto comportamiento en la fermentación de lactosa; aquellos organismos que fermentan lactosa con producción de ácido y de gas son capaces de restaurar el color de la fucsina decolorada, mientras que aquellos que sólo producen ácido presentan colonias de débil color rojo y las colonias de aquellos organismos que no fermentan lactosa permanecen incoloras.

Diferentes autores han sugerido modificaciones a este medio. Robinson y Rettger (1916) encuentran que el bisulfito usado como agente decolorante da resultados más satisfactorios que el sulfito de sodio y recomiendan su adopción.

Levine (1918) propuso una modificación mediante la cual no es necesario el ajuste de la reacción. Elevó la cantidad de fosfato de potasio a 5 g.

El mismo Levine en 1921 sustituye el fosfato dipotásico por extracto de carne, lo que permite obtener mejores resultados especialmente en la diferenciación de ciertas especies de las bacterias del grupo coliforme.

Algunos investigadores usan 1,5 a 2 % de agar en lugar del 3%; Levine utiliza 2% en su modificación.

En los años 1924-26-27 encuentran Gennig y Thompson 1º) que el pH del medio no debe ser menor de 7,4; 2º) que la fucsina debe standardizarse debido a su variable capacidad de decoloración por el sulfito de sodio y 3º) que la difusión del color en el medio de Endo es afectada por la peptona concluyendo que la peptona Wite produce mayor inhibición para la difusión del color, siendo menos inhibitoria la peptona Armour.

N. H. Harris (1925) llega a igual conclusión que Gennig al

afirmar que mejores resultados se obtienen cuando la reacción del medio varía entre pH 7,4 a 7,8.

Encuentra que el uso de una solución de 0,25% de sulfito de sodio tiene ventajas sobre una de 0,125 %, determinando además que la sensibilidad del medio a la luz en la mayoría de los casos depende de la clase de colorantes usados, considerando más ventajoso el uso de colorantes que contienen una mezcla de pararosanilina y rosanilina, en menor grado de la clase de peptona y por último las placas que contienen sulfito de sodio al 0,125 % son más susceptibles a la luz que aquellas que contienen 0,25 %.

Conn H. J. y Darrow M.A. (1934) standardizaron el medio de Endo y llegaron a la conclusión de que cualquier fucsina americana es satisfactoria cuando la proporción entre SO_2Na_2 y fucsina es de 12,5:1.

Agar Lactosa Tornasol: En el año 1917 el " Committee of the American Public Health Association " recomendó el siguiente medio de cultivo sólido para bacterias coliformes:

Agua destilada	1000 ml.
Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
Agar	12 g.
Lactosa (1 %)	10 ml.

y agregar por cada 10 ml. de agar, 1 ml. de solución estéril de tintura de tornasol momentos antes de introducirlo en cajas de Petri.

Meyer (1917) observó que otros organismos además de los coliformes crecen fácilmente en este medio y pueden llegar a cubrir la superficie de la placa.

Estos organismos impiden el crecimiento de las bacterias coliformes y enmascaran sus reacciones típicas dificultando el aislamiento de las colonias para su identificación.

Aconseja entonces Meyer el uso de un agar básico al 3% como el de Ende con 1% de peptona, 1% extracto de carne y por cada 400 ml. agregar 16 ml. de solución de lactosa al 25% y 12 ml. de solución estéril de tintura de tornasol al 8%.

Agar cocina azul de metileno. Estudios realizados entre los años 1918-1921 permitieron a Levine presentar un medio simple para ser empleado en la confirmación de ensayos presuntivos de bacterias coliformes en análisis de aguas. En este medio Esch. coli presenta colonias circulares planas, de centro oscuro de 2 a 1 mm. de diámetro que a la luz refleja, muestra un característico brillo metálico verdoso mientras que las de A. aerogenes son generalmente más grandes, convexas con centro pardo y que raramente exhiben un lustre metálico.

El mismo autor (1943) estudió el efecto de la concentración de los colorantes en la diferenciación de las bacterias entéricas e indicó la siguiente composición del medio:

Medio básico

Agar	15 g.
Peptona	10 g.
Fosfato hipotásico (K_2HPO_4)	2 g.
Agua destilada	1000 ml.

Medio diferencial

A 100 ml. del medio básico disuelto agregar

Lactosa (20% solución estéril)	5 ml.
Eosina amarilla (solución acuosa al 2%)	2 ml.
Amil de metileno (solución acuosa al 0,5%)	1,3ml.
(solución acuosa al 0,333%)	2 ml.

Las ventajas citadas para el medio son: 1º) la extrema simplicidad de preparación del medio ya que no se requiere ningún ajuste de reacción, ni filtración y 2º) la fácil diferenciación de los organismos Esch. coli y A. aerogenes de distinto significado sanitario.

Skinner y Murray (1924) encontraron que la adición de cristal violeta en la concentración de 1: 100.000 al medio eosina azul de metileno, inhibe el desarrollo de colonias no coliformes, mientras que las características de Esch. coli son más pronunciadas.

Agar Mac Conkey: Mac Conkey en el año 1908 propuso el siguiente medio:

Taurocalato de sodio	5 g.
Peptona	20 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.
Lactosa	10 g.
Rojo Neutro (soluc. acuosa al 1%)	10 ml.

En este medio las bacterias coliformes producen colonias circulares rojo oscuro, modificando el medio que rodea la colonia de co-

lor rojo a anaranjado.

Se ha encontrado que con el taurocolato de sodio comercial se obtienen mejores resultados que con el producto de gran pureza C.P.

Chalmers (1928) utiliza el medio Mac Conkey conteniendo como indicador 0,069 g. de púrpura de bromocresol por litro. Incuba de 24 a 48 horas a 37° C., presentando entonces las bacterias coliformes, colonias amarillas rodeadas por una zona de sales de bilis precipitadas.

2º) Medios para siembra directa de la muestra de agua.

Medio sintético de Ayers y Rupp: En el año 1918 Ayers y Rupp idearon un medio sintético simple en el que usaron una única fuente de nitrógeno, $\text{PO}_4(\text{NH}_4)\text{Na}_2$ y una única fuente de carbono, lactosa.

El medio tiene la siguiente composición: Solución I: $\text{PO}_4(\text{NH}_4)\text{Na}_2$ 0,4 %; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 %; Lactosa 1% disuelta en agua destilada.

Solución II: 3 % de agar en agua destilada.

Se mezclan partes iguales de ambas soluciones y en el momento de utilización se agregan 0,5 ml.% de una solución de fucsina básica al 1% y 0,5 ml. % de una solución recientemente preparada de sulfite de sodio. Como este último no llega a decolorar totalmente la fucsina, el medio toma color rosado.

Consideran el mejor tiempo de incubación 48 horas a una temperatura de 30° a 37° C. Un período de incubación mayor favorece el desarrollo de colonias no pertenecientes al grupo coliforme.

Las colonias coliformes son de tamaño medio, rojas, rodeadas por un anillo rojo oscuro, mientras que las no pertenecientes a este

grupo son generalmente rosadas o incoloras.

Los autores hacen notar que no es perfecta la acción selectiva del medio pero sí favorece el desarrollo de los organismos coliformes.

Señalan las siguientes ventajas:

- a) Aparente exactitud en la directa enumeración de las bacterias del grupo coliformes.
- b) Constancia de la composición del medio.
- c) Preparación simple
- d) Poco coste.

Agar eritrosina azul de metileno púrpura de bromo cresol: A un medio básico compuesto por peptona 10 g.; K_2HPO_4 2 g.; Mg_3PO_4 0,6 g. y Agar 20 g.; Salle (1930) incorpora colorantes selectivos e indicadores en la siguiente proporción:

Eritrosina (solución acuosa al 2%)	2 ml.
Azul de metileno (solución acuosa al 1%)	0,2 ml.
Púrpura de bromocresol (sol.alcoh. al 1%)	2 ml.

Debido a la combinación de la eritrosina y el azul de metileno las colonias de E. coli presentan brillo metálico, no así las de A. aerogenes.

E. coli cambia el color del púrpura de bromocresol al amaranjado, tomando este último color el agar que rodea a las colonias, mientras que A. aerogenes no afecta el color del indicador.

Henck H.D. (1935) encuentra que el agar Salle es poco satisfactorio para la identificación de E. coli.

Modificaciones al medio de Levine (E.A.M.)

Tomando como medio básico el agar eosina, azul de metileno de Levine se han propuesto tres modificaciones para su adopción a la siembra directa de aguas.

En Francia, Diénert y Etrillard (1930) recomiendan el uso de un medio sólido semejante al eosina azul de metileno con el agregado de 1 ml. por cada 100 ml. del medio de una solución de fenol al 5%.

Gahn y Henkelakian (1935) prepararon el medio standard de Levine pero elevando a 2% la concentración del agar, para hacerlo más consistente.

Extienden mediante una varilla de vidrio acodada 1 ml. de la muestra (o de su dilución) sobre la superficie del agar. Sin tapar la caja de Petri que contiene el agar la llevan a la estufa a 37° C durante una hora y una vez seca la tapan e incuban a 37° C durante 24 horas.

La contaminación en la estufa es prácticamente nula ya que los colorantes presentes en el medio inhiben el desarrollo de las bacterias del aire que pudieran caer sobre la superficie del agar.

Los autores aconsejan el recuento de placas que contienen entre 30 y 100 colonias y un período de incubación no mayor de 24 horas.

Este método ha sido particularmente adoptado para el control de líquidos cloacales muy contaminados, señalando que parece posible su adaptación para aguas de ríos no muy infectadas..

En 1936 Schulhoff y Henkelakian obtienen resultados satisfactorios, cuando el número de bacterias es relativamente reducido, agregando a 50 ml. de la muestra 1 ml. de una suspensión acuosa al 20% de caolín y después de centrifugar durante 20 minutos a 2500 r.p.m. decantan el líquido sobrenadante hasta dejar solo 5 ml. Lo mezclan con

el sedimento y siembran sobre la superficie del agar eosina azul de metileno (con 2% agar y 1: 120.000 de cristal violeta).

Agar ferrocianuro citrato: Basándose en los trabajos de Ayers y Rupp (1918), Koser (1923) y Muller (1922); Noble R.E. en 1928 ideó un nuevo medio para la siembra directa de aguas. En 1931 con Tonney F.O. perfeccionaron la fórmula llegando a un medio de la siguiente composición:

Solución A (aproximadamente 1 litro)

Sulfito de sodio C.P. anhidro SO_2Na_2	3.8 g.
Fosfato monopotásico C.P. PO_4KH_2	7.5 g.
Fosfato de sodio y amonio C.P. $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{NH}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	45.4 g.
Agua destilada estéril	757 ml.
Solución de lactosa al 20% estéril	200 ml.
Solución de fucsina básica al 4% en alcohol de 95 %	18 ml.
Solución de ferrocianuro de potasio $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al 9%	25 ml.

Solución B

Solución de citrato férrico al 1.33 %.

Para preparar el medio se agrega 10 ml. de la solución A a 100 ml. de Agar " Difco" especial al 1,75 % (1) se mezcla y luego se agrega 3 ml. de la solución B.

