
BACTERIAS COLIFORMES FERMENTADORAS DE PECTINA I. SU INCIDENCIA EN EL AGUA

A. SÁNCHEZ MARROQUIN y BERTA FARRERA
Lab. de Microbiología Experimental.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I. P. N.

Coles (1928) niega que las formas intestinales de *Escherichia* sean capaces de atacar la pectina con producción de ácido o gas, pero admite, en cambio, que algunas de las especies de *Aerobacter* sí pueden atacarla produciendo ácido y gas hecho reconocido asimismo por Burkey, 1928, y que este carácter corresponde solamente a ciertos organismos comunes del suelo. Se ha admitido también (Burke-Gaffrey, 1932) que la mayoría de los gérmenes coliformes de la orina, corresponden a *A. aerogenes* y que *E. coli* al pasar a un medio no intestinal pierde algunas de sus características.

Por otra parte, Stanley (1939) y Stanley y Orton (1932) consideran a las bacterias de la pudrición blanda como variantes de *E. coli* e indican que debe tomarse en cuenta la presencia de dichos gérmenes al practicar análisis bacteriológicos del agua.

Tittsler y Sandholzer (1935) en un estudio del grupo "Intermediario" encuentran que algunas formas son capaces de fermentar la pectina con producción de gas o ligera acidez, siendo en realidad, gérmenes semejantes a los del género *Citrobacter*, descrito por Werkiman y Guillen en 1932.

Más tarde Stuart *et al.* (1938, 1942) y Parr (1939) se ocupan de la diferenciación taxonómica del grupo "coliforme", y Stanley (1939) sostiene que las bacterias de la pudrición blanda se asemejan a *E. coli* y que ésta puede atacar las plantas en condiciones adecuadas.

Pederson y Bred (1928) encontraron que algunas cepas no pigmentadas de *Serratia* podían ser del género *Aerobacter* y que algunas fermentadoras de pectina aisladas del agua corresponderían a cepas no pigmentadas de *Serratia*.

Werch *et al.* (1941) indicaron que algunas bacterias procedentes de heces fecales son capaces de fermentar la pectina, empleando como substrato pectina-cítrica al 1%.

Se sabe, además, que las diferentes especies de género *Erwinia* se caracterizan fundamentalmente por ser patógenas para las plantas y por fermentar la pectina (Bergey *et al.* 1939).

Por último McFadden, Weaver y Scherago (1942) estudiaron la incidencia en el agua y en las heces fecales del hombre y algunos animales, de las bacterias no esporuladas, gram-negativas, fermentadoras de la lactosa y la pectina, encontrando que de 259 cepas aisladas del agua, 71 fermentaron la pectina. De éstas, 35 fueron aisladas de medios con pectina y 36 de caldo lactosado. La clasificación fue la siguiente: 4 *E. coli*, 28 *A. aerogenes* y 32 intermediarios. Concluyen que puesto que se encuentra un número mucho mayor de fermentadoras de pectina en el agua, que en las heces, algunas de ellas, por lo menos no son de origen fecal.

En el presente trabajo se investiga la incidencia en el agua de gérmenes coliformes fermentadores de pectina con el objeto de averiguar sus relaciones taxonómicas con los grupos *Escherichia-Aerobacter* e intermediarios, y su posible significación sanitaria, en muestras de agua del Distrito Federal.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las muestras. Las aguas estudiadas procedieron de pozos artesianos del Depto. Central; plantas distribuidoras; manantiales de Tlalpan (Fuentes Brotantes), Xochimilco y Desierto de los Leones; arroyos; canales de riego; charcas y acequias.

Estudio bacteriológico. El estudio comprendió la investigación de coliformes fermentadores de la lactosa, la

pectina o ambos azúcares; la existencia de proteolíticos y la polución bacteriana. Se siguieron en todos los pasos, las indicaciones de la American Public Health Ass., 1936.

