

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA

Catedrático: Prof. Dr. S. OVEJERO DEL AGUA

**"Contribución a las valoraciones colimétricas
con el empleo de un solo medio de cultivo."**

*Por S. Ovejero del Agua
F. Rejas García
J. I. Ovejero Guisasola*

Pocos temas de la microbiología alimenticia habrán sido investigados tan amplia y profundamente como el referente al grupo Escherichia-Aerobacter, significación de las diversas especies del grupo en los diferentes alimentos, investigación cuantitativa y cualitativa de los mismos, técnicas más idóneas para lograrlo, etc., etc. Sin embargo, y a pesar de la amplísima bibliografía al respecto, siempre es un tema nuevo y sugestivo, apto para realizar en él nuevas investigaciones.

Nosotros, que por razones de nuestro trabajo, realizamos con frecuencia colimetrías cuantitativa y cualitativamente, especialmente en leches, derivados lácteos y aguas, hemos quedado insatisfechos de los resultados en numerosas ocasiones, desde el punto de vista cualitativo, incluso después de realizar el "test" completo según los métodos "standard" americanos.

En vista de lo cual nos decidimos hace ya algún tiempo a la búsqueda de algún método que de forma sencilla, sin grandes complicaciones, permitiera no sólo realizar colimetrías cuantitativamente sino

que a la par nos diferenciará las diversas especies del grupo, o al menos las de origen fecal del resto.

El resultado de estos ensayos, van a ser el motivo del presente trabajo. Al objeto de centrar previamente el problema antes de entrar en el desarrollo de nuestras investigaciones, hablaremos en primer lugar de la interpretación del grupo coliforme, seguidamente de la significación de las colimetrías en los diversos alimentos, para pasar seguidamente al planteamiento de nuestras investigaciones y comunicar y discutir los resultados obtenidos.

DEFINICION DEL GRUPO COLIFORME

La definición generalmente más aceptada es la de BREED y NORTON, para los que, este grupo se encuentra formado por "las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram negativas, no esporuladas, y fermentadoras de la lactosa con producción de gas." La temperatura óptima en la prueba difiere según la procedencia de la muestra, para la Subcomisión de Coli-Aerógenes de la Society for Applied Bacteriology, en los análisis de leches será la de 30° C. y en las de agua la de 37° C., los Standard Methods for the Examination of dairy products, de la American Public Health Association, recomiendan la de 35° C.

Como se puede apreciar por la definición se engloban en la misma todas las bacterias del grupo Escherichia-Aerobacter, sean o no de origen fecal, y se excluyen gérmenes como los del género Paracolobactrum, fermentadores tardíos de la lactosa.

La clasificación de las especies del grupo coliforme ha sido objeto de numerosos estudios e investigaciones. En la tabla A, presentamos una recogida de las investigaciones de WILSON, WINDLE y TAYLOR, BUTTIAUX, WILSESENS y otros investigadores, en la que exponemos los detalles más significativos en torno a su diferenciación, junto a su posible origen.

COLIMETRIAS. SIGNIFICACION EN LOS DIFERENTES ALIMENTOS

La colimetría, según su etimología, expresa la numeración o contejo de colis. Ahora bien, la definición en si no delimita si esta nume-

ración se realiza sobre todas las especies del grupo, sin especificar, o por el contrario se concreta al *Esch. coli* de origen fecal. Como ambas colimetrías pueden ser interesantes, según el análisis a realizar, conviene distinguir perfectamente una de la otra. Llamaremos colimetría "lato sensu" a las que valoran el número total de coliformes, y "stricto sensu" las que solamente valoran los colis de origen fecal.

La significación de las colimetrías en el examen higiénico de los alimentos es diversa según el alimento de que se trate, y es preciso tenerla muy en cuenta antes de realizarla, pues en unos casos interesa simplemente la investigación de los coliformes, mientras que en otros es necesario buscar los colis de origen fecal. Dado el interés de la cuestión, vamos a reseñar brevemente, la significación que debe darse a las colimetrías en los diferentes alimentos.

Agua dulce, agua de mar, moluscos.—En estos tres productos, aguas dulces para el consumo o elaboración de alimentos, agua de mar de criaderos de moluscos, y en los moluscos, como lo que se pretende con la colimetría es investigar la contaminación por heces de los mismos, por la posible presencia en ellas de salmonelas patógenas, bacilo de Ebert y paratíficos, y gérmenes coleriformes, es precisa la búsqueda del *Esch. coli* de origen fecal, es decir, la colimetría en "stricto sensu". Por otra parte la presencia de coliformes apenas nos dará indicación alguna, siendo motivo de confusión, a causa de su habitat amplio, —suelo, plantas, etc.

Leche y derivados lácteos.—La significación de las colimetrías es diferente según se trate de leche o productos preparados con leche cruda o que hayan sufrido un tratamiento por el calor.

En el primer caso, leches crudas o quesos frescos preparados con leche no pasterizada, interesa la búsqueda de los colis de origen fecal, que nos indicará una contaminación del producto por heces, inadmisible en un alimento de tan amplio consumo. La investigación de coliformes, carece de interés, ya que solamente nos indicará una falta de higiene en el ordeño y envasado, y deficiencias en el transporte y almacenamiento (temperaturas altas, tiempos prolongados), que por otra parte será perfectamente valorada en los contajes microbianos o pruebas biológicas a realizar en la misma.

Sin embargo en las leches tratadas por el calor, si que tiene verdadero valor la investigación de coliformes, ya que al ser éstos destruidos durante el tratamiento térmico, su presencia en el producto significa o

bien un deficiente tratamiento o una contaminación posterior por los envases sucios o con cierres imperfectos.

PLANTEAMIENTO DE LAS PRUEBAS

Al estudiar la posible diferenciación de las diversas especies de coliformes, o cuando menos las de origen fecal de las no fecales, y tratar de encontrar un medio de cultivo que nos permitiera realizar paralelamente colimetrías cualitativa y cuantitativamente, nos decidimos a investigar además del empleo de temperaturas disgenésicas para los coliformes y substancias inhibitorias de los gérmenes Gram positivos, la producción de indol y la fermentación de la lactosa o de la dulcita conjuntamente. Como esta investigación era imposible en los medios sólidos, la realizamos sobre medios líquidos.