(1) El agar "Difco" especial, es un agar preparado según las siguientes indicaciones de Noble: 30 g. de agar común se suspenden en 2000 ml. de agua destilada durante 24 horas. Se agita, se decarga el agua y se agrega al residuo otros 2000 ml. de agua destilada. Se repiten estas operaciones hasta el 4º día, en que se agrega la cantidad de agua necesaria para llevarlo a la concentración deseada. La preparación de la solución se efectúa en el menor tiempo posible a fin de reducir la influencia desfavorable del calor. Períodos de lavado inferiores pueden no eliminar suficientemente ciertas sales, probablemente de calcio y magnesio, que ejercerían una acción inhibitoria sobre las bacterias. Un período más largo de lavado, reduce la propiedad solidificante del agar.

Estos investigadores aconsejan para la lectura de las placas el uso de luz indirecta y para tal fin idearon una cámara especial, presentando entonces las colonias coliformes un fondo rojizo en contraste con las formas extrañas.

Las ventajas que anotan para este medio son las siguientes:

- 1º) El índice coliforme se obtiene en 42-48 horas y es de mayor seguridad que el que se obtiene sembrando en caldo lactosado.
- 2º) El recuento no es interferido por organismos que comúnmente fermentan lactosa.
- 3º) Es superior este medio al de Endo o Boscina azul de metileno para obtener cultivos puros de Esch. coli ó A. aerogenes cuando se utiliza el método de siembra con estría.
- 4º) Es factible la diferenciación de los tipos Esch. coli y A. aerogenes basada en la apariencia de las colonias y de un tercer grupo intermediario (1932).

Nolte y Kramer (1933) indican que el agar-ferrocianuro citrato es impropio para aguas de alta pureza, no dando los organismos del grupo coliforme colonias características.

Schulheff y Henkelakian (1936) señalan que otros investigadores no han tenido éxito en el uso de este medio, ya que se requiere mucho cuidado en el manejo del agar y es necesaria considerable experiencia para la diferenciación entre el grupo fecal y no fecal.

Como resultado de un estudio cooperativo realizado en varios laboratorios se ha concluido que el medio agar ferrocianuro citrato no es adaptable para el uso general siendo sólo recomendable para estudios especiales, habiéndose obtenido un índice de Esch. coli en este medio, superior al que se obtiene con el método Standard (A report

from the Standard Methods Committee (1937)

Medio de Lumbau: Lumbau en 1931 propuso un nuevo medio de cultivo para la determinación del Esch. coli compuesto de agar común lactosado al que agrega 0,005 % de fenol; usa como indicadores 1 ml de rojo fenol, 1 ml. de púrpura de bromocresol y 1 ml. de azul de bromotinal.

Las colonias se presentan amarillas sobre el fondo azul del medio.

Medio de Fleury: En el mismo año Fleury utilizó en Francia el siguiente medio:

Peptona	30 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Lactosa	15 g.
Agar	15 g.
Gelatina	60 g.
Agua destilada	900 ml.
Rojo Congo	2 g.

Después de 2-3 días de incubación a 25°-30° C., las colonias de Esch. coli aparecen muy netas en color azul claro sobre un fondo rojo grosella y las de S. typhi de color rojo oscuro y más pequeñas.

Agar bilis verde brillante lactosa: Noble y Tomney (1935) obtuvieron en base al caldo bilis lactosa verde brillante el siguiente medio sólido:

Peptona Difco	16,5 g.
Lactosa C.P.	3,8 g.
Solución de bilis desecada al 0,5% Difco	11,8 ml.

Solución reciente de sulfite de sodio anhidro C.P. al 10%	4,1 ml.
Solución de cloruro férrico al 1%	8,9 ml.
Solución reguladora de fosfatos	0,9 ml.
Solución de erio Glaucina al 22%	5,9 ml.
Solución de fucsina básica al 4,25%	3,65 ml.
Solución de verde brillante al 0,001%	5,9 ml.
Agar	20,3 g.
Agua destilada	947 ml.

Las bacterias coliformes producen colonias con centro color rojo oscuro con un halo finamente esbozado que se destaca sobre el fondo azul del medio.

El diámetro del halo es directamente proporcional al tamaño de la colonia y varía desde una delgada línea alrededor de la colonia hasta 0,45 mm. de espesor.

El diámetro de las colonias varía de 0,4 a 0,8 mm. Ocasionalmente durante la incubación, el azul del medio adquiere leves sombras púrpuras que según los investigadores no han interferido, en sus experiencias, con la identificación de las colonias coliformes.

Agar citrato desoxicolato: Un nuevo medio de cultivo para el aislamiento de las bacterias intestinales patógenas y para el recuento de las bacterias coliformes en la leche y en el agua fué publicado por Leifson E. (1935).

En este medio las colonias de Esch. coli de origen fecal o del suelo son fuertemente coloreadas y fáciles de distinguir de las de A. aerogenes, que son rosadas o poseen un centro rojo con un halo incoloro y de las colonias de los no fermentadores de lactosa que son

incolores.

La composición del medio es la siguiente:

Agua	1000 ml.
Peptona	10 g.
Agar	12-17 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Lactosa	10 g.
Citrato de hierro y amonio	2 g.
Fosfato dipotásico	2 g.
Descarboxilato de sodio	1 g.
Rojo neutro	0,033 g.
pH	7,3 a 7,5

Medio sintético de Perelli: Tomando como base el medio de Koser-Simmons, Perelli C. en 1936 publicó un nuevo medio sintético para la diferenciación de Esch. coli de A. agrocyana.

La composición del medio es la siguiente:

Agar	2 g.
Citrato de sodio	0,25 g.
Agua destilada	100 ml.
Solución de ácido pí- rico al 1%	0,5 ml.
Solución de verde mala- quita al 0,2 %	2,0 ml.
Solución de azul de bromotinaol al 1,5%	0,5 ml.

Esch. coli desarrolla en este medio pero sin modificarlo

su color, mientras que el A. aerógenus presenta colonias en forma de gota de rocío y el medio toma color azul en el lapso de 24 horas a 37° C.

Agar citrato ricinoleato: Littman y Stark (1938) siguiendo el informe de Stark y England (1935) que fueron los primeros en aplicar el ricinoleato de sodio (inhibidor para organismos no coliformes) en la determinación de bacterias coliformes en la leche y agua, idearon un nuevo medio de cultivo incorporándole dicho componente.

El medio para el examen de aguas es el siguiente (para 100 ml.)

Peptona	0,5 g.
Citrato de sodio	0,3 g.
Nitrato de sodio	0,2 g.
Ricinoleato de sodio	0,1 g.
Lactosa	0,2 g.
Agar	1,5 g.
Leche desnatada en polvo	0,6 g.
Rojo neutro	0,005 g.
Azul de bromotimal	0,005 g.

Pueden distinguirse tres grupos distintos en los organismos intestinales capaces de producir colonias en el agar citrato ricinoleato. El primer grupo compuesto por Esch. coli, Esch. communis y S. typhi produce colonias rojas a las 24 horas, que no varían después de una prolongada incubación.

Bacterias pertenecientes a los géneros Aerobacter, Salmon-

Illa y Shigella constituyen el segundo grupo que producen en 24 horas colonias rojas rodeadas por anillos de color azul verdoso o bien son enteramente azul verdosas, dependiendo de la actividad de la colonia que produce cambios en la alcalinidad del medio actuando sobre el citrato de sodio.

A los géneros Protéus, Serratia y Pseudomonas pertenecen los organismos del tercer grupo.

Los dos primeros dan en 24 horas colonias rojas con anillos azules o bien son enteramente azules; Pseudomonas, es generalmente azul verdosa.

Se caracteriza este grupo por ser marcadamente proteolítico. La proteólisis de la caseína es puesta en evidencia por zonas claras que rodean la colonia.

Agar Mac Conkey: Babudien (1938) después de realizar un estudio comparativo sobre la determinación del número de Esch. coli utilizando Agar lactosa tornasol, Agar lactosa Rojo Congo y Agar taurocolato de Na (Mac Conkey), recomienda el uso de este último medio.

Medio de Hostettler: Hostettler (1941) utiliza en el análisis de agua un medio usado en el análisis de la leche y cuyos componentes son los siguientes:

Peptona	10 g. per litre
Lactosa	10 g. " "
Sales biliares	1 g. " "
Extracto de levadura	5 g. " "
Agar	15 g. " "
Rojo neutro	0,05 g. " "
Cristal violeta	0,004 g. " "

En este medio las colonias coliformes bajo la superficie son de 1-2 mm. de diámetro rojas rodeadas por una zona rosada formada por la precipitación de sales biliares por los ácidos producidos durante la fermentación de la lactosa.

No son coliformes las colonias rojas, de menos de 0,5 mm. de diámetro y sin halo.

Considera el autor que sólo debe utilizarse como correcto el recuento a las 24 horas de incubación, pues una incubación más prolongada permite el desarrollo de otros organismos que confunden el recuento.

Medio de Chapman: En 1947 Chapman empleó un nuevo medio de cultivo para el recuento y diferenciación del grupo coliforme.

Para un litro de medio los componentes son los siguientes:

Extracto de levadura Difco	3 g.
Proteosa	3 g.
Peptona	5 g.
Lactosa	10 g.
Agar	15 g.

Se ajusta el pH a 6,9 y se agrega 0,1 ml de tergitol - 7 y 2,5 ml. de azul de bromotimol al 1 %. Se incuba durante 20 horas a 37° C.

Esch. coli da colonias amarillas rodeadas de zonas amarillas.

Aerobacter aerogenes da colonias verde-amarillentas algo mayores que las anteriores y generalmente rodeadas por zonas amarillas.

Los paracoli y los no fermentadores de lactosa dan colonias rodeadas de zonas azules. Según el autor los recuentos son 30 % mayores que en otros medios selectivos.

CAPITULO III

PORTE EXPERIMENTAL

De acuerdo a lo expuesto en el capítulo I se organizó el siguiente plan de trabajo:

- 1.- Comparación de la eficiencia de varios medios sólidos conocidos.
- 2.- Influencia del ión fosfato en el agar lactosa tornasol.
- 3.- Influencia de la concentración de peptona y de extracto de carne en el agar lactosa tornasol.
- 4.- Comparación del agar lactosa tornasol modificado con el agar eosina azul de metileno de Levins.
- 5.- Acción de agentes selectivos para bacterias coliformes.
- 6.- Aplicabilidad del medio para las bacterias coliformes del agua.
- 7.- Selectividad del medio para las bacterias coliformes.
- 8.- Ensayos complementarios. Influencia de la temperatura, de la concentración de lactosa y del agregado de triptosa.

A continuación se detalla las experiencias y los resultados obtenidos correspondientes a cada uno de los tópicos enumerados.

1.- Comparación de la eficiencia de varios medios sólidos conocidos

A fin de poder llegar a obtener un medio sólido selectivo para las bacterias coliformes y al mismo tiempo inhibitorio para las no pertenecientes a este grupo que pudieran encontrarse en el agua, iniciamos los ensayos tratando de encontrar primero uno desprovisto en absoluto de acción inhibitoria.