La fermentación de la pectina se estudió sembrando 4.0 y 0.1 ml de la muestra de agua en tubos de fermentación con caldo extracto pectinado de McFadden y medio sintético pectinado del mismo autor (1942), incubándose durante 7 días como máximo a 37° C. Como indicador combinado se usó bromocresol púrpura-rojo de cresol, en los dos medios. Se colocan 2 ml del medio basal en tubos de fermentación de Durham, esterilizando a 115° C, 15 minutos y añadiendo 2 ml de solución estéril de pectina preparada conforme a las indicaciones de McFadden et al. (1942). Como al agregar la pectina el medio se acidifica, es necesario alcalinizarlo con NaOH N estéril hasta alcanzar la neutralización. Para comprobar que la pectina carecía de azúcares reductores, se evaporó a sequedad un extracto de alcohol etílico al 70% y se hizo una prueba de Benedict cualitativa que resultó negativa. Como control se usó una cepa de *Erwinia carotovora* que produjo invariablemente ácido en los medios.

Los gérmenes que mostraron producción de ácido o de ácido y gas de la pectina, se resembraron en placas de gelosa-eosina-azul de metileno para investigar la presencia de coliformes. Las cepas así obtenidas se sembraron nuevamente en gelosa inclinada y se probaron más tarde, junto con las aisladas a partir de caldo lactosado, respecto a su poder de fermentar la lactosa y la pectina, determinándoseles, asimismo, sus caracteres IMViC. La contaminación bacteriana en las aguas estudiadas se determinó por el recuento de colonias en placas de gelosa simple. La presencia de proteolíticos se investigó inoculando en gelatina simple e incubando a la temperatura del laboratorio durante 48 horas.

Simultáneamente se repitieron las pruebas de fermentación de la lactosa y la pectina, en los medios siguientes: caldo extracto pectinado y medio sintético pectinado.

RESULTADOS

De las 100 muestras de agua estudiadas, se obtuvieron 51 cepas que de acuerdo con los "Standard Methods" podían considerarse presuntivamente como pertenecientes al grupo *Escherichia-Aerobacter* al desarrollarse en gelosa eosina-azul de metileno. De éstas, 34 se aislaron por enriquecimiento en caldo lactosado y 17 en medio pectinado (fermentadoras de pectina) como puede verse en la tabla I, en donde, asimismo, puede apreciarse que 49 de las 100 cepas estudiadas licuaron la gelatina y que 67 muestras dieron colonias en número superior a 200 por ml, lo que de acuerdo con el reglamento para los análisis de potabilidad de la República Mexicana (1938) indicaría que dichas aguas corresponden a la categoría de "no potables".

Las 51 cepas coliformes (según su crecimiento en gelosa-eosina-azul de metileno) se sometieron a la prueba de confirmación, encontrando la comprobación plena de su clasificación como coliformes por desarrollar a las 48 horas, produciendo ácido y más del 10% de gas, estableciéndose 8 grupos diferentes (tabla II) según sus caracteres IMViC. Como puede verse en la misma tabla, 36 cepas presentaron características de *E. coli*, difiriendo algunas de ellas solamente en algunos aspectos, 3 a *Aerobacter* y 12 al grupo intermediario, comprendiendo todos estos grupos tanto a los gérmenes aislados de caldo lactosado como a los obtenidos en medio pectinado.

Las 21 cepas aisladas de medio pectinado y las 30 de origen lactosa se sometieron nuevamente a la prueba de la fermentación de la pectina tanto en caldo extracto pectinado como en medio sintético con pectina, encontrando que esta vez sólo 2 de las cepas fermentaron activamente la pectina en el medio sintético (no en el caldo extracto) con producción de ácido y gas (tabla II). De acuerdo con sus características IMViC estas 2 cepas pertenecen al grupo de los intermediarios.

Por último, en la tabla III se resumen diversos datos acerca de la procedencia y número de las muestras, métodos de aislamiento, fermentación de lactosa y pectina y clasificación general. Sólo dos cepas fermentaron la pectina en la prueba final.