Los motivos que nos impulsaron a la investigación conjunta de la fermentación de la lactosa o dulcita con la producción de indol, a temperaturas diversas y con sustancias inhibitorias fueron las que siguen:

a) La fermentación de la lactosa es específica de todos los gérmenes del grupo.

b) La fermentación de la dulcita es específica en el *Esch. coli* y variedades, *Esch. coli* variedad *acidilactici*, *Esch. coli communior*, *Esch. coli* variedad *naopolitana*, no desarrollándose en los coliformes (MAC CONKEY, HEWLETT y BARTON, ZAPATERO, PIRAX).

c) La producción de indol es casi plenamente específica en los *Esch. coli* y coliformes de origen fecal. Sin embargo aún no aceptando este aserto plenamente para el *Esch. freundii II*, *A. aerógenes II*, e irregular VII de Wilson (Tabla A), la investigación de indol nos puede ser muy útil si la estudiamos conjuntamente con la fermentación de la dulcita, ya que según hemos visto en el apartado anterior ninguno de estos gérmenes es capaz de fermentarla.

La investigación del indol en la detección de colis fecales, aparte de los clásicos trabajos de DEMETER y LERNER, ha sido ensayada últimamente por MACKENZIE, TAYLOR y GILBERT a temperaturas de 44° en colimetrías de aguas con excelentes resultados, y confirmada por diversos investigadores, (GRAZIADEI, BUTTIAUX, SAMAILLE y PIERENS, etc.)

d) Las temperaturas disgenésicas 43-45° C, eliminan el crecimiento de la gran mayoría de coliformes y gérmenes banales del agua y

de la leche, excepto los termófilos. El empleo de productos inhibitorios de la flora Gram positiva, es necesario al objeto de eliminar el crecimiento y en definitiva todas las posibles interferencias de esta flora tan abundante en el agua y especialmente en la leche.

TECNICAS EMPLEADAS

Gémenes.—Los gérmenes coliformes, aislados del agua y de la leche y clasificados por nosotros, los hemos agrupado con fines de estudio en tres grandes grupos denominados Colis fecales, Coliformes con indol y Coliformes sin indol.

La composición de estos grupos está hecha en la forma siguiente:

Grupo Colis fecales: 10 cepas de *Esch. Coli* I.

Grupo Coliformes con indol: 3 cepas *Esch. freundii* II, 2 cepas Irregular Wilson I, 2 cepas irregular Wilson VII y 2 cepas *A. aerógenes* II.

Grupo coliformes sin indol: una cepa de cada una de las siguientes especies: *Esch. Coli* II, *Esch. freundii* I, *A. aerógenes* I, *A. cloacae*, e irregulares II, III, IV, V, VI y VIII.

Siembras.—Se realizaron con una gota de cultivo de 24 horas, de los diversos gérmenes, sobre caldo nutritivo.

Medios de cultivo.—Los medios de cultivo empleados en los ensayos fueron, el medio base lactosa (MBL) y el medio base dulcita (MBD), a los que se añadieron los productos inhibitorios en las concentraciones que señalaremos más adelante.

Fórmula del medio MBL:

Bactotriptona	1 gr.
Lactosa	0,5 gr.
Agua destilada csp.	100 c. c.
pH 7-7,2	

Fórmula del medio MBD:

Bactotriptona	1 gr.
Dulcita	0,5 gr.
Agua destilada csp.	100 c. c.
pH 7-7,2	

A estos medios se les agregaron los productos inhibitorios, y se distribuyeron en tubos de ensayo de 18 x 180 a razón de 10 cc., con

campana de gas, suriendo una esterilización a 115° 20 m.

Productos inhibidores

Acido bórico: Producto ensayado por LEVINE, en 1921, y que posteriormente ha sido ampliamente investigado para la diferenciación de colis fecales y coliformes con excelentes resultados (LEVINE, EPSTEIN y VAUGHN; BARTRAM y BLACK; WOLFORD y BERRY; LEVINE, TANIMOTO, MINETTE, ARAKAKI y FERNANDES; ANDERSON y STORGARDS). La concentración utilizada ha sido de 0,325 por 100.

Acido fénico: Introducido por PARETTI, ha sido ampliamente ensayado por PERIE y por VINCENT, en la diferenciación de Colis fecales y Coliformes, con excelentes resultados. La concentración utilizada ha sido de 0,1 por 100.

Bilis verde brillante: Tras de las investigaciones de DUNHAM y SCHOENLEIN, 1926, sobre las proporciones óptimas de estos dos productos al objeto de suprimir la flora Gram positiva, sin alterar el crecimiento de colis y coliformes, y el respaldo de los resultados de numerosos investigadores fue recomendado por los Métodos Standard para análisis de aguas y leche de Estados Unidos de América. La concentración utilizada ha sido la de 2 por 100 de bilis (Bacto Oxgall) y 0,00133 por 100 de verde brillante.

Cristal violeta: Introducido por SALLE, 1930, fue extensamente comprobado por MCCRADY y diversos investigadores, siendo recomendado por los Métodos Standard americanos de análisis de aguas. Inhibe el crecimiento de la flora Gram positiva sin alterar el desenvolvimiento de colis y coliformes. La concentración utilizada ha sido la de 0,000143 por 100.

Desoxicolato sódico: Introducido por Leifson, 1935, y recomendado por los Métodos Standard de análisis de leche americanos. Inhibe la flora Gram positiva, sin alterar el desenvolvimiento de colis y coliformes. La concentración utilizada ha sido la de 0,1 por 100.

Formiato y ricinoleato sódico: Acorde con los Métodos Standard americanos para análisis de agua y leche. El formiato sódico se incorpora a los medios para acelerar el crecimiento y desenvolvimiento de gas de colis y coliformes. El ricinoleato inhibe el crecimiento de los gérmenes Gram positivos. La concentración utilizada ha sido la de 0,5 por 100 de formiato sódico y 0,1 por 100 de ricinoleato.

Fuchina básica: Incorporada por RITTER, 1932, y comprobada posteriormente por MAC CRADY y diversos investigadores. Inhibe el des-

envolvimiento de la flora Gram positiva. La concentración utilizada ha sido la de 0,0015 por 100.