Ello nos permitiría determinar la concentración de una suspensión cualquiera de organismos coliformes en agua estéril, condición indispensable para realizar cualquier ensayo cooperativo. La siembra de una suspensión de bacterias en un medio sólido conveniente, es el único método adecuado para evidenciar sólo las bacterias viables, pues los métodos turbidimétricos aparte de su inexactitud determinan tanto los organismos vivos, como los muertos, inconveniente este que también presenta el método de recuento directo en cámara de Thoma.

Se iniciaron los ensayos comparando la eficiencia de varios medios sólidos conocidos.

Se ensayaron en un principio los siguientes:

1) Agar extracto de carne; 2) Agar lactosa tornasol; 3) Agar eosina azul de metileno (Levine); 4) Agar Endo; 5) Agar Mac Conkey y 6) Agar Salle.

La composición del agar extracto de carne fué la utilizada para las determinaciones de bacterias aerobias del agua según los métodos de los Am. Water Works Assoc. de E. U. y el de Obras Sanitarias de la Nación de nuestro país.

Este medio contiene 0,5 g. % de peptona y 0,3g. % de extracto de carne y 1,5 g. % de agar. A este medio se le agregó luego 1 g. % de lactosa y tornasol en c/s. para obtener el medio 2. La composi-

ción de los medios restantes se detalla en el apéndice.

A partir de cultivos puros de 24 horas en agar extracto de carne de distintas cepas de E. coli y A. aerogenes se prepararon suspensiones homogéneas en agua estéril, realizándose seguidamente sucesivas diluciones decimales.

A 1 ml. de las diluciones quinta o sexta (aproximadamente 100-500 bacterias) dispuestas en cajas de Petri se agregaron los distintos medios ensayados fundidos. Cubiertas y agitadas las cajas sumamente con el fin de lograr una mejor distribución de la muestra fueron incubadas a 37° C. en posición invertida, previa solidificación de los medios.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se detallan en el cuadro N° 1.

CUADRO N° 1

DETERMINACION DEL NUMERO DE BACTERIAS COLIFORMES EN SUSPENSION
PARA EN VARIOS MEDIOS SOLIDOS Y LIQUIDOS (INCUBACION: 48 hs. -37°C.)

Organismos	Agar Común	Agar Lac- tosa Tornas.	E A M	BTDC	MAC CONKEY	SALTE
<i>Esch. coli</i> cepa 1	193	137	290	239	143	-
"	103	99	370	289	306	273
"	13	11	239	133	128	40
"	278	223	342	302	255	310
"	-	-	210	215	207	13
"	20	-	131	126	79	48
"	8	-	12	46	34	-
<i>Esch. coli</i> cepa 2	89	-	341	257	248	-
"	325	232	385	318	365	86
"	15	13	251	228	227	138
"	342	208	340	342	318	335
"	148	113	316	158	228	82
"	223	128	274	249	236	184
"	148	-	240	225	250	-
<i>Esch. coli</i> cepa 3	168	69	192	121	129	-
"	250	107	320	322	298	220
"	-	-	239	196	215	90
"	207	140	370	329	287	279
"	232	150	310	279	345	162
"	122	58	190	275	255	96
"	276	83	261	249	273	32
<i>Esch. coli</i> cepa 4	-	298	-	303	199	-
"	93	225	239	261	235	-
<i>A. aerógena</i> cepa 1	22	45	482	-	-	-
"	191	190	363	-	-	-
<i>A. aerógena</i> cepa 2	15	15	17	-	-	-
"	69	83	731	-	-	-
Total	3504	2674	7315	5362	5159	2378
Promedio	139	116	271	232	224	118

Como puede observarse el agar extracto de carne y el agar lactosa tornasol a pesar de carecer de agentes inhibidores acusan en estos ensayos resultados inferiores a los del medio eosina azul de metileno e incluso a los de los medios restantes.

A fin de mejorar las condiciones nutritivas del agar lactosa tornasol se han ^{efectuado} utilizado algunos ensayos, modificando su composición en la forma que se detalla a continuación.

2.- Influencia del ión fosfato en el agar lactosa tornasol.

Antes de modificar la concentración de los constituyentes de este medio, investigamos la influencia que pudiera tener la presencia de fosfatos. La acción de este ión es marcadamente favorable para el desarrollo de ciertos microorganismos y en el caso de las bacterias coliformes existen antecedentes al respecto (Leiguarda R., 1941).

Para ello se realizaron una serie de ensayos que consistieron en preparar agar lactosa tornasol agregando cantidades crecientes de fosfatos alcalinos. En cada uno de estos medios se sembraron suspensiones puras de bacterias coliformes y se hizo el recuento de colonias después de 48 horas de incubación a 37° C..

Los fosfatos utilizados fueron el monopotásico y el bisódico en cantidades tales que comunicaran al medio un pH 7 y en cuanto a la composición del medio fué la indicada anteriormente.

El cuadro Nº 2 reúne los resultados obtenidos en estos ensayos. De cada tipo coliforme se ensayaron 4 cepas (recién obtenidas de aguas), las que fueron suspendidas en agua estéril hasta obtener una concentración de 200-700 organismos por ml. aproximadamente. Un ml. de esta suspensión se depositó en cajas de Petri y se fué agregan-

do a cada una el medio correspondiente.

CUADRO N° 2

INFLUENCIA DE LA MEZCLA REGULADORA DE FOSFATOS ($PO_4HNa_2 + PO_4H_2$)
SOBRE EL DESARROLLO DE BACTERIAS COLIFORMES. (INCUB. 48 hs.-37° C)

Suspensión de	Colonias obtenidas en medios con fosfatos en concentra- ción.							
	0%	0,2%	0,4%	0,6%	0,8%	1,0%	1,2%	1,4%
Each coli (co- pa 1)	220	230	310	435	470	365	305	310
" " " 2	212	316	370	395	330	350	295	295
" " " 3	315	320	430	510	515	390	405	390
" " " 4	120	220	225	365	350	305	230	242
A. aerógenas (copa 1)	430	520	610	725	620	695	605	510
" " " 2	310	415	455	490	475	455	405	475
" " " 3	150	312	325	395	390	295	270	275
" " " 4	210	360	410	490	475	492	415	320
Intermediarias: tipo I (copa 1)	490	590	595	720	690	694	690	650
" I " 2	233	390	420	510	490	505	480	485
" II " 1	303	422	495	610	570	585	590	505
" II " 2	175	232	295	315	305	294	290	294

Puede apreciarse a través de los resultados obtenidos en tá-
dos estos ensayos que existe evidentemente una acción estimulante del
ión fosfato en el desarrollo de las colonias. Esta acción aumenta
con la concentración de fosfatos hasta llegar a un máximo que se apre-
cia cuando el contenido de fosfatos llega a 0,6 % aproximadamente.

A partir de esa concentración, el número de colonias se man-
tiene estacionario, o comienza a disminuir ligeramente.

En los ensayos posteriores, se ha mantenido por lo tanto
la concentración de 0,6% de fosfatos en el medio basal.

3.- Influencia de la concentración de peptona y de extracto de carne en el agar lactosa torrensol.

Antes de proseguir con los ensayos destinados a estudiar la actividad de algunos agentes selectivos para las bacterias coliformes, se investigó la influencia de la concentración de peptona y del extracto del carne.

Las concentraciones utilizadas en los ensayos anteriores son las que se acostumbra para el agar destinado al examen sanitario del agua. Fueron aumentadas en un 100% como aconsejan Hodge (1917), Percival (1920), Rogers, Clark y Evans (1914); a fin de obtener un medio más enriquecido en nutrientes, y a una porción del medio resultante se le agregó 0,5% de fosfatos.

Los medios así enriquecidos se utilizaron para efectuar recuentos comparativos con los anteriores, empleando 6 suspensiones (2 de cada tipo coliforme) todas de cepas distintas. Los resultados obtenidos, se detallan en el cuadro Nº 3.

CUADRO Nº 3

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE PEPTONA, EXTRACTO DE CARNE Y FOSFATOS EN EL DESARROLLO DE COLONIAS EN AGAR LACTOSA TORRENSOL (INUB. 48 ha. a 37° C.)

Organismo	Colonias obtenidas en			
	A.L.T.(1)	A.L.T. (2)	A.L.T. + 0,5% fosfatos (1)	A.L.T. + 0,5% fosfatos (2)
<i>Esch. coli</i>	142	288	270	394
"	88	142	148	198
<i>A. aerogenes</i>	298	488	488	510
"	128	172	240	288
Intermediario I	132	281	282	278
" II	88	84	88	80

- (1) Agar lactosa torrensol con 0,5% de peptona y 0,5% de extracto de carne.
 (2) Agar lactosa torrensol con 1 % de peptona y 0,5% de extracto de carne.

La influencia del aumento de la concentración de peptona y del extracto de carne es evidente y por ello en las experiencias posteriores se ha mantenido esta concentración.

4.- Comparación del agar lactosa tornasol modificado, con el agar eosina azul de metileno de Levine.

El medio resultante (agar lactosa tornasol más 0,6% de fosfatos) fué comparado entonces con el agar eosina azul de metileno de Levine, que de acuerdo con los primeros ensayos realizados fué el que mostró menor poder inhibitorio.

Para ello y siguiendo la técnica utilizada en ensayos anteriores se prepararon suspensiones de Esch. coli y A. aerogenes en agua estéril, que se sembraron en los dos medios.

Los resultados obtenidos se detallan en el siguiente cuadro (Nº 4) donde puede apreciarse la similitud de los resultados obtenidos. Si hubiese alguna ventaja sería en favor del agar lactosa tornasol con fosfatos.

CUADRO Nº 4

COMPARACION DEL NUMERO DE COLONIAS EN AGAR LACTOSA TORNASOL CON 0,6% DE FOSFATOS Y EN AGAR EOSINA AZUL DE METILENO (INCUB.: 48 hs - 37º C.)

Organismo	Colonias obtenidas en	
	agar eosina azul de metileno	agar lactosa tornasol con 0,6% de fosfatos
A. aerógenes	132	152
" "	192	193
" "	121	123
" "	317	395
" "	192	201
Esch. coli	37	81
" "	210	210

5.- Acción de agentes selectivos para bacterias coliformes

Utilizando el medio basal constituido por peptona 1 g.; extracto de carne 0,6 g.; fosfato monopotásico 0,21g.; fosfato bisódico 0,39 g. y agar 2 g. se ensayó el agregado de agentes selectivos para las bacterias coliformes. Esto es necesario para inhibir el desarrollo de bacterias no coliformes, especialmente esporuladas aerobias que fermentan lactosa y que abundan en las aguas.