DISCUSION

Para algunos investigadores las bacterias aerobias no esporuladas, Gram-negativas, fermentadoras de la lactosa y la pectina, pertenecen a especies comunes de la flora normal del suelo y no al grupo de bacterias intestinales (Coles, 1928); para otros, en cambio parecerían estrechamente relacionadas con el género *Aerobacter* (Burkey, 1928), con las bacterias de la pudrición blanda (Stanley, 1939; Dowson, 1939, 1941; Elrod, 1941, 1942), con las formas típicas de *Escherichia*, *Aerobacter* o intermediarios. La opinión general, sin embargo, es que existe

una estrecha relación sistemática entre el grupo *Coli* y el género *Erwinia* (Stanley, 1932, 1939; Parr, 1939; Dawson, 1939, 1941; Stuart, 1938, 1942; Elrod, 1942; Werch, 1941; Mc.Fadden, 1942) y hasta se ha sostenido que este género "fue establecido sobre bases puramente utilitarias y que no tiene fundamento genético (Chester, 1938)." Asimismo. Elrod (1942) asegura que es posible relacionar a *Erwinia* con *Escherichia freundii* o con *Aerobacter cloacae*, distinguiéndose los organismos coliformes por no poseer la facultad de liberar protopectinasa, razón por la cual no pueden atacar las plantas.

TABLA I
PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS Y ALGUNOS DATOS BACTERIOLOGICOS

PROCEDENCIA	Número de muestras y cepas	Licuación de la Gelatina	Muestras, que dieron más de 200 Col. (Examen Directo)	Crecimiento coliforme en Gelosa-eosina-azul de metileno		Carácter del agua	
				De caldo lactosado	De medio Pectinado	Potable	No pot
Pozos del D. F.	40	14	21	9	2	16	24
Manantial	6	2	2	3	0	2	4
Arroyo	2	0	2	1	1	0	2
Llave	4	0	4	0	0	3	1
Canal	16	12	16	6	5	0	16
Pozo particular	5	0	1	0	0	2	3
Plantas distribuidoras	3	1	1	2	2	1	2
Charcas	17	14	17	10	5	0	17
Estanque	5	4	4	2	2	0	5
Lagos	2	2	2	1	0	0	2
Cifras totales	100	49	67	34	17	24	76
					51		

TABLA II
CARACTERISTICAS DE LAS 51 CEPAS COLIFORMES AISLADAS POR ENRIQUECIMIENTO EN CALDO-LACTOSADO PECTINADO

Grupos convencionales	Caracteres I M V i C	Número de cepas, origen Pectina	Número de cepas, origen Lactosa	Fermentación de Pectina		Fermentación de Lactosa	Clasificación	Núm de cep
				Exto	Sintético			
I	++—	12	20	—	—	À	<i>E. coli</i>	36
II	-+—	2	2	—	—	À	<i>E. coli</i>	
III	—++	0	2	—	—	À	<i>Aerobacter</i>	
IV	—+—	1	0	—	—	À	<i>Aerobacter</i>	
V	+—++	1	0	—	À	À	Intermediario ferm.de pectina	
VI	++-+	3	5	—	—	À	Intermediario	

VII	- + - +	1	1	-	-	À	Intermediario	
VIII	+ + - +	1	0	-	À	À	Intermediario ferm.de pectina	
Cifras totales.	12	21	30	0	2	51	—	51

+ = positivo. - = negativo. À = ácido y gas.

TABLA III
DATOS NUMERICOS DE LAS 100 MUESTRAS Y CEPAS DE LAS COLIFORMES

Proceden cia de la muestra	Número de mues- tras y cepas	Núm. total de cepas aisladas		Núm. de cepas que fermentan la Pectina		Clasificación de las cepas aisladas por enriquecimiento en Pectina y Lactosa		
		(Enriquecimiento en pectina, caldo exto y sintético)	Enriqueci-mi en Lactosa	Origen pectina	Origen lactosa	<i>Escheri- chia</i>	<i>Aero- bacter</i>	Interme-di
Pozos del Distrito Federal	40	2	5	0	0	4	1	2
Manantial	6	0	2	0	0	1	1	0
Arroyo	2	1	2	0	0	2	0	1
Llave	4	0	0	0	0	0	0	0
Canal	16	9	10	2	0	13	1	5
Pozo particular	5	1	1	0	0	0	0	2
Plantas distribuidoras	3	0	0	0		0	0	0
Charcas	17	5	8	0	0	13	0	0
Estanque	5	2	1	0	0	1	0	2
Lago	2	1	1	0	0	2	0	0
Cifras totales	100	21	30	2	0	36	3	12

Por otra parte, Pederson y Breed (1928) encontraron que algunas cepas pigmentadas del género *Serratia* podían clasificarse como *Aerobacter*, de donde McFadden et al. (1942) sugieren que algunas de las cepas fermentadoras de pectina aisladas del agua, que licúan rápidamente la gelatina y utilizan el ácido úrico, podrían ser cepas de *Serratia* no pigmentadas.