Penicilina: Incorporada al medio por diversos investigadores, MALLING-OLSEN, 1953, comprobó ampliamente sus resultados. Inhibe la flora Gram positiva sin alterar a colis y coliformes. Fue utilizada la concentración de 100 u/cc.

DESARROLLO DE LAS INVESTIGACIONES

En el desarrollo de estas pruebas investigamos en primer lugar la influencia de la temperatura y de los diversos productos inhibidores sobre la producción de indol y fermentación de la lactosa, sobre el medio MBL, por las diferentes cepas en cultivo puro, pasando más tarde, con las condiciones más idóneas surgidas de estas pruebas, a estudiar el comportamiento de estas cepas junto con la flora normal de la leche.

Posteriormente estudiamos la influencia de la temperatura y los productos inhibidores de mejor comportamiento en la prueba anterior, sobre la producción de indol y fermentación de la dulcita, medio MBD, por las diferentes cepas, primeramente en cultivo puro y posteriormente junto con la flora normal de la leche.

La producción de indol ha sido detectada por el reactivo de KOVACS, incorporando al medio en el momento de la determinación 1 cc. de reactivo. Al objeto de evitar interferencias de color, rojo en caso de indol positivo, y los colores de la fuchina, cristal violeta y verde brillante, es conveniente no agitar el medio con el reactivo, formándose de esta forma, en casos positivos, un anillo superficial más o menos rojo en dependencia con el indol producido.

PRUEBAS Y RESULTADOS

Seguidamente exponemos las pruebas realizadas y los resultados obtenidos de las mismas. Al objeto de poder sintetizarlas de forma clara y precisa, plantearemos cada prueba por separado, con sus variables, resultados en tablas, y discusión de los mismos.

Prueba número I

Objeto: Con la finalidad de establecer rápidamente, si es posible, un método de diferenciación entre colis fecales y aerobácter, con apli-

cación posterior al resto de los coliformes, decidimos estudiar la influencia que sobre el crecimiento y metabolismo bacteriano (poder gasógeno sobre la lactosa y producción de indol), poseen diversos productos inhibitorios y temperaturas de incubación.

Variables: Medio base lactosa con ácido bórico, ácido fénico, bilis y verde brillante, cristal violeta, desoxicolato sódico, formiato y ricinoleato sódico, fuchina básica y penicilina.

Temperaturas de incubación: 37 y 45° C.

Tiempos de incubación: 24 y 48 horas.

Resultados: Los resultados se encuentran en la tabla número I. De su análisis se desprende:

- a) Existe una menor producción de gas por los aerobacter.
- b) La producción de indol por los colis fecales se encuentra en dependencia de los diversos medios de cultivo.
- c) El crecimiento y metabolismo, producción de gas e indol, se encuentra disminuido a la temperatura de 45° C.
- d) Se escogen como temperaturas más idóneas para ensayos sucesivos, la de 37° C, para los medios con ácido fénico, cristal violeta, y bilis verde brillante, y para el resto de los medios la de 45°.

Prueba número II

Objeto: Comprobada en la experiencia anterior las temperaturas de incubación más idóneas para los diferentes medios de cultivo, en vista de poder diferenciar los colis fecales de los aerógenos, decidimos aplicar los resultados más aconsejables en la selección, al objeto de poder diferenciar los colis fecales de los coliformes con y sin indol.

Variables: Medio base lactosa con ácido bórico, desoxicolato sódico, formiato y ricinoleato sódico, fuchina básica y penicilina.

Temperatura de incubación: 45° C.

Tiempo de incubación: 24 horas.

Medio base lactosa con ácido fénico, bilis verde brillante y cristal violeta.

Temperatura incubación: 37° C.

Tiempo de incubación: 24 horas.

Resultados: Los resultados encontrados se expresan en la tabla II, de cuyo análisis podemos deducir como detalles más sobresalientes:

a) La diferenciación entre colis fecales y coliformes indológenos, es difícil, y solamente es posible por la menor capacidad gasógena

de estos últimos, especialmente en el MBL con ácido bórico en que se encuentra prácticamente inhibida la producción de gas.

b) La diferenciación entre colis fecales y coliformes no indológenos es bastante sencilla por la ausencia de indol en los últimos y la incapacidad o menor capacidad gasógena de los coliformes.

c) Los medios que permiten una más fácil diferenciación entre los tres grupos de gérmenes son los que llevan penicilina, fuchina básica, desoxicolato sódico, ácido bórico, y ácido fénico, seguidos de los que contienen formiato-ricinoleato sódico, cristal violeta, y bilis verde brillante.

Prueba número III

Objeto: Para poder constatar el interés práctico que pudieran tener, en la diferenciación de colis fecales y coliformes con y sin indol unidos a la flora microbiana de la leche, los resultados obtenidos en la experiencia anterior, decidimos repetirla utilizando como material de siembra leche desprovista de colis y coliformes y adicionada de los gérmenes a estudiar.

Variables: Medio base lactosa con ácido bórico, desoxicolato sódico, formiato y ricinoleato sódico, fuchina básica y penicilina.

Temperatura de incubación: 45° C.

Tiempo de incubación: 24 horas.

Medio base lactosa con ácido fénico, bilis verde brillante, y cristal violeta.

Temperatura de incubación: 37° C.

Tiempo de incubación: 24 horas.

Material de siembra: leche al 1/250 desprovista de gérmenes del grupo Escherichia-aerobacter, adicionada de gérmenes de los cuatro grupos en una concentración aproximada de 10 células por cc.