Dos tipos de agentes han sido los más usados para este fin: colorantes derivados del trifenilmetano y sustancias tóxicas activas. Varios medios de enriquecimiento y de aislamiento para bacterias coliformes utilizan estos productos con resultados variables. En general hay dificultad en encontrar sustancias suficientemente selectivas que impidan el desarrollo de bacterias ajenas al grupo coliforme, sin ejercer simultáneamente una acción inhibitoria sobre estas. De ahí la tendencia en algunos países en no usar medios selectivos de enriquecimiento para la siembra primaria del agua donde a veces el número de organismos coliformes es reducido. Estas sustancias tienen en cambio gran aplicación en los medios de aislamiento, donde la siembra se efectúa con gran cantidad de material.

La propiedad de ciertos colorantes de impedir el crecimiento de bacterias es en realidad conocida desde hace muchos años cuando Koch y Uffelmann (1891) encontraron que el violeta de metilo añadido a un medio nutritivo con gelatina ácida permitía aislar Esch. coli sin el crecimiento de organismos contaminantes.

Churchman (1912) halló que el violeta de genciana era mucho más tóxico para los organismos Gram positivos que para los Gram negativos.

Desde entonces numerosos fueron los trabajos publicados se-

bre la acción inhibitoria de los colorantes.

Churchman reconoció que en muchos casos el efecto de los colorantes sobre las bacterias era más inhibitor que germicida y que variando las cantidades de los colorantes se pueden producir: 1) cesación de la motilidad; 2) inhibición de la reproducción; 3) suspensión de la vitalidad; 4) inhibición de la esporulación.

La acción selectiva de los colorantes sigue estrechamente las características de la coloración de Gram y está íntimamente asociada con el punto isoelectrico de los constituyentes de la célula bacteriana.

Esto es más bien limitado para las células Gram positivas cuyo punto isoelectrico está alrededor de un pH 2 a 3, mientras que es más amplio para las células Gram negativas que lo tienen a un pH aproximadamente 5. Tiene especial significado para los colorantes básicos que son más activos en medios alcalinos y específicos para los organismos Gram positivos; mientras que los colorantes ácidos son más activos en medios ácidos y sobre organismos Gram negativos.

Tan pronunciado es el efecto del pH sobre la acción de los colorantes, que toda manifestación de los poderes inhibitorios de los colorantes sin mencionar el grado de alcalinidad o acidez prácticamente carece de significado.

Stearn y Stearn (1926) mostraron mediante una serie de experimentos, el efecto del pH sobre la toxicidad de los colorantes.

Encontraron que los colorantes básicos ejercían mayor acción inhibitoria sobre el crecimiento a medida que aumentaba la alcalinidad del medio.

Con los colorantes ácidos se notó una acción inversa, es decir que era más inhibido el crecimiento en medios más ácidos.

ficha

Los colorantes más utilizados en la preparación de medios de cultivo son los siguientes:

Verde brillante: Este colorante se usa extensamente como agente selectivo en los medios bacteriológicos destinados al examen del agua, especialmente en los medios con bilis.

Parr y Caldwell (1933) hallaron que 2% de bilis de buey y 1: 75,000 de verde brillante era satisfactorio para inhibir el crecimiento de Cl. welchii, organismo frecuente en aguas contaminadas.

Salmonella typhi es más resistente a la acción del verde brillante. Dehler y Havens (1936) usaron 2 por ciento de bilis de buey y 1: 10,000 de verde brillante para inhibir el desarrollo de organismos coliformes en las muestras de materias fecales. Esta concentración parece no inhibir en absoluto S. typhi.

Cristal violeta: El violeta de geniana es la forma impura del cristal violeta, al cual debe sus propiedades bacteriostáticas. Ambas formas, pura e impura se usan frecuentemente como agentes selectivos bacteriostáticos.

Como otros colorantes de la serie del trifenilmetano, la concentración que tiene acción bacteriostática depende del medio en que son utilizados.

A fin de reducir el número de falsos resultados positivos debidos a los organismos Gram positivos, se recomienda en los exámenes de agua agregar al caldo lactosado, cristal violeta para el ensayo de confirmación. Cada litro de caldo contiene 0.00143 g. de cristal violeta y el pH del medio se eleva a 7.4.

Slanetz y Rettger (1923) observaron que las bacterias fusiformes Gram negativas son notablemente resistentes al cristal violeta.

Estos organismos desarrollan en medios que contienen 1: 2000 de cristal violeta; aunque medios que contienen 1:5000 a 1:20.000 dan crecimiento más abundante.

Cruickshank encontró que Lact. bifidus era capaz de tolerar concentraciones de cristal violeta de 1: 100.000 y que una concentración de 1: 1.000.000 bajo las mismas condiciones inhibía completamente el Staph. aureus. En tanto Chapman y Berens (1935) observaron que cepas tóxicas del Staph. aureus crecían en agar lactosa proteosa conteniendo cristal violeta en una concentración de 1: 300.000. Siendo ambos organismos Gram positivos, esto indicaría que otros factores además de la reacción de Gram influyen en la susceptibilidad de las bacterias a los colorantes.

Weiss y Rettger (1934) no pudieron confirmar estos resultados y hallaron que una concentración de 1: 1.000.000 de cristal violeta en agar, inhibía casi completamente el crecimiento de L. bifidus y L. acidophilus mientras que el Staph aureus era aún más sensible.

Anteriormente en 1926 Weiss y Weiss determinaron que una dilución de 1: 100000 de cristal violeta impedía el crecimiento de contaminantes Gram positivos en cultivos de espiroquetas y al mismo tiempo era un estimulante para el crecimiento del T. pallidum.

A pesar que los organismos ácido-resistentes retienen la coloración del Gram y son considerados Gram positivos, muestran un notable grado de resistencia al cristal violeta y otros colorantes básicos afines. Esta acción selectiva ha sido usada para preparar medios para el aislamiento de Myc. tuberculosis de tejidos que se saben infectados con otros organismos Gram positivos.

en literatura

Azul de metileno: Fue uno de los primeros colorantes usados clínicamente. Erlich notó la rapidez con que el azul de metileno detenía los plasmodios de la malaria e indicó su uso para la cura de esa enfermedad.

En 1928 Hinman halló que en dilución 1: 10 era incapaz de destruir en 25 minutos, estafilococos, estreptococos y aún a Escherichia coli. Sin embargo soluciones relativamente diluidas fueron capaces de inhibir el crecimiento de varios organismos; siendo, las diluciones inhibitorias de 1: 150.000 para los estafilococos, 1: 80.000 para los estreptococos y de 1: 1000 para Escherichia coli.

Weiss y Weiss encontraron que la dilución de 1: 1000 de azul de metileno no inhibía a Esch. coli y T. pallidum mientras que a los estafilococos sí.

Eosina y azul de metileno: El uso del agar eosina azul de metileno como medio diferencial del grupo coli-tifi-disentérico ha sido bien establecido en la práctica bacteriológica desde su introducción por Helt-Harris y Teague (1916) y su posterior modificación por Levine en 1918.

Wilson (1907) ha sugerido que la acción inhibitoria era debido a la acción directa del compuesto eosina-azul de metileno, lo que ha sido confirmado en un detallado trabajo efectuado por Wynne, Rede y Hayward (1942).

Estos investigadores encontraron que el color de las colonias coliformes en el agar eosina azul de metileno dependía de dos factores: 1) La combinación de la eosina con el azul de metileno para formar un colorante compuesto, de naturaleza ácida e neutra y 2) la producción por las colonias fermentadoras de lactosa, de un pH suficientemente bajo para que este colorante compuesto, sea fijado por las cé-

lulas individuales de la colonia.

Además de los colorantes se han utilizado otras sustancias para inhibir el desarrollo de bacterias que acompañan comúnmente a las coliformes.

Así por ejemplo la aplicación de los detergentes ha tomado gran incremento en los últimos años. Su uso está vinculado con el conocimiento de la acción bactericida y bacteriostática de las soluciones jabonosas.

Los factores influyentes en la actividad de estas soluciones son: a) los radicales grasos presentes en la molécula; b) el estado de saturación de los constituyentes ácidos grasos; c) la temperatura y la concentración de las soluciones cuando son aplicadas a las células bacterianas; d) la cantidad de materia extraña presente.

Los organismos varían considerablemente en su resistencia por ejemplo: los neumococos son muertos por cortas exposiciones a bajas concentraciones de jabón; los estreptococos patógenos también serían susceptibles.

Hay uniformidad de criterio en que los estafilococos son más resistentes, mientras que los bastones Gram negativos no esporulados del grupo coli-tífico no son relativamente afectados por soluciones diluidas de la mayoría de los jabones.

Las células vegetativas de muchos bacilos Gram positivos son fácilmente destruidos por el jabón, mientras que sus esporas son resistentes. Los organismos ácido-resistentes relacionados con Mycobacterium tuberculosis parecen ser resistentes.

Sería largo e innecesario para los fines de este trabajo mencionar la copiosa bibliografía que existe sobre la acción bacteriostática de los jabones. Sólo destacaremos los trabajos de: Reaucuer(1917),

Norton (1920), Walker (1926), Eggerth (1927), Bayliss y Halverson (1936), Klarman y Shternov (1941), Mc Culloch y Fuller (1941), Stock y Francis (1943) que en definitiva llegan a las siguientes conclusiones:

- a) Las soluciones jabonosas son altamente desinfectantes destruyendo los organismos patógenos más frecuentemente hallados.
- b) El valor de sus propiedades germicidas depende de la constitución química de las grasas que lo forman.

Experiencias realizadas permitieron comprobar que mientras el estearato, palmitato y miristato de potasio son efectivos para eliminar a E. coli, el oleato y linoleato eran inactivos.

El laureato de sodio aún en altas diluciones actúa sobre los neumococos, estreptococos, aunque su efecto es menor, sobre las bacterias tifoides. Las sales de ácidos grasos no saturados (oleico, linólico y linoleico) tienen también acción sobre los primeros y son totalmente inertes contra los bacilos tifoides.

También tienen acción germicida, el ricinoleato y las sales biliares, etc.

- c) Algunas sustancias presentes en los jabones interfieren la acción bactericida de los mismos, siendo citadas entre ellas algunos lípidos, proteínas y en menor grado las sales cálcicas. Las mezclas de jabones con fenoles que a menudo se encuentran en el comercio y donde la cantidad de jabón excede enormemente la cantidad de fenol, se encontró que el jabón interfiere aparentemente la acción desinfectante.
- d) Experiencias realizadas con organismos en tubos de ensayo y expe-

riencias de lavado de manos permitieron asegurar que para fines prácticos el uso de jabones comunes tiene mayor valor germicida que los llamados jabones desinfectantes o medicamentosos.

Conocida la acción bactericida de los detergentes amoniacales y ca ténicos por los trabajos de Domagh (1935), Katz y Lipsitz (1935 y 1937), Shelton (1940) su uso se extendió rápidamente.

En general todos los detergentes son efectivos en altas diluciones contra ciertos tipos de organismos. Unos pocos parecen ser efectivos contra todas las bacterias patógenas, aunque en menor grado contra los virus.

La tabla que a continuación transcribimos que pertenece a un trabajo de Baker, Harrison y Miller (1941), resume la acción desinfectante de los detergentes más utilizados actualmente para algunos microorganismos.

ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS DETERGENTES SINTETICOS A 38° C.