Como se ve, todos estos datos indican que el problema de las relaciones de las bacterias aerobias, no esporuladas, Gram-negativas, que fermentan la pectina, con las coliformes, es muy complicado y está siendo objeto de investigaciones particulares.

Del presente estudio se desprende que la incidencia en el agua de las bacterias coliformes fermentadoras de lactosa y pectina, cuando son investigadas con forme al curso ordinario del aislamiento de gérmenes coliformes, es apreciable, pues de 51 cepas estudiadas 13 exhibieron esas características (25.5%). Sin embargo, al probar por segunda vez estas cepas, se encontró que las realmente fermentadoras eran solamente 2. Esto indica, desde luego, que la verdadera incidencia de tales gérmenes fermentadores de pectina, no debe investigarse por una sola determinación en el transcurso del análisis bacteriológico rutinario de las aguas, puesto que el estudio posterior con las cepas ya purificadas y clasificadas respecto a sus reacciones IMViC, puede modificar los resultados.

Las 2 cepas aisladas por nosotros pertenecen, según la clasificación de Parr (1939) al grupo intermediario, una en relación con *Aerobacter* y la otra con *Escherichia*; pero si tomamos en cuenta que *Erwinia* y, en algunos casos, también *Serratia* pueden presentar los caracteres IMViC, de aquellas cepas, la clasificación resulta imposible, tomando en cuenta la falta de datos taxonómicos precisos respecto a ambos géneros, independientemente de su origen.

Ambas cepas fermentadoras de pectina produjeron ácido y gas habiendo sido aisladas de medio sintético pectinado, lo que nos hace suponer que dicho medio es más efectivo para apreciar la acidificación, que el caldo-extracto pectinado, quizá porque como lo señalan McFadden et al. (1942) se produzca álcali en el medio que enmascara la producción de ácido.

De las 21 cepas aisladas en medio pectinado 14 correspondieron a *E. coli*, 1 a *Aerobacter* y 6 a "intermediarios", lo que indica que esas 21 cepas originalmente fermentadoras de lactosa y pectina, pudieron haber sido consideradas como coliformes fermentadoras de pectina o como *Erwinia* con caracteres coliformes; pero como ya indicamos, de esas 21 cepas sólo 2 fermentaron la pectina con ácido y gas en las pruebas de confirmación de donde se infiere que la verdadera significación sanitaria de las bacterias aerobias, Gram-negativas, no esporuladas, fermentadoras de la lactosa y la pectina, es poco apreciable.

Concordamos con MacFadden *et al.* en que nuestras cepas fermentadoras de pectina, aisladas del agua, aparecen relacionadas con los "intermediarios" (una a los de *Escherichia* y otra a los de *Aerobacter*), pero diferimos en que además de ácido obtuvimos producción de gas en ambos casos.

SUMARIO

Se estudiaron 100 muestras de agua para investigar la incidencia de las bacterias coliformes fermentadoras de la pectina, habiéndose aislado 51 cepas con características del grupo coliforme en gelosa-eosina-azul de metileno, después de enriquecimiento en caldo extracto pectinado, medio sintético pectinado o caldo lactosado. De éstas, 17 fermentaron la pectina.

Con las 51 cepas coliformes purificadas y clasificadas se volvió a la prueba de la fermentación de la pectina, encontrando esta vez que sólo dos de las cepas resultaron positivas, de donde se concluye que la incidencia en el agua de las bacterias coliformes fermentadoras de pectina es poco apreciable y que no es posible establecer su significación sanitaria.

Ambas cepas fermentaron la pectina con producción de ácido y gas y pertenecen al grupo intermediario.