Resultados: Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla III, de la cual podemos deducir:

a) La producción de gas en los colis fecales no es demasiado amplia, y se encuentra inhibida en el medio con ácido bórico. La producción de indol es asimismo ligera y no se encuentra en los medios con penicilina, ácido bórico, y formiato-ricinoleato sódico.

b) La diferenciación de colis fecales y coliformes indológenos es difícil, solamente en los medios con ácido fénico, cristal violeta, y

bilis verde brillante es posible, por la menor producción de gas de los últimos.

c) La diferenciación entre colis fecales y coliformes no indológenos, es sencilla por la ausencia de indol en los últimos, y su menor capacidad gasógena. Los medios que permiten mejor esta diferenciación, son los que llevan fuchina básica, desoxicolato sódico, ácido fénico, cristal violeta y bilis verde brillante.

d) Los gérmenes de la flora de la leche, son prácticamente inhibidos en los medios con penicilina, fuchina, desoxicolato sódico y ácido bórico, y en menor proporción en los medios con formiato-ricinoleato sódico, ácido fénico, cristal violeta, y bilis verde brillante.

e) Los medios que con mayor seguridad permiten la diferenciación entre los gérmenes de los tres grupos son los que llevan desoxicolato sódico, ácido fénico, cristal violeta, y bilis verde brillante.

Prueba número IV

Objeto: Con la finalidad de establecer rápidamente, si es posible, un método de diferenciación entre colis fecales y aerobacter, con aplicación posterior al resto de los coliformes, decidimos estudiar la influencia que sobre el crecimiento y metabolismo bacteriano, poder gasógeno sobre la dulcita y producción de indol, poseen diversas temperaturas de incubación y los productos inhibitorios que se comportaron mejor en las experiencias anteriores.

Variables: Medio base dulcita, con ácido fénico, desoxicolato sódico, bilis verde brillante, y cristal violeta.

Temperaturas de incubación: 37 y 45° C.

Tiempos de incubación: 24 y 48 horas.

Resultados: Los resultados obtenidos se expresan en la tabla IV, de cuyo análisis podemos deducir:

a) La temperatura tiene gran influencia sobre el metabolismo y crecimiento tanto de los colis fecales como de los aerobacter, inhibiéndose totalmente la producción de gas a 45°, con una fuerte reducción en el crecimiento.

b) En los colis fecales se observa, a 37°, una rápida y franca producción de indol, mientras que el poder gasógeno es escaso o nulo a las 24 horas, siendo preciso incubar 48 horas, para que éste sea neto.

c) Los medios con ácido fénico inhiben totalmente la producción de gas.

d) La diferencia entre colis fecales y aerobacter es neta a 37°, por la ausencia de gas, de indol y escaso crecimiento en estos últimos.

Prueba número V

Objeto: Se estudia el crecimiento y metabolismo, producción de gas e indol, de colis fecales y coliformes con y sin indol, sobre el medio MBD y diversos productos inhibitorios, a 37°, temperatura aconsejable según los resultados de la experiencia anterior.

Variables: Medio MBD con ácido fénico, desoxicolato sódico, bilis verde brillante, y cristal violeta.

Temperatura de incubación: 37°.

Tiempos de incubación: 24 y 40 horas.

Resultados: Se expresan en la tabla V, de cuyo análisis podemos deducir:

a) La diferenciación entre colis fecales y coliformes con indol es sencilla por la ausencia de gas en los últimos, a pesar de conservar su capacidad indológena.

b) La diferenciación con los coliformes sin indol es sumamente sencilla al faltar en estos gérmenes la producción de gas e indol.

c) El tiempo óptimo de incubación es de 40 horas.

d) El medio con ácido fénico, al inhibir la producción de gas en los colis fecales, no sirve para la diferenciación.

Prueba número VI

Objeto: Para poder comprobar la influencia que en la diferenciación de los colis fecales y coliformes con y sin indol, pudiera tener la flora microbiana de la leche, en vista de la utilización práctica de estos medios, decidimos repetir la experiencia anterior utilizando como material de siembra una dilución de leche, desprovista de colis y coliformes y adicionada de los gérmenes a estudiar.

Variables: Medio MBD con desoxicolato sódico, bilis verde brillante, y cristal violeta.

Temperatura de incubación: 37°.

Tiempo de incubación: 24 y 40 horas.

Material de siembra: 1 cc. de leche al 1/250 desprovista de gérmenes del grupo Escherichia-aerobacter al que le fueron adicionadas, por separado, gérmenes de los cuatro grupos a estudiar en una concentración final aproximada de 10 células por cc.

Resultados: Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla VI, de la que podemos deducir:

- a) La diferenciación entre colis fecales y coliformes con indol, es fácil con incubación de 40 horas, por la ausencia en los últimos de gas.
- b) La diferenciación entre colis fecales y coliformes sin indol, es también sencilla, por la incapacidad de éstos en la fermentación de la dulcita y en la producción de indol.
- c) Los gérmenes de la leche prosperan ligeramente en todos los medios sin producción de gas e indol, por lo que no interfieren en absoluto la diferenciación entre los tres grupos.

Prueba VII

Objeto: Ante la posibilidad de utilización del medio MBD con los productos inhibitorios, cristal violeta, desoxicolato sódico, o bilis verde brillante, en la investigación y diferenciación de colis fecales y coliformes en la leche, decidimos investigar la influencia que en los resultados pudiera realizar la lactosa aportada en la siembra.

VARIABLES: Medio MBD con desoxicolato sódico, bilis verde brillante, y cristal violeta.

Temperatura incubación: 37°.

Tiempo de incubación: 40 horas.

Adición de leche estéril: 1; 0,1 y 0,01 cc.

Resultados: Los resultados obtenidos se expresan en la tabla VII, de cuyo estudio se desprende:

a) La lactosa incorporada con un cc. de leche en los 10 cc. del medio MBD influye ampliamente en los resultados, modificándolos totalmente, con producción amplia de gases en todos los gérmenes estudiados, e inhibiendo ligeramente la capacidad indológena de los que la poseen.

b) La lactosa incorporada en 0,1 y 0,001 cc. de leche no afecta en absoluto los resultados obtenidos con el medio MBD desprovisto de la misma.

DISCUSIÓN DE LAS PRUEBAS

En el planteamiento de las pruebas indicamos que nuestras investigaciones en torno a la posible diferenciación de los colis de origen fecal, coliformes productores de indol y coliformes no indológenos, y apoyándose en su metabolismo proteico e hidrocarbonado, la centra-

riamos en la investigación de la capacidad de producción de indol y fermentación gasógena de la lactosa, y de la producción de indol y fermentación gasógena de la dulcita, sobre un único medio de cultivo, a diversas temperaturas y en presencia de diversos productos inhibitorios, bien para los coliformes o para la flora Gram positiva del agua y de la leche.