(BAKER, HARRISON Y MILLER, 1941)

Tipo	Detergente	Tiempo de expos.: 10 minutos				Tiempo de expos.: 90 minutos			
		Concentrac. de los detergentes				Concentrac. de los detergentes			
		1:1000	1:3000	1:6000	1:30.000	1:1000	1:3000	1:6000	1:30.000
Crecimiento del <u>Staph.aureus</u> después de su exposición a los deter- gentes.									
Catiónico	Zephiran	-	-	-	♦	-	-	-	-
"	Phemerol	-	-	-	♦	-	-	-	-
"	Retarder L.A.	-	-	-	♦	-	-	-	-
"	Emulsol-605	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Catol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-607	-	-	♦	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-660 B	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Damol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-609	-	-	-	♦	-	-	-	♦
Aniónico	Cetyl sulfate	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Myristylsulfate	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Duponol L.S.	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Tergitol-8	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Triton W-30	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Igepon T	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Tergitol-7	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
"	Tergitol-4	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Crecimiento del <u>Streptococcus</u> después de su exposición a los de- tergentes									
Catiónico	Zephiran	-	-	-	-	-	-	-	-
"	Phemerol	-	-	-	♦	-	-	-	-
"	Retarder L.A.	-	-	-	♦	-	-	-	-
"	Emulsol-605	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Catol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-607	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-660 B	-	-	♦	♦	-	-	-	♦
"	Damol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-609	♦	♦	♦	♦	-	-	-	♦
Aniónico	Cetyl sulfato	?	♦	♦	♦	?	♦	♦	♦

Catiónico	Zephiran	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Phemerol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Retarder L.A.	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-605	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Catal	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-607	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-660 B	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Damol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-609	♦	♦	♦	♦	-	-	-	♦
Aniónico	Cetyl sulfato	?	♦	♦	..	?	♦	♦	♦
"	Myristyl sulfate	?	♦	♦	..	?	♦	♦	♦
"	Duponel L.S.	♦	♦	♦	..	♦	♦	♦	♦
"	Tergitol-8	♦	♦	♦	..	♦	♦	♦	♦
"	Triton W-30	♦	♦	♦	..	♦	♦	♦	♦
"	Igepon T.	♦	♦	♦	..	♦	♦	♦	♦
"	Tergitol-7	-	-	♦	..	-	-	♦	♦
"	Tergitol-4	-	♦	♦	..	-	♦	♦	♦
Crecimiento del <i>E. typhosa</i> después de su exposición a los detergentes									
Catiónico	Zephiran	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Phemerol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Retarder L.A.	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-605	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Catal	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-607	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-660 B	-	♦	-	♦	-	-	-	♦
"	Damol	-	-	-	♦	-	-	-	♦
"	Emulsol-609	♦	♦	♦	♦	-	-	-	♦

Ninguno de los detergentes aniónicos fué efectivo contra cualquiera de las tres especies de organismos Gram negativos aún en las más altas concentraciones estudiadas.

Estos mismos autores llegaron a las siguientes conclusiones:

- a) Todos los detergentes catiónicos estudiados son efectivos para inhibir el metabolismo bacteriano en una concentración de 1:3000 y varios son igualmente activos en diluciones de 1: 30.000; mientras que pocos de los detergentes aniónicos poseen un poder bactericida tan efectivo como el de los compuestos catiónicos.
- b) Tanto los microorganismos Gram positivos como los Gram negativos son igualmente sensibles a la acción de los detergentes catiónicos. Mientras que por otra parte los detergentes aniónicos inhiben selectivamente el metabolismo de los organismos Gram positivos.
- c) La acción inhibitoria de ambos tipos de detergentes es influida marcadamente por la concentración de iones hidrógeno. Los detergentes catiónicos exhiben su máxima actividad en un pH alcalino y los aniónicos en un medio ácido.
- d) Estudios de series homólogas de acetatos alquílicos de cadenas cortas y sulfocetatos (C₈ a C₁₈) demuestran que el máximo de inhibición es ejercido por los compuestos de carbonos 12, 14 y 16 (laurílico, miristílico y cetílico).

Se ha establecido que la acción de un detergente catiónico puede ser interferida por la presencia de un detergente aniónico y viceversa. La misma interferencia se observa cuando se hallan presentes fosfolípidos como la lecitina, cefalina y esfingomiolina que protegen los organismos contra la acción de ambos tipos de detergentes sintéticos, aunque si el organismo es expuesto primeramente a la acción del detergente el agregado posterior del fosfolípido no detiene la acción germicida.

Se ensayaron en concentraciones variables los siguientes productos: cristal violeta, ricinoleato de sodio, lauril sulfato de sodio y taurocolato de sodio.

El taurocolato de sodio se ha mostrado particularmente conveniente por tener menor acción inhibitoria que los restantes para bacterias coliformes. Esta sustancia es la utilizada en el medio ^{Mc}Conkey, de amplia difusión en nuestro país y en el extranjero, para la investigación de bacterias coliformes en aguas.

Se ha determinado la concentración más conveniente de taurocolato, agregando cantidades variables al medio basal y efectuando la cuenta de colonias después de sembrar suspensiones conocidas de bacterias coliformes.

Las cifras obtenidas se indican en el cuadro N° 5.

CUADRO N° 5

INFLUENCIA DEL TAUROCOLATO DE SODIO EN EL NÚMERO DE COLONIAS OBTENIDAS (INCUB. 48 horas - 37° C.)

Suspensiones de	Concentración de taurocolato en el medio basal				
	0 %	0.3%	0.4%	0.5%	0.6%
<u>Esch. coli</u>	80	76	78	60	52
" "	32	30	27	22	20
" "	16	14	14	10	8
" "	120	132	126	101	70
<u>A. aerogenes</u>	112	108	116	90	76
" "	32	30	27	20	18
" "	54	58	50	42	38
" "	210	200	196	176	164
<u>Intermediario I</u>	121	112	114	98	78
" "	12	10	9	5	3
" II	32	26	28	22	16
" "	46	42	37	30	30

Puede apreciarse que con una concentración de taurocolato superior a 0,4 % se modifican las propiedades del medio, haciéndolo marcadamente inhibitorio para las bacterias coliformes. Con 0,4 %, si bien se constata una disminución en el número de colonias (con respecto al control sin taurocolato) esta disminución no es de gran significado. En consecuencia se resolvió, hasta tanto se comprobara el comportamiento del medio al ensayar muestras de aguas, adoptar esa concentración.

Como indicadores de acides se ensayaron varias sustancias, entre ellas algunos colorantes de los propuestos por Clark y Lubs sin resultados satisfactorios, especialmente en lo que se refiere a la diferenciación entre fermentadores y no fermentadores de lactosa. Finalmente se adoptó la mezcla de azul de metileno-eosina amarilla, utilizada ya en el medio de Teague, en el de Levine, etc. y que como hemos visto anteriormente (pág. 31) presenta la ventaja de no poseer acción bacteriostática para bacterias no coliformes.

Dos ml. de una solución de azul de metileno de 0,325 % y dos ml. de eosina amarilla al 2% incorporados al medio basal con 0,4% de taurocolato de sodio, permiten una rápida identificación de las bacterias coliformes y aún la diferenciación entre los integrantes de este grupo.

Aspecto de las colonias: En este medio Esch. coli sembrado en superficie, produce colonias de aproximadamente 0,5 cm. de diámetro (48 h/a 37° C), chatas, secas, de color violeta oscuro en toda la superficie y con reflejos metálicos. El A. aerogenes en cambio, origina colonias elevadas, mucoides, confluentes, de tamaño similar al anterior y de color violeta en el centro, pero blanquecinas en la periferia.

Los tipos intermediarios son de identificación más difícil. La morfología es en general intermedia entre Bact. coli y A. aerógena, pero en ciertos casos es tan similar a la de Bact. coli que su diferenciación es muy difícil.

6.- Aplicabilidad del medio para las bacterias coliformes del agua.

Se han examinado muestras de agua superficiales, de variado grado de contaminación, sembrándolas simultáneamente en caldo Mac Conkey y en la superficie del nuevo medio sólido.

La incubación (a 37° C durante 48 horas) de los tubos sembrados en caldo Mac Conkey, permite determinar en base al número de cultivos que dan gas, cual es la concentración de bacterias coliformes del agua (Método IV de Wilson, 1935). El error experimental sin embargo, es relativamente grande, especialmente cuando es pequeño el número de tubos sembrados de cada porción o dilución de la muestra. En estos ensayos se han empleado por lo general 2 tubos con 2 ml., 2 con 1 ml. y 2 con 0,1 ml. de la muestra, con excepción de las aguas muy contaminadas o de los líquidos cloacales, que se sembraron en porciones de menor volumen (0,01 ml., 0,001 ml. etc.).

Las siembras en el medio sólido se efectuaron, colocando sobre la superficie de las placas, porciones adecuadas de 0,1 ml., 1 ml. ó 5 ml. del agua y distribuyéndola luego uniformemente en toda la superficie. Antes de proceder a la incubación, se dejaron las cajas semiabiertas a 37° C. hasta evaporar el exceso del agua. El número de colonias formadas al cabo de 48 horas de incubación a 37° C., se consideró como " concentración de bacterias coliformes en la porción sem-

brada ".

Los resultados obtenidos en estos ensayos se detallan en el cuadro N° 6. Se ha calculado el % de diferencia (en más o en menos) que se obtiene en las siembras en medio sólido, con respecto a los datos en medio líquido que se ha tomado como referencia.

Como puede apreciarse, la diferencia entre ambos resultados es variable y en algunos casos llega a ser considerable. Para poder establecer la significación que tienen esas diferencias, es necesario conocer la exactitud que tiene el método de determinación de bacterias coliformes mediante siembras en medio líquido. El resultado que se obtiene en esta determinación se expresa como " número más probable " (N.M.P.) de bacterias por ml., cifra que tiene un posible error en + o en - , variable según el número de porciones sembradas en cada ensayo.

Cuanto menor es el número de porciones sembradas en cada dilución, mayor es el " rango más probable ", es decir más amplio el posible error en + o en - .

En la mayoría de estas determinaciones se han utilizado como se ha dicho combinaciones de siembras, en las que, para cada dilución decimal de la muestra se sembraron dos porciones iguales de agua. Los valores subrayados del cuadro, corresponden a los % que están fuera del "rango más probable", vale decir diferencias que no pueden atribuirse a la inexactitud del método de siembra en medio líquido.

La mayor parte de estas discrepancias corresponden a determinaciones efectuadas sobre muestras de ríos del interior del país y puede observarse que los resultados absolutos no son muy dispares a pesar de la gran diferencia % que resulta.