Al clasificar las 51 cepas coliformes según sus caracteres IMViC, se establecieron los siguientes grupos: *E. coli* típico, 37 cepas; *E. coli* no productor de indol, 4 cepas; *Aerobacter* típico, 2 cepas; *Aerobacter* V. P. negativo, 1 cepa; "intermediarios" de *Aerobacter* fermentadores de pectina, 1 cepa; "intermediarios, de *Escherichia*, 8; "intermediarios" de ambos géneros, 2; "intermediarios" de *E. coli* fermentadores de pectina, 1 cepa; es decir 36 cepas de *E. coli*, 3 de *Aerobacter* y 12 de "intermediarios".

SUMMARY

One hundred water samples were studied regarding the incidence of the pectin-fermenting coliform bacteria, isolating 51 coliform strains of which only 2 fermented pectin. These 51 coliform strains were classified according to their IMViC characters as follows: 36 *E. coli*, 3 *Aerobacter* and 12 Intermediates.

The 2 pectin-fermenting coliforms were: one belonging to the *Aerobacter* intermediates and one to the *E. coli* intermediates Both of them produced acid and gas.

It is therefore concluded that the incidence of *Erwinia*-like bacteria in water is negligible and that it is not possible to establish their sanitary significance.

BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1936. Standard Methods for the Examination of Water and Sewage. 8th ed. New York, N. Y.
- BERGEY ET AL. 1939. Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co. 5th ed. Baltimore.
- BURKE- GAFFNEY, H. J., O. D. 1932. The classification of the colon aerogenes group of bacteria in the sanitary examination of water supplies in the tropics and the temperate climates. *Jour. Hyg.* 32: 85-131.
- BURKEY, L. A. 1928. The fermentation of cornstalks and their constituents. I Studies on the pectin fermenting bacteria. *Iowa State College J. Sci.*, 3:57-100.
- CHESTER, F. D. Citado por Parr.
- COLES, H. W. 1928. The digestion of pectin and methylated glucose by various organisms. *Plant Physiol.*, 1: 379-384.
- DOWSON, W. J. 1939. On the systematic position and generic names of the Gram-negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt Bakt. Parasitenk, Abt. II*, 100: 177-193.
- DOWSON, R. P. 1941. The identification of the bacteria commonly causing soft-rot in plants. *Ann. Applied Biol.*, 28: 102-106.
- ELROD, R. P. 1941. Serological studies of the Erwiniae. I. Erwiniae amylovora. *Bot. Gaz.* 103: 123-131.
- ELROD, R. P. 1942. The Erwinia-coliform relationships. *Jour. Bact.*, 44: 433-440.
- McFADDEN, D. B., R. H. WEAVER, y M. SHERAGO. 1942. The sanitary significance of pectin-fermenting, lactose-fermenting, Gram negative non-spore-forming bacteria in water. *Jour. Bact.* 44: 191-200.
- PARR L. W. 1939. Coliform bacteria. *Bact. Rev.* 3: 1-48.
- PEDERSON, C. S. y R. S. BREED. 1928. The fermentation of glucose by organisms of the genus *Serratia*. *Jour. Bact.* 16:163-183.
- REGLAMENTO PARA LOS ANÁLISIS DE POTABILIDAD DE LAS AGUAS DE LA REPÚBLICA MEXICANA. Diario Oficial, 8 de noviembre de 1938.
- STANLEY, A. R. 1939. Physiologic and serologic studies of the soft-rot and colon group of bacteria. *W. Va. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 287.
- y C. R. ORTON. 1932. Bacterial stalk rot of sweet corn (Abst) *Phytopath.*, 22:26.
- STUART, C A., M. GRIFFIN y M. BAKER. 1938. Relationships of coliform organisms. *Jour. Bact.* 36: 391-410.
- STUART, C. A. ZIMMERMAN, M. BAKER y R. RUSTIGIAN. 1942. Eijkman relationship of the coliform and related bacteria. *Jour. Bact.* 43:55-572.
- TITSLER, R. P. y L. A. SANDHOLZER. 1935. Studies on the Escherichia-Aerobacter intermediates. I. Cultural characteristics. *Jour. Bact.*, 23: 349-361.
- WERCH, S. C., A. A. DAY, R. W. JUNG y A. C. IVY. 1941. Role of the intestinal bacteria in the decomposition of pectin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 46: 569-573.
- WERKMAN, C. H. y G. F. GILLEN. 1932. *Jour. Bact.*, 23: 167-182. Citado por Tittsler y Sandholzer (19).