Los resultados obtenidos concuerdan con nuestras hipótesis iniciales, y nos han permitido comprobar, en los medios lactosados, la gran influencia que las temperaturas disgenéticas para los coliformes, 45° C, junto con los productos inhibitorios, tienen sobre el metabolismo hidrocarbonado y proteico de los mismos, facilitándonos los datos necesarios para la elección más idónea de aquéllas con relación a los últimos.

La diferenciación de los tres grupos de gérmenes sobre estos medios difiere y está en dependencia con las temperaturas de incubación, productos inhibitorios empleados, y número de células del inóculo.

Con una incubación de 24 horas, utilizando temperaturas de incubación de 37° para los medios con ácido fénico, bilis verde brillante, y cristal violeta, y de 45° para los de ácido bórico, desoxicolato sódico, formiato-ricinoleato sódico, fuchina básica y penicilina, con siembra de una gota de cultivo puro en caldo nutritivo de 24 horas de edad, la diferenciación entre colis fecales y coliformes productores de indol es difícil, a pesar del metabolismo ligeramente más bajo que sobre la lactosa poseen estos últimos. Solamente en los medios con ácido fénico es posible la diferenciación al inhibirse la producción de gas en los coliformes. Sin embargo, la diferenciación entre colis fecales y coliformes no indológenos es sumamente sencilla, por la ausencia de indol y la incapacidad o menor capacidad gasógena de los últimos.

Es preciso hacer constar que la producción de indol en estos medios lactosados, es ligera, aunque perfectamente detectable. Punto que está perfectamente de acuerdo con la opinión de diversos investigadores que aseguran existe una interferencia de la lactosa en la producción de indol por numerosos microorganismos, entre los que se encuentran los colis.

Cuando, y al objeto de estudiar el interés práctico de los resultados obtenidos hemos empleado en las siembras leche diluida exenta de colis y coliformes y contaminada experimentalmente con las cepas en estudio, a razón de 10 células por cc., aunque los factores temperatura y tiempo de incubación han sido los mismos, los resultados sin em-

bargo difieren notablemente de los anteriores. La causa es indudablemente la pobreza en gérmenes en el inóculo, siendo insuficientes las 24 horas de incubación. En estas condiciones la diferenciación entre colis fecales y coliformes con indol se torna más difícil al disminuir la capacidad gasógena de los primeros; el ácido bórico la inhibe totalmente. La producción de indol se encuentra asimismo disminuida y no se detecta en los medios con penicilina, ácido bórico y formiato-ricinoleato sódico. Los medios que mejor permiten la diferenciación son los que llevan cristal violeta o ácido fénico.

Sin embargo, la diferenciación entre colis fecales y coliformes no indológenos, es sencilla, por la ausencia de indol y la menor capacidad gasógena de los últimos. Los medios más idóneos para ello son los que llevan fuchina básica, desoxicolato sódico, ácido fénico, cristal violeta, o bilis verde brillante.

La flora normal de la leche, se encuentra prácticamente inhibida en todos los medios.

Desde el punto de vista práctico y con vistas a la utilización de estas pruebas en colimetrías cuanti y cualitativas, los medios que permiten con mejor facilidad la diferenciación entre los tres grupos de gérmenes son los que llevan desoxicolato sódico, ácido fénico, cristal violeta, o bilis verde brillante, trabajando con el primero a 45° y con el resto a 37°.

En los medios con dulcita, los resultados obtenidos son mucho más prometedores que con los lactosados. En primer lugar la producción de indol no se encuentra interferida, y por lo tanto es amplia y perfectamente detectable, por otra parte los coliformes carecen de poder fermentativo sobre este azúcar.

En las pruebas con el medio MBD, hemos utilizado solamente aquellos productos inhibidores de resultados aceptables en las pruebas anteriores, es decir, desoxicolato sódico, ácido fénico, cristal violeta y bilis verde brillante.

La temperatura influye notablemente en el desenvolvimiento bacteriano y en su metabolismo, hasta tal punto que a temperaturas de 45° el poder gasógeno de colis y coliformes es nulo y el crecimiento ligero. La producción de indol, sin embargo, no se encuentra interferida.

A temperaturas de 37° la diferenciación entre colis fecales, coliformes productores de indol, y coliformes no indológenos, en cultivo puro, es sumamente sencilla cuando el tiempo de incubación es como

mínimo de 40 horas, por la ausencia de gas en todos los coliformes. Todos los inhibidores ensayados son excelentes, excepto el ácido fénico que inhibe la producción de gas incluso en los colis fecales, por lo que debe ser rechazado para esta prueba.

Cuando hemos utilizado como siembra un inóculo preparado con leche diluida y exenta de colis y coliformes, y adicionada de las cepas en estudio a razón de 10 células por cc., los resultados son exactos a los anteriores, no existiendo en absoluto interferencias entre la flora normal de la leche y los colis y coliformes. Por otra parte esta flora es prácticamente inhibida por los productos inhibidores adicionados a los medios.

Hemos podido comprobar (Tabla VII) que la lactosa puede interferir notablemente los resultados de los medios con dulcita. Punto éste de gran interés en las colimetrías en leches. Cuando se adiciona a los medios dulcitados un cc. de leche estéril, los resultados son totalmente distintos a los medios sin ella. Los coliformes producen gas y la producción de indol se encuentra interferida, ello es debido sin duda alguna, a la fermentación de la lactosa que incorporamos con la leche. Sin embargo esta interferencia desaparece a partir de la incorporación de cantidades iguales o menores a 0,1 cc. de leche.

Desde el punto de vista práctico este fenómeno tiene interés en las colimetrías de leches pasterizadas, en las que habrá que desechar los medios dulcitados, a causa del gran volumen del inóculo, un cc. En las leches crudas prácticamente no existirá interferencia, puesto que ésta desaparecerá a partir de la dilución 1/10 en adelante.