CUADRO Nº 6

ENSAYOS COMPARATIVOS (SOBRE MUESTRAS DE AGUAS SUPERFICIALES SIN TRATAR)

BACTERIAS COLIFORMES POR ML. OBTENIDAS RECORRIENDO SIMULTANEAMENTE EL MEDIO

LÍQUIDO Y EL AGUA FOSFATO TETRACOLATO

Origen de la muestra	Medio Líquido (McC Conkey)	Nuevo Medio Sólido	Diferencia %	Origen de la muestra	Medio Líquido (McC Conkey)	Nuevo Medio Sólido	Diferencia %	Origen de la muestra	Medio Líquido (McC Conkey)	Nuevo Medio Sólido	Diferencia %
R.de L.Plata	240	270	+ 12	R.de la P.	70	20	-71	Liq. elemental	330.000	360.000	+ 91
"	240	130	- 46	"	350	230	-34	"	330.000	470.000	+ 42
"	240	131	- 45	"	110	163	+48	"	490.000	600.000	+ 22
"	23	17	- 28	"	49	92	+88	"	230.000	590.000	+182
"	33	39	+ 19	"	23	16	-30	"	140.000	270.000	+ 93
"	49	12	- 73	"	13	13	0	"	490.000	400.000	- 18
"	33	36	+ 9	"	6,8	6	-12	"	170.000	700.000	+312
"	33	29	- 12	"	220	66	-70	"	330.000	370.000	+ 12
"	130	54	- 58	"	7,8	7	-10	"	440.000	340.000	- 23
"	33	37	+ 12	"	49	12	-63	"	330.000	220.000	+ 33
"	17	36	+ 11	"	13	24	+88	"	330.000	450.000	+ 36
"	49	8	- 82	"	4,5	9	+100	"	490.000	180.000	- 63
"	23	34	+ 48	"	7,8	17	+118	"	330.000	620.000	+ 88
"	17	16	- 6	"	360	382	+0,6	"	330.000	490.000	+ 48
"	46	76	+ 63	"	170	221	+36	"	490.000	490.000	- 12
"	13	7	- 46	"	240	260	+4,2	"	230.000	280.000	+ 9
"	17	6	- 71	"	690	780	+ 13	"	330.000	370.000	+ 12
								Río			

"	17	35	+ 11	"	13	24	+82	"	330,000	420,000	+ 90
"	49	5	- 92	"	4,5	9	+100	"	190,000	280,000	- 90
"	23	34	+ 48	"	7,8	17	+118	"	330,000	420,000	+ 90
"	17	16	- 6	"	350	382	+0,6	"	330,000	400,000	+ 21
"	45	75	+ 63	"	170	231	+36	"	490,000	490,000	- 12
"	13	7	- 44	"	240	250	+4,2	"	230,000	250,000	+ 9
"	17	5	- 71	"	690	780	+ 13	"	330,000	370,000	+ 12
"	13	12	- 7	"	240	250	+ 17	Rio Primero	69	280	+305
"	22	8	- 64	"	690	930	+ 36	"	24	176	+630
"	146	112	- 20	"	24	37	+ 54	"	15	26	+ 73
"	110	70	- 36	"	690	190	- 72	Rio Parand	24	47	+ 96
"	49	38	- 22	"	169	250	+ 48	"	6	18	+200
"	22	7	- 68	"	24	17	- 29	"	17	21	+ 24
"	33	11	- 67	"	69	162	+ 48	"	6	16	+167
"	41	16	- 61	"	240	510	+112	"	50	66	+ 20
"	49	16	- 67	"	170	280	+ 66	"	2	4	+500
"	49	19	- 61	"	130	164	+ 20	Arroyo Vega	230	580	+143
"	41	112	+122	"	24	110	+ 31	"	240	270	+ 12
"	33	26	+ 9	"	28	60	+3,5	Arroyo Maldonado	690	990	+ 35
"	49	79	+ 61	"	210	238	+ 12	"	2400	1160	- 82
"	79	36	- 54	"	350	722	+106	"	620	400	- 26
"	17	51	+200	"	220	1240	+ 26	Rio U- raguay	4	19	+378
"	79	96	+ 22	"	49	62	+ 26	"	10	26	+169
"	360	142	- 59	"	69	48	- 23	"	7	22	+366
"	130	136	+ 6	"	69	25	- 6	Rio El Tala	9	28	+220
"	72	22	+ 5	"	240	196	- 18	Rio Abascoan	26	70	+ 96

"	79	38	- 54	"	350	722	+108	"	220	400	- 28
"	17	51	+200	"	920	1240	+ 38	Rio Pagan	4	19	+378
"	79	98	+ 22	"	49	82	+ 28	"	10	26	+189
"	380	142	- 89	"	69	48	- 33	"	7	22	+388
"	130	138	+ 8	"	69	25	- 6	Rio El Tala	9	28	+329
"	79	28	+ 8	"	249	198	- 18	Rio Abasco	28	70	+ 98
"	79	60	- 94	"	130	142	+ 9	Rio s. Miguel	14	12	- 14
"	380	101	- 71	"	210	248	+ 17	Rio Terceiro	43	29	- 38
"	79	48	- 48	"	690	898	- 15	"	6	12	+ 100
"	33	42	+ 27	"	130	112	- 12	"	200	312	+ 60
"	38	63	+ 91	"	210	198	- 7	Rio Mina Lavero	14	26	+ 88
"	21	37	+ 76	Hischuelo	24,000	18,800	- 24	R. Cuarto	22	72	+ 230
"	79	166	+109	"	6,900	7,200	+ 43	"	2	3	+ 80
"	22	12	- 48	Liq. cloacal	240,000	120,000	- 80	R. Reyes	120	120	+ 38
"	4,8	5	+ 11	"	69,000	118,000	+ 71	"	2	2	0
"	79	32	- 89	"	170,000	236,000	+ 97	R. Diamante	240	376	+ 11
"	17	39	+129	"	340,000	385,000	+ 60	R. San Juan	130	142	+ 9
"	7,8	31	+297	"	330,000	127,000	- 82	R. Vinos	2	8	+150
"	17	8	- 53	"	330,000	221,000	- 15	R. Coya	8	74	+225
"	48	55	+ 20	"	330,000	283,000	- 14	R. Quite	13	43	+230
"	130	43	- 67	"	790,000	300,000	- 82				
"	79	28	- 85	"	230,000	510,000	+ 58				

7.- Selectividad del medio para las bacterias coliformes.

La selectividad del medio para las bacterias coliformes, es decir su capacidad para inhibir las no pertenecientes a este grupo, se ha determinado examinando todas las colonias formadas cuando el número presente en cada caja fué menor de 50 colonias. Cuando el número de colonias fué superior se seleccionaron al azar 50 colonias.

Una porción de cada colonia se transfirió a caldo lactosado para verificar la producción de gas (48 hs. a 37° C.) y otra se utilizó para efectuar una coloración de Gram (bastones Gram negativos no esporulados).

Los resultados obtenidos se han ordenado en el cuadro Nº 7 según la procedencia de las muestras. Se nota en general, una mayor selectividad para las bacterias coliformes, cuando se han examinado aguas del Río de la Plata, líquidos cloacales y en general muestras con elevado grado de contaminación. Las muestras provenientes de ríos del interior del país, producen a veces colonias atípicas, en su mayoría blanquecinas, de tamaño pequeño, que al ser ensayadas, muestran caracteres que no concuerdan con los de las bacterias coliformes. Ello explica los valores algo elevados consignados en el cuadro Nº 6 para estas aguas.

Sin embargo la morfología de las colonias difiere de las coliformes y bastan unas cuantas observaciones para poder luego diferenciarlas a simple vista. Por lo tanto en la práctica, la especificidad del medio es mayor que la que sugiere el cuadro Nº 7, pues la gran mayoría de las colonias no confirmadas son atípicas.

CUADRO N° 7

SELECTIVIDAD DEL MEDIO FOSFATO TAURICOLATO PARA
LAS BACTERIAS COLIFORMES

Origen de la muestra	N° de Muestras Examinadas	N° de Colonias Examinadas	N° de Colonias Coliformes Confirmadas	% de Colonias Confirmadas	Promedio del % de confirmación
R. de la Plata	90	2215	1911	87,5	} 94,4
Liq. cloacal	25	922	883	96,7	
Arroyo Vega	2	20	19	95	
A. Maldonado	3	30	28	94	
Riachuelo	2	20	20	100	
R. Paraná	5	48	43	90	
R. Uruguay	4	40	28	70	
R. Primero	3	30	21	70	
R. Tercero	2	20	17	85	
R. Cuarto	1	10	6	60	
R. Mandom	2	47	24	51	} 73
R. Blanco	1	10	5	50	
R. El Tala	1	10	6	60	
R. Abancán	1	10	7	70	
R. Animate	1	10	5	50	
R. San Miguel	1	10	9	90	
R. Mina Clavero	1	10	7	70	
R. Reyes	2	11	9	81,8	
R. Diamante	1	10	10	100	
R. San Juan	1	10	9	90	
R. Quito	1	30	29	96,6	
R. Goya	1	50	29	58	

8.- Ensayos complementarios.

Influencia de la temperatura, de la concentración de lactosa y del agregado de triptosa.

A pesar que los resultados obtenidos en las experiencias anteriores son satisfactorios, se han realizado algunos ensayos complementarios con objeto de tratar de aumentar aún más la selectividad del medio. Se ha ensayado la influencia de la temperatura de incubación, de la concentración de lactosa y del agregado de triptosa al medio de cultivo.

Con respecto a la temperatura de incubación se hicieron ensayos simultáneos a 37° C. y a 40° C., temperatura esta última que permite el desarrollo de bacterias coliformes y que en cambio inhibe el de otras bacterias del agua.

Los ensayos efectuados se detallan en el cuadro N° 8. Se han sembrado muestras de agua de diverso origen y líquidos muy contaminados en caldo Mac Conkey y en el nuevo medio incubando este último a 37° C. y 40° C. respectivamente.