A la vista de los resultados obtenidos, y a pesar del limitado número de cepas ensayadas, 10 por cada grupo, creemos que las pruebas con medios dulcitados pueden resolver las colimetrías "scripto sensu" en los análisis de aguas, moluscos y leches crudas. Para los análisis de leches pasterizadas por tratarse de colimetrías "lato sensu" los medios dulcitados no son recomendables al no detectar los coliformes sin indol, aparte de la interferencia de la lactosa, por lo que recomendamos los medios lactosados.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio encaminado a diferenciar sobre un mismo medio de cultivo líquido, los colis de origen fecal de los diversos

coliformes, al objeto de poder realizar colimetrías cuantitativa y cualitativamente de una forma sencilla y eficaz.

Para su estudio hemos agrupado las diferentes especies del Grupo Escherichia-aerobacter, en tres subgrupos denominados colis fecales, coliformes productores de indol y coliformes no indológenos.

La diferenciación la hemos planteado sobre el diferente metabolismo hidrocarbonado y proteico de las diferentes especies del grupo, investigando la fermentación de la lactosa y la producción de indol, o la fermentación de la dulcita y la producción de indol, paralelamente sobre un único medio de cultivo, a diversas temperaturas y en presencia de diferentes productos inhibitorios para los coliformes y para la flora Gram positiva del agua y de la leche.

Con los medios lactosados la diferenciación entre los tres grupos de gérmenes es posible, por la ausencia de indol en los coliformes no indológenos y la menor capacidad gasógena de los dos grupos de coliformes, frente a la franca producción de gas y capacidad indológena de los colis fecales. Sin embargo desde el punto de vista práctico puede existir confusionismo en la diferenciación entre colis fecales y coliformes indológenos, a causa de que su única diferencia, menor capacidad gasógena en los coliformes, puede ser falsamente interpretada según el criterio personal del investigador.

Los medios lactosados que mejor permiten la identificación de los tres grupos, son los que llevan desoxicolato sódico, ácido fénico, cristal violeta, o bilis verde brillante, trabajando con el primero a 45°C y con el resto a 37°C.

Con los medios dulcitados la diferenciación entre los tres grupos es más clara y precisa, a causa de la ausencia de gas en los cultivos de los coliformes, lo que permite establecer una sencilla identificación de los mismos. Colis fecales, producción de gas e indol; coliformes indológenos, producción de indol y ausencia de gas; y coliformes no indológenos, ausencia de gas e indol. Los medios que mejor permiten la identificación de los tres grupos, son los que llevan desoxicolato sódico, cristal violeta, o bilis verde brillante, con temperaturas de incubación de 37°C.

La lactosa incorporada en las siembras con leche puede interferir los resultados en los medios con dulcita, sin embargo a partir de diluciones de leche al 1/10 esta interferencia desaparece.

Se recomiendan los medios dulcitados como los más idóneos para realizar colimetrías "stricto sensu", cuantitativa y cualitativamente en aguas, moluscos y leches crudas. Para los análisis de las leches pasteurizadas, en el que el interés se centra en las colimetrías "lato sensu", al no detectar estos medios los coliformes no indológenos, aparte de la interferencia de la lactosa, recomendamos los medios lactosados.

RESUME

On a fait une étude sur la différentiation, dans un même milieu de culture liquide, des Colis d'origine fécale des divers Coliformes, à fin de pouvoir effectuer des déterminations colimétriques qualitatives et quantitatives d'une forme simple et en même temps efficace. Pour faciliter cette étude nous avons divisé les différentes espèces du groupe Escherichia-Aerobacter en trois sous-groupes nommés Colis fécales, Coliformes producteurs d'indol et Coliformes non-producteurs d'indol.

Nous avons basé cette différentiation sur le différent métabolisme hydrocarboné et protéique des différentes espèces du groupe, en faisant des recherches sur la fermentation du lactose et sur la production d'indol, ou sur la fermentation de la dulcite et sur la production d'indol, parallèlement sur un seul et même milieu de culture à diverses températures et en présence de divers produits inhibiteurs aux Coliformes ou à la flore Gram + de l'eau et du lait.

Avec les milieux contenant du lactose la différentiation dans les trois groupes de germes se fait possible par l'absence d'indol dans les Coliformes qui ne le produisent pas et une capacité plus petite de production de gaz des deux groupes de Coliformes en les comparant avec la production de gaz et la capacité indologène des Colis fécales. Cependant, sous le point de vue pratique il peut y avoir quelque confusion dans la différentiation entre les Colis fécaux et les Coliformes indologenes, dû à ce que leur unique différence, une capacité plus petite de produire du gaz dans les Coliformes, peut être faussement interprétée par l'opinion personnelle de l'investigateur.

Les milieux lactosés qui permettent mieux l'identification des trois groupes sont ceux qui contiennent desoxycolate de sodium, phénol, cristal violet, ou bile vert brillant, à une température de 45°C le premier, et de 37°C les autres.

Avec les milieux lactosés la différentiation entre les trois groupes est plus claire et plus exacte dû à l'absence de gaz dans les cultures des Coliformes, ce qui permet établir une identification très simple entre eux. Colis fécaux: production de gaz et indol; Coliformes indologènes: production d'indol et absence de gaz; et Coliformes non-indologènes: absence de gaz et d'indol. Les milieux qui permettent mieux l'identification des trois groupes sont ceux qui contiennent desoxycholate de sodium, crystal violet, ou bile verte brillante, à des températures d'incubation de 37° C.

Le lactose contenu dans l'ensemencement avec du lait peut interférer les résultats dans les milieux contenant de la dulcite; cependant, cette interférence disparaît dans des dilutions de lait à 1/10.

On recommande les milieux contenant de la dulcite comme les plus appropriés pour faire des colimétries "stricto sensu" quantitatives et qualitatives dans l'eau, les mollusques et le lait cru. Pour l'analyse des laits pasteurisés dont l'intérêt est surtout dans les colimétries "lato sensu", nous recommandons les milieux lactosés.

SUMMARY

A study has been carried out in order to distinguish the faecal colis from various coliforms on a similar liquid culture medium, with the purpose of being able to establish quantitative and qualitative colimetric methods of a simple and efficient type.

In this study we have placed the different types of Escherichia-Aerobacter group in three sub-groups: colis of faecal origin, indole-producing coliforms, and non-indole-producing coliforms.