CUADRO No 8

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA REPLICACION SOBRE LA SELECTIVIDAD DEL MEDIO

Mes tra No	N.M.P./ml		Bacter.colif. por ml		Mes tra No	N.M.P.		Bacter.colif. por ml		M. No	N.M.P.		B.colif. por m			
	Medio liq. (Mac. Conkey)	Medio liq. (Mac. Conkey)	Nuevo medio sólido			Medio liq. (Mac. Conkey)	Medio liq. (Mac. Conkey)	Nuevo medio sólido			Medio liq. (Mac. Conkey)	Medio liq. (Mac. Conkey)	Nuevo med.sel. incubado a		Medio liq. (Mac. Conkey)	Medio liq. (Mac. Conkey)
			37° C.	40° C.				37° C.	40° C.				37° C.	40° C.		
1	240	360	131	128	36	101	71	128	101	71	0,2	1	1	40°C.		
2	23	79	17	49	37	45	72	49	45	72	330.000	127.000	101.000	-		
3	23	33	39	59	38	42	73	59	42	73	330.000	281.000	189.000	101.000		
4	49	33	12	36	39	63	74	57	63	74	330.000	283.000	291.000	291.000		
5	33	21	36	36	40	37	75	36	37	75	790.000	300.000	325.000	325.000		
6	33	79	29	69	41	165	76	69	165	76	330.000	510.000	372.000	372.000		
7	130	22	54	10	42	12	77	10	12	77	330.000	360.000	320.000	320.000		
8	33	4,5	37	5	43	5	78	1	5	78	330.000	470.000	345.000	345.000		
9	17	79	35	13	44	32	79	13	32	79	450.000	600.000	579.000	579.000		
10	49	17	5	16	45	39	80	16	39	80	230.000	880.000	380.000	380.000		
11	23	17	34	17	46	31	81	17	31	81	140.000	270.000	230.000	230.000		
12	17	7,8	16	84	47	31	82	84	31	82	490.000	400.000	580.000	580.000		
13	46	2	75	29	48	44	83	29	44	83	170.000	700.000	380.000	380.000		
14	13	7,8	7	18	49	30	84	18	30	84	330.000	370.000	230.000	230.000		
15	17	46	6	30	50	55	85	30	55	85	440.000	340.000	200.000	200.000		
16	13	130	12	31	51	43	86	31	43	86	330.000	220.000	170.000	170.000		
17	22	79	8	8	52	23	87	8	23	87	330.000	450.000	390.000	390.000		
18	140	70	112	17	53	20	88	17	20	88	490.000	180.000	150.000	150.000		
19	110	350	70	142	54	230	89	142	230	89	330.000	620.000	490.000	490.000		
20	49	110	38	135	55	163	90	135	163	90	330.000	400.000	390.000	390.000		
21	22	49	7	20	56	184	91	20	184	91	490.000	430.000	300.000	300.000		
22	33	17	11	8	57	8	92	8	8	92	230.000	280.000	250.000	250.000		
23	41	23	16	9	58	15	93	9	15	93	330.000	370.000	389.000	389.000		
24	49	13	16	4	59	13	94	4	13	94	0,2	1	1	1		
25	41	6,8	19	8	60	6	95	8	6	95	0,2	1	1	1		
26	41	20	18	41	61	6	96	41	6	96	0,2	1	1	1		
27	49	7,8	7	17	62	18	97	17	18	97	0,1	12	12	12		
28	49	4,5	33	17	63	24	98	17	24	98	2	4	4	4		
29	17	4,5	31	16	64	24	99	16	24	99	2	2	2	2		
30	79	7,8	21	5	65	17	100	5	17	100	2	2	2	2		
31	79	7,8	24	6	66	17	101	6	17	101	2	2	2	2		
32	130	360	148	360	67	360	101	360	360	101	11	15,8	15,8	15,8		
33	130	170	148	170	68	230	102	170	230	102	7,8	7,8	7,8	7,8		
34	79	0,2	50	1	69	3	103	1	3	103	13	13	13	13		
35	79	0,2	50	1	70	3	104	1	3	104	13	13	13	13		

La repetición de iguales valores de bacterias coliformes, en distintas determinaciones en medio líquido, se explica porque, como es notorio se trata de números más probables (calculados según el número de cultivos positivos en cada porción de muestra sembrada) y no de la cifra real, que no es posible determinar mediante medios líquidos. Estos números más probables tienen como se sabe un margen de error, en más o en menos, variable según el número de tubos sembrados por cada dilución.

El examen de los datos consignados en el cuadro N° 8 no indica ventaja alguna en incubar las placas a 40° C. Sobre 105 exámenes realizados, se han obtenido valores más cercanos a los del medio líquido en 54 casos, cuando la incubación se hizo a 37° C., mientras que incubando a 40° C. sólo lo fué en 37 casos; 14 ensayos dieron valores iguales a 37° C y 40° C.

Por otra parte la incubación a 40° C además de requerir una estufa regulada expresamente a esa temperatura (no siendo su uso corriente), produce una deshidratación acentuada del medio de cultivo durante las 48 horas de incubación.

Por estos motivos se mantuvo la temperatura de 37° C. como la definitiva para la incubación de las placas sembradas.

Con respecto a la influencia de la concentración de lactosa se han realizado una serie de ensayos comparativos preparando el nuevo medio con 0,5 % y 1 % de lactosa respectivamente y se sembró como en el caso anterior una serie de muestras de aguas de distinto origen. Los resultados del cuadro N° 9 demuestran que no hay ventaja alguna en modificar la concentración de lactosa.

CUADRO N° 9

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA SOBRE LA SELECTI-
VIDAD DEL MEDIO

Mues- tra N°	N.M.P. p/ml.	Bacterias coliformes por ml			
	Medio Liq. (Mac Conkey)	Nuevo medio sólido con 0,5 % de lac- tosa	Dife- ren- cia %	Nuevo medio sólido con 1 % de lac- tosa	Dife- ren- cia %
1	33	29	- 12	23	- 30
2	130	54	- 58	46	- 65
3	33	37	+ 12	29	- 12
4	17	35	+ 11	13	- 24
5	49	5	- 92	5	- 92
6	23	34	+ 43	40	+ 74
7	17	16	- 6	12	- 29
8	46	75	+ 63	59	+ 28
9	79	32	- 59	20	- 75
10	17	39	+ 129	23	+ 35
11	7,8	31	+ 297	15	+ 92
12	33	1	- 97	1	- 97
13	7,8	30	+ 285	29	+ 272
14	130	43	67	30	- 77

Lo mismo puede decirse con respecto al agregado de triptosa. Se substituyó primero peptona por triptosa y luego se ensayó el agregado en porporciones variables de mezclas peptona-triptosa.

Se notó en todos los casos al ser ensayados con muestras de agua, una falta notable de especificidad para bacterias coliformes,

obteniéndose desarrollo de colonias pertenecientes a bacterias ajenas al grupo.

En consecuencia se resolvió no modificar la composición del medio y mantener las condiciones experimentales señaladas en el apartado 5.

CAPITULO IV

A P E N D I C E

En el presente capítulo se detalla la composición y preparación del nuevo medio sólido así como la de todos los medios utilizados en el curso de este trabajo.

Nuevo medio: Agar fosfato taurocolato

Extracto de carne	6 g.
Peptona	10 g.
Fosfato monopotásico (PO_4H_2K)	2,1 g.
Fosfato disódico (PO_4HNa_2)	3,9 g.
Taurocolato de sodio	4 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se disuelven los compuestos sólidos en el agua destilada calentando en autoclave a vapor.

Se añade entonces

- | | |
|---|--------|
| a) Lactosa | 10 g. |
| b) Solución acuosa de azul de metileno al 0,325 % | 20 ml. |
| c) Solución acuosa de eosina amarilla al 2 % | 20 ml. |

No es necesario ajustar el pH.

Se distribuye en erlenmeyers y se esteriliza a 120° C. durante 15 minutos.

Agar eosina azul de metileno de Levine

Peptona	10 g.
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	2 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se disuelven todos los ingredientes sólidos en el agua destilada calentando en autoclave a vapor.

Se agrega entonces:

a) Solución acuosa de lactosa al 20%	50 ml.
b) Solución acuosa de eosina amarilla al 2%	20 ml.
c) Solución acuosa de azul de metileno al 0,5 %	20 ml.

No es necesario ajustar el pH.

Se distribuye y esteriliza a 120° C. durante 15 minutos.

Agar Endo

Fosfato dipotásico (PO_4K_2H)	3,5 g.
Peptona	10 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se calienta en autoclave a vapor todos los componentes hasta disolución, se filtra en caliente y se ajusta la reacción a pH 7,4.

Se agrega 10 g. de lactosa y por cada 100 ml. del medio se añaden:

Sulfito de sodio (anhidro)	0,25 g.
Solución alcohólica de fucsina bésica al 10 % (filtrada)	0,5 ml.

Se distribuye en erlenmeyers y se esteriliza en autoclave a 120° C. durante 15 minutos.

Agar Ma c Conkay

Taurocolato de sodio comercial	5 g.
Peptona	20 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se calienta en el autoclave a vapor todos los componentes hasta disolución total y una vez enfriado a 50° C. se ajusta la reacción a pH 7,6-7,8. Se agrega una clara de huevo por cada tres litros de medio, se calienta en autoclave a 115° C. por 15 minutos, se filtra en caliente y se ajusta la reacción a pH 7,3 a 50° C. ó a pH 7,5 a temperatura ambiente.

Se agrega 10 g. de lactosa y 10 ml. de una solución acuosa de rojo neutro al 1%. Se mezcla perfectamente, se distribuye y se esteriliza en autoclave a 115° C. durante 15 minutos.

Agar Salle

Peptona	10 g.
PO_4K_2H	3 g.
PO_4KH_2	0,6 g.
Lactosa	5 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	1000 ml.
Solución acuosa de eritrosina al 2%	20 ml.

Sol. acuosa de azul de metileno al 1%	20 ml.
Sol. alcohólica de púrpura de bromocresol al 1%	2 ml.

Se disuelven la peptona, fosfatos y el agar en el agua destilada, calentando en autoclave a 120° C. durante 30 minutos. Se agrega luego la lactosa y los colorantes, se agita, se distribuye y se esteriliza a 120° C. durante 15 minutos.

Caldo Mac Conkey

Taurocolato de sodio comercial	5 g.
Lactosa	10 g.
Peptona	20 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se calienta en autoclave a vapor durante dos horas y luego se deja en heladera durante una noche. Se filtra (sin calentar) al día siguiente y se ajusta la reacción a pH 7,4 (no usar azul de bromotimol); luego se agrega 10 ml. de una solución acuosa de rojo neutro al 1%, se distribuye a razón de 5 ml. en tubos de ensayo provistos de tubitos de fermentación Durham y finalmente se esteriliza en autoclave a 115° C. durante 30 minutos, tres días consecutivos.

CAPITULO V

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el fin de obtener un medio altamente selectivo para bacterias coliformes, que inhibiera las no pertenecientes a este grupo que corrientemente están presentes en las aguas y en los líquidos contaminados, se han realizado una serie de experiencias partiendo de un medio basal constituido por agar-peptona- extracto de carne-tormentol y lactosa.

Este medio, desprovisto de sustancias inhibitorias, pudo ser mejorado notablemente agregándole una cantidad apropiada de fosfatos alcalinos, lo que permitió el desarrollo de mayor número de colonias en siembras con suspensiones puras de bacterias coliformes.

Posteriormente, se inventió el comportamiento de agentes selectivos con el fin de eliminar en lo posible los organismos no coliformes y finalmente se estudió la influencia de la concentración de los componentes del medio (peptona, extracto de carne, lactosa), como también de la temperatura de incubación. Una serie de ensayos comparativos, efectuados con aguas de distinto origen permitió comprobar su eficiencia.

El medio definitivo tiene la siguiente composición: peptona 1 g., extracto de carne 0,6 g., fosfatos alcalinos 0,8 g., taurocolato de sodio 0,4 g., lactosa 1 g., agar 2 g., eosina amarilla (soluc. acuosa al 2%) 2 ml., azul de metileno (soluc. acuosa al 0,325%) 2ml, agua destilada 100 ml.

Para la determinación de bacterias coliformes en una muestra de agua, se siembra una porción adecuada de ésta (5 ml. 1 ml. e el

1.1.1.1.1.

Rosyuel J. Jansen

BIBLIOGRAFIA

- A report from the Standard Methods Committee.- Anon. Ohio Conf. Water Purification, 13th Ann. Rept. (1937) 38
- Ayers, S.H. and Rupp, Ph., Synthetic medium for the direct enumeration of organisms of the colon aerogenus group.- J. Bacteriology (1918) 3,433
- Baludien, B., Determination of Bacillus coli in water.- Ann. Igiene (1938) 48, 453; Water Pollution, Research. Summary of Current Literature 12, 344
- Baker, Z., Harrison, R. and Miller, B.F., Action of synthetic detergents on the metabolism of bacteria.- J. Experimental Medicine (1941) 73, 249
- Bayliss, M. and Halvorson, H.O., Germicidal and detoxifying properties of soaps.- J. Bacteriology (1935) 29, 9
- Clark, W.M. and Lubs, H.A., The differentiation of bacteria of the colon aerogenus family by the use of indicators.- J. of Infectious Diseases (1915) 17, 160
- Cann, H.J. and Farrey, M.A., Can Endo medium be standardized?.- J. Bacteriology (1934) 27, 33
- Committee American Public Health Assoc., Litmus lactose extract agar.- American J. of Public Health (1917) 97

- Chalmers, C.H., A study of coli-form organisms in samples of certified milk.- J. of Hygiene (1928) 27, 285
- Chapman, G.A., A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms.- J. Bacteriology (1947) 53, 504
- Dideurt, M. et Strillard, P., Milieux bilisés pour la recherche du colibacille dans l'eau.- Rev. Hyg. (1923) 45, 60
- Dideurt, M. et Strillard, P., Une méthode habituelle pour la détermination directe du colibacille dans une grande quantité d'eau sur un milieu solide.- Ann. Services Tech. Hyg. Ville de Paris (1930)
- Dideurt, M., Guillard, A., Strillard, P. et Mandelbrot, F., Alimentation en eau des villes. Procédés d'analyses et de contrôle des eaux d'alimentation et des eaux usées.- Paris (1935) 1-233
- Esserich, A.H., The effect of pH on the germicidal action of soap.- Jour. Gen. Physiol. (1927) 10, 147
- Engel, S., Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhus bacillen.- Centralblatt für Bakteriologie Abt. I (1903-4) 35, 109
- Ferramola, S., Wilson method for the bacteriological examination of water.- American J. of Public Health (1941) 30, 1083

- Berregala, R., Examen bacteriológico de aguas.- Buenos Aires (1947)
I- VIII, 1-187
- FLEURY, G., Nouvelle méthode de l'isolement du Esch. coli dans l'eau.-
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux (1931) 3, 193
- Gebm, H. W. and Henkelokian, H., Eosin methylene blue agar for rapid
direct count of Esch. coli.- Am. J. Public Health
(1935) 25, 920
- Gezang, E.F., Endo agar as affected by peptone.- Science (1924) 59,
282
- Gezang, E.F., Basic fuchsin as an indicator in Endo's medium.- Stain
Technology (1926) 1, 41
- Gezang, E.F., A consideration of French's test of basic fuchsin for
Endo's medium.- Stain Technology (1926) 1, 135
- Gezang, E.F., Color diffusion in Endo's medium as affected by pepto-
ne.- Abst. Bact. (1926) 9,3
- Gezang, E.F. and Thompson L.E., Color diffusion in Endo agar.- J.
Bacteriology (1927) 14, 139
- Harris, H.H., Some observations on Endo's medium.- Abst. Bact. (1926)
9,3
- Hook, R.D., A correlation of differential tests for the colon aere-
genes group.- J. Pennsylvania Water Works Operator's Assoc.
(1935) 7, 75

- Holt-Harris, J.E. and Teague, O., A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools.- J. of Infectious Diseases (1916) 18, 596
- Hostettler, C.O., The determination of coliform organisms with violet-red bile agar.- Ohio Conf. Water Purification 20th Ann. Rept. (1941) 1940, 56
- Klarmann, E.G. and Shternoy, J.D., Are Soaps Germicidal?.- Soap and Sanitary Chemicals January (1941)
- Koser, S.A., Utilization of salts of the organic acids by the colon aerogenes group.- J. Bacteriology (1923) 8, 493
- Leifson, E., New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water.- J. of Pathology and Bacteriology (1935) 40, 581
- Leiguarda, R.H., Modificación del medio de Mac Conkey.- Tesis. Fac. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (1941)
- Levine, M., A simplified fuchsin sulfite (endo) agar.- American J. Public Health (1918) 8, 364
- Levine, M., Differentiation of E. coli and B. aerogenes on a simplified eosin-methylene blue agar.- J. of Infectious Diseases (1918) 23, 43
- Levine, M., Further observations on the eosin methylene blue-agar.- American Water Works Assoc. (1920) 188

- Levine, M., Further observations on the eosin methylene blue-agar.-
American Water Works Assoc. (1921) 8, 151
- Levine, M., Does bile inhibitor stimulate growth of the colon group?.-
Am. Water Works Assoc. (1922) 9, 612
- Levine, M. and Schoenlein, A compilation of cult^{ure} media for the cul-
tivation of microorganisms.- Baltimore (1930) I-XVI,
1-969
- Levine, M., The effect of concentration of dyes on differentiation
of enteric bacteria on eosin methylene blue agar.-
J. Bacteriology (1943) 45, 471
- Littman, M.L. and Stark, C.H., New plating medium for coliform analy-
sis, citrate ricinoleate agar.- I Development and
theory.- Am. Water Works Assoc. (1938) 30, 1808
II Application to water and sewage.- Ibid 1821.
- Lusban, P., Un nuovo mezzo per l'isolamento del colibacillo nell'
acqua.- Pathologica (1931) 23, 771
- Mac Cooker, A.T., Bile salt media and their advantages.- J. Hygiene
(1908) 8, 322
- Mac Culloch, E.G., Soaps as Disinfectans.- Proc. Washington State
Public Health Assn. (1939) 5, 39
- Mac Culloch, E.G., Disinfection and sterilization.- Philadelphia
(1946) 1-472

- Meyer, E.M., The use of a three percent lactose litmus agar plate for the demonstration of B. coli in water examinations.- J. Bacteriology (1917) 2, 237
- Hicks, C.S.- J. Bacteriology (1917) 2, 403 citado en Lavine and Schoenlein, A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms.- Baltimore (1930) I-XVI, 1-969
- Muller, L.- Societé de Biologie, Compt. rend et memoires (1922) III, 994 citado en Volte, A.G. and Kramer, W.A., Comparison of three methods of determining the colon-aerogenes group.- J. Am. Water Works Assoc. (1933) 25, 383
- Noble, R.E., A cyanide citrate pour plate medium for direct determination of colon aerogenes content in water and sewage.- J. American Water Works Assoc. (1928) 19, 182
- Noble, R.E. and Tenney, E.D., Solid brilliant green lactose bile medium for direct plating, with results in seventeen hours.- J. of Am. Water Works Assoc. (1935) 27, 108
- Noble, R.E., Relative productivities of certain culture media.- J. of Am. Water Works Assoc. (1935) 27, 1143
- Volte, A.G. and Kramer, W.A., Comparison of three methods of determining the colon-aerogenes group.- J. of Am. Water Works Assoc. (1933) 25, 383
- Norton, J., Soaps in their relation to their use for handwashing.- J. Am. Med. Assn. (1920) 75, 362

Fercival, J., Agricultural Bacteriology.- London (1920)

Ferelli, C., Synthetic medium for the differentiation of Bacterium coli from Bacterium aerogenes.- Giorn. Batteriol. Immunol. (1936) 17, 841; U.S. Public Health Eng. Abstracts (1937) 17, 122

Prescott, S.C., Winslow, C.M. and Mac Curdy M.H., Water Bacteriology.- New York (1945) 1-353

Rassner, M.A., The effect of soaps on Treponema pallidum.- J. Am. Med. Assn. (1917) 68, 973

Robinson, H.L. and Rettger, L.E., Studies in the use of brilliant green and a modified Ludo's medium in the isolation of Bacillus typhosus from feces.- J. Med. Res. U.S. (1916) 29, 263

Rogers, L.A., Clark, W.L. and Evans, A.C., The characteristics of bacteria of the colon type found in bovine feces.- J. of Infectious Diseases (1915) 15,99

Salle, A.J., A system for the bacteriological examination of water.- J. Bacteriology (1930) 20, 361

Schnithoff, H.B. and Henkelejian, H., A direct plating method for the determination of the potability of water.- J. Am. Water Works Assoc. (1936) 28, 1963

Skinner, C.B. and Murray, T.J., Medium for inhibition of "spreaders" and differentiation of E. coli and B. aerogenes.- J. of Infectious Diseases (1924) 34, 585

Standard methods for the examination of water and sewage.- New York (1946) 9th ed. 1-286

Stark, C.N. and England, G.W., Formate ricinoleate broth a new medium for the detection of colon organisms in water and milk.- J. Bacteriology (1935) 29, 26

Stearns, E. W. and Stearns, A.E., Conditions and reactions defining dye bacteriostasis.- J. Bacteriology (1926) 11, 345

Stock, C.C. and Francis, T. Jr., The inactivation of the virus of lymphocytic choriomeningitis by soap.- J. Exper. Med. (1943) 77, 323

Tonney, F.O., and Noble, B.E., Improved ferrocyanide citrate agar for direct enumeration of colon-aerogenes organisms.- J. Am. Water Works Assoc. (1931) 23, 1202

Topley W.M.C., Wilson, G.S. y Miles, A.A., Bacteriología e inmunidad.- Barcelona (1949) I-XXIV, 1-2087 Trad. de J. E. Salarich

Walker, J.S., The germicidal properties of soap.- J. of Infectious Diseases (1926) 38, 127.

Wilson, T.M., On the chemistry and staining properties of certain derivatives of the methylene blue group when combined with eosin.- J. Exp. Med. (1907) 9, 645

Wilson, G.S., Twigg, R.S., Wright, E.C., Hendry, C.B., Cowell M.P. and Maier, L., The bacteriological grading of milk.- London (1935)
p. 204

Wynn, E.C., Rode, L. J. and Hayward, A.E., Mechanisms of the selective action of E.M.B.A. on the enteric group.- Stain Technology (1942) 17, 11

I N D I C E

	Pág.
CAPITULO I.- Objeto del presente estudio	1
CAPITULO II.- Antecedentes bibliográficos	3
CAPITULO III.- Método experimental	19
1.- Comparación de la eficiencia de varios me- dios sólidos conocidos	20
2.- Influencia del ión fosfato en el agar lac- tosa tornasol	23
3.- Influencia de la concentración de peptona y de extracto de carne en el agar lactosa tornasol	25
4.- Comparación del agar lactosa tornasol modi- ficado con el agar eosina azul de metileno de Levine	26
5.- Acción de agentes selectivos para bacte- rias coliformas	27
6.- Aplicabilidad del medio para las bacterias coliformas del agua	30
7.- Selectividad del medio para las bacterias coliformas	42
8.- Ensayos complementarios. Influencia de la temperatura, de la concentración de lactosa y del agregado de triptosa	44
CAPITULO IV.- Apéndice	49
CAPITULO V .- Resumen y conclusiones	53
BIBLIOGRAFIA	55