We have based the differentiation upon the different hydrocarbonic and proteic metabolism of the various kinds of group. This was done investigating simultaneously on the same medium: (a) the lactose fermentation and indole production and (b) the dulcite fermentation and indole production, at various temperatures and in the presence of various agents which inhibit the coliforms or the Gram + flora of water and milk.

With lactose-containing media it is possible to distinguish the three groups of organisms because there is no indole production of gas

in the two coliform groups compared with the larger gas production of the faecal colis.

However, from a practical point of view there may be a confusion in differentiating between faecal colis and indole-producing colis because of their sole difference, that is to say, the smaller gas producing capacity of the coliforms, which may be erroneously interpreted according to the personal judgement of the experimenter.

The media which best permit the identification of the three groups in this case are those containing sodium desoxycholate, violet crystal, or violet crystal, or brilliant green bile, operating at 45° C with the first and at 37° C with the others.

With the dulcite-containing media the differentiation between the three groups is clearer and more exact because there is no gas in the culture of the coliforms. This permits a simple identification between them: faecal colis, production of gas and indole; indole-producing coliforms, production of indole but no gas; non-indole-producing coliforms, neither gas nor indole.

The media which best permit the identification of the three groups in this case are those containing sodium desoxycholate, violet crystal, or brilliant green bile, incubating at 37° C.

The lactose contained in the seeding with milk may interfere with the results in the dulcite-containing media. This interference, however, disappears in dilutions greater than 1/10th milk.

The dulcite-containing media are recommended as the most adequate for "stricto sensu" qualitative and quantitative colimetry in water, molluscs and natural milk. For the analysis of pasteurized milk in which one is interested in "lato sensu" colimetry, we recommend lactose-containing media.

TABLA A

CLASIFICACION DE COLIS Y COLIFORMES Y HABITAT DE LOS MISMOS

CLASIFICACION DE LOS GERMIENES	CARACTERISTICAS METABOLICAS						HABITAT
	Indol	H. M.	V. P.	Citrufo	Cres. Inc. tun. 44°	Celulosa	
<i>Esch. coli I</i>	+	+	-	-	+	-	Intestino, humano y animal
<i>Esch. coli II</i>	-	+	-	-	-	-	Dudososo. Puede ser intestino
<i>Esch. coli III ó Irre- gular I</i>	+	+	-	-	-	-	Intestino humano y animal
<i>Esch. freundii I</i> ...	-	+	-	+	-	-	Suelo
<i>Esch. freundii II</i> ...	+	+	-	+	-	-	Suelo. Intestino
<i>A. aerogenes I</i>	-	-	+	+	-	-	Plantas
<i>A. aerogenes II</i> ...	+	-	+	+	-	-	Plantas. Intestino
<i>A. cloacae</i>	-	-	-	+	-	-	Plantas
<i>Irregular II</i>	-	-	-	-	-	-	Dudososo
<i>Irregular III</i>	-	-	+	-	-	-	Dudososo
<i>Irregular IV</i>	-	-	+	-	-	-	Dudososo
<i>Irregular V</i>	-	-	+	-	-	-	Dudososo
<i>Irregular VI</i>	+	-	+	-	-	-	Dudososo
<i>Irregular VII</i>	-	-	-	-	-	-	Dudososo
<i>Irregular VIII</i>	-	-	-	-	-	-	Dudososo

TABLA I
DIFERENCIACION ENTRE COLIS FECALES Y AEROBACTER
(Medio MBL)

MEDIOS	COLI FECAL				AEROBACTER			
	37°		45°		37°		45°	
	24 h C. G. I.	48 h C. G. I.	24 h C. G. I.	48 h C. G. I.	24 h C. G. I.	48 h C. G. I.	24 h C. G. I.	48 h C. G. I.
MBL ácido bórico	+ 1/10 ±	+ 1/2 +	+ 1/10 ±	+ 1/10 +	+ - -	+ 1/10 -	± - -	+ - -
MBL ácido fénico	+ 1/3 +	+ 1/2 +	± - -	± - -	+ - -	+ 1/5 -	- - -	- - -
MBL bilis v. brillante	+ 3/4 ±	+ T +	+ 1/2 ±	+ 1/2 ±	+ 1/2 -	+ T -	+ 1/5 -	+ 1/2 -
MBL cristal violeta	+ 1/2 +	+ T +	+ 1/3 -	+ 1/2 -	+ 1/3 -	+ 1/3 -	+ 1/3 -	+ 1/3 -
MBL desoxicolato	+ 1/2 ±	+ 1/2 +	+ 1/3 ±	+ 1/2 +	+ 1/4 -	+ 1/3 -	+ 1/3 -	+ 1/3 -
MBL formiato-ricinoleato ...	+ T ±	+ T +	+ 3/4 ±	+ T ±	+ 3/4 -	+ T -	+ 1/2 -	+ 3/4 -
MBL fuchina	+ 1/2 +	+ 1/2 +	+ 1/2 +	+ 1/3 ±	+ 1/3 -	+ 1/3 -	+ 1/5 -	+ 1/4 -
MBL penicilina	+ 1/3 +	+ 1/2 +	+ 1/2 +	+ 1/2 +	+ 1/4 -	+ 1/3 -	+ 1/4 -	+ 1/3 -

Clave de todas las tablas:

C = crecimiento.

G = gas.

I = Indol.

H = habitualmente.

E = excepcionalmente.

T = total.

+ = positivo.

± = débilmente positivo.

- = negativo.

TABLA III

DIFERENCIACION ENTRE COLIS FECALES Y COLIFORMES EN CULTIVO PIRO

(Tiempo incubación 24 horas, media MBL)

MEDIOS	Temperatura	COLIS		COLIFORMES		CON INDOL	SIN INDOL	C. G. I.	C. G. I.
		FECALES	C. G. I.	C. G. I.	C. G. I.				
MBL ácido bórico	45°	H	+ 1/10 +	+	-	+	-	-	-
		E	+ - +	-	-	-	-	±	-
MBL desoxicolato	45°	H	+ 1/2 +	+ 1/2 +	+	-	-	-	-
		E	-	-	-	-	-	+	1/3 -
MBL formiato-ricinoleato ..	45°	4	+ T ±	+ 3/4 ±	+	3/4 -	-	-	-
		E	+ 3/4 ±	+ - -	-	-	-	+	3/4 -
MBL fuchina	45°	H	+ 1/2 +	+ 1/3 +	+	-	-	-	-
		E	-	-	-	-	-	+	1/3 -
MBL penicilina	45°	H	+ 1/2 +	+ 1/3 +	+	-	-	-	-
		E	+ 1/4 +	+ - +	-	-	-	+	1/3 -
MBL ácido fénico	37°	H	+ 1/3 +	+ 1/4 +	+	-	-	-	-
		E	+ 1/4 +	± - ±	-	-	-	+	1/3 -
MBL bilis verde brillante .	37°	H	+ 3/4 ±	+ 1/2 ±	+	1/5 -	-	-	-
		E	-	-	-	-	-	+	1/2 -
MBL cristal violeta	37°	H	+ 3/4 +	+ 1/2 +	+	1/4 -	-	-	-
		E	+ 1/3 +	+	-	-	-	+	3/4 -

DIFERENCIAZIONE ENTRE COLIS RECALLES Y COLEGIOS, EN PRESENCIA DE LA FLORA

(Tiempo de incubación 24 horas, medio MBL)

M E D I O S Tempe-
ratura
COLIFORMES CON INDOL SIN INDOL LECHE
COLIFORMES CON INDOL SIN INDOL LECHE
FLORES DE LA
GOMIS FEGALLES

TABLA IV
DIFERENCIACION ENTRE COLIS FETALES Y AEROBACTER
(Medio MBD)

MEDIOS	COLI FECAL						AEROBACTER					
	37°			45°			37°			45°		
	24 h.	48 h.	C. G. I.	24 h.	48 h.	C. G. I.	24 h.	48 h.	C. G. I.	24 h.	48 h.	C. G. I.
MBD ácido fénico	±	-	+	+	-	-	-	±	-	±	-	-
MBD desoxicolato	+	1/5	+	+	T	+	±	-	+	-	-	-
MBD bilis verde brillante ...	+	1/10	+	+	2/3	+	±	-	±	+	-	-
MBD cristal violeta	+	1/10	+	+	T	+	±	-	+	-	-	-

TABLA V
DIFERENCIACION ENTRE COLIS FETALES Y COLIFORMES EN CULTIVO PURO
(Temperatura de Incubación 37°, medio MBD)

MEDIOS	COLIS FETALES				COLIFORMES CON INDOL				COLIFORMES SIN INDOL			
	24 h.		40 h.		24 h.		40 h.		24 h.		40 h.	
	C.	G.	I.	C.	G.	I.	C.	G.	I.	C.	G.	I.
MBD ácido fénico	H	±	-	+	+	-	+	±	-	+	-	-
	E											
MBD desoxicolato	H	+	1/5	+	+	T	+	+	-	+	-	-
	E	+	1/10	+	+	3/4	+					
MBD bilis verde brillante ...	H	+	1/10	+	+	1/2	+	+	-	+	-	-
	E											
MBD cristal violeta	H	+	1/5	+	+	T	+	±	-	+	-	-
	E	+	1/10	+	+	3/4	+					

TABLA VI

DIFERENCIACION ENTRE COLIS FCALES Y COLIFORMES EN PRESENCIA DE LA FLORA DE LA LECHE
(Temperatura de incubación 37°, medio MBD)

MEDIOS	COLIS FCALES			COLIFORMES CON INDOL			COLIFORMES SIN INDOL			FLORA DE LA LECHE			
	24 h.			40 h.			24 h.			40 h.			
	C.	G.	I.	C.	G.	I.	C.	G.	I.	C.	G.	I.	
MBD desoxicolato	H	+ 1/10	+	+	T	+	±	-	+	+	-	+	-
	E									+ 1/4	+		
MBD bilis verde brillante .	H	+ 1/10	+	+	T	+	±	-	+	+	-	+	-
	E									+ 1/4	+		+ 1/10 -
MD cristal violeta	H	± 1/10	+	+	T	+	±	-	+	+	-	+	-
	E												

TABLA VII

INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE LECHE EN EL COMPORTAMIENTO DEL MEDIO MBD CON BILIS VERDE BRILLANTE, DESOXICOLATO Y CRISTAL VIOLETA

(Temperatura de incubación 37°)

GERMENES	cc. de leche	24 HORAS		40 HORAS			
		C.	G.	I.	C.	G.	I.
Colis fecales	-				+ 1/10	+	
	1				+ 1/3	±	+
	0,1				+ 1/10	+	+
	0,01				+ 1/10	+	+
Coliformes con indol	-				±	-	+
	1				+ 3/4	±	+
	0,1				±	-	+
	0,01				±	-	+
Coliformes sin indol	-				±	-	+
	1				+ 1/2	-	+
	0,1				±	-	+
	0,01				±	-	+

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, L. y STORGARDS, T., 1959.—XV Cong., Int. Lech., Vol. 3, Sec. 5, 1341-1344.
- A. P. H. A., 1953.—*Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, New York.
- BUTTIAUX, R., SAMAILLE, J., y PIERENS, Y., 1956.—An. I. Pasteur Lille, 8, 137-149.
- CRESPO GARCIA, J., 1948.—Tesis Doctoral, Madrid.
- GRAZIADEI-CELORIA, M. L., 1958.—G. Batt. Virol. Inmun., 51, 129-137.
- LEALI, L., 1958.—Igiene mod., 51, 665-718.
- LEVINE, M., TANIMOTO, R. H., MINNETTE, H., ARAKAKI, J., y FERNANDES, G. B., 1955.—Appl. Microbiol., 3, 310-314.
- MACKENZIE, E. F. W., TAYLOR, E. W., y GILBERT, W. E., 1948.—J. gener. microb., 2, 197.
- PIRAUX, E., 1940.—Le Lait, 20, 257-271.
- WILSESENS, A., y BUTTIAUX, R., 1958.—An. Ins. Pasteur, 94, 332-340.
- ZAPATERO, E. 1935.—Bol. Univ. Santiago de Compostela, 23, 107-152.