
BACTERIAS COLIFORMES FERMENTADORAS DE PECTINA II. INCIDENCIA EN LA LECHE Y SIGNIFICACION SANITARIA

A. SÁNCHEZ MARROQUIN y ELENA

ALVARADO

Laboratorio de Microbiología Experimental.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I. P.
N.

Se han señalado repetidas veces las relaciones que aparentemente existen entre las llamadas "bacterias coliformes" (*Escherichia*, *Aerobacter* e intermediarios) y las del género *Erwinia*.

Como a esta últimas las distingue el carácter de fermentar la pectina además de la lactosa, se han realizado diversos estudios respecto al comportamiento de las "coliformes" en medios pectinados, sus relaciones taxonómicas con los géneros *Erwinia*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Klebsiella* y su significación sanitaria en el agua, hechos acerca de los cuales nos hemos referido en otra publicación (Sánchez Marroquín y Farrera, 1948).

En la presente comunicación se da cuenta de la incidencia en la leche de las bacterias aerobias, Gram-negativas, no esporuladas, fermentadoras de la lactosa y la pectina, con el propósito de averiguar si su presencia representa algún valor de significación sanitaria.

En este sentido Stark, citado por Parr (1939) estableció que la leche cruda puede contener bacterias coliformes y que como las vacas no padecen la fiebre tifoidea, la presencia de coliformes no tiene el mismo significado que en el agua. Señala, asimismo, que hay variedades que resisten las temperaturas de la pasteurización y que la leche pasteurizada puede sufrir nuevas contaminaciones.

Malcolm (1939) estudia los tipos coliformes en relación a su enriquecimiento en la leche almacenada a baja temperatura, concluyendo que a 17° C. es más baja la velocidad de multiplicación de *E. coli*.

Por otra parte, Murphy *et al* (1943) encontraron 70 casos de infección de la glándula mamaria de los bovinos con bacterias coliformes y deducen que la fuente de infección son las heces, estando la ubre más predispuesta para el *A. aerogenes*, siendo, pues, la mastitis de las vacas, una de las razones de la presencia de estos organismos en la leche (Rowlands, 1939, Swart *et al.*, 1938).

Más tarde Long *et al.* (1944) estudian los organismos coliformes que resisten la pasteurización haciendo notar que los resistentes pertenecieron al género *Escherichia* y los no resistentes a *A. aerogenes*.

Por último, en 1945 Minut investigó la presencia de coliformes en leches con tratamiento postérmico y concluye que los recuentos bacterianos en la leche no constituyen un índice muy satisfactorio de su calidad sanitaria.

MATERIAL Y METODOS

Origen de las muestras. Las muestras de leche utilizadas procedieron de diferentes expendios y entregas a domicilio, anotando su tipo y el nombre del establo o planta pasteurizadora.

Estudio bacteriológico. Se siguieron en términos generales las técnicas para las pruebas presuntivas, parcialmente confirmadas y de comprobación de la colimetría, recomendadas por la American Public Health Association. (1941) De cada muestra de leche se hizo una resiembra en 6 placas para efectuar el aislamiento de colonias y obtener las cepas. Las placas se incubaron a 37° C. durante 24 a 48 horas como máximo. En las cepas aisladas y puras se determinaron los caracteres IMViC, fermentación de la pectina (McFadden *et al.* 1942) y licuación de la gelatina en cada una de ellas. Al mismo tiempo que se hacía la siembra en tubos de Smith, se practicaron siembras en tubos de Durham con medio pectinado sintético. Las cantidades de leche empleadas fueron las siguientes: 0.4 y 0.1 ml cada dilución por duplicado incubando a 37° C. durante 4 a 10 días. De los tubos positivos se hicieron resiembras a placas de gelosa-eosina-azul de metileno y Endo. Las colonias típicamente

coliformes se pasaron a tubos de Durham para observar la fermentación de la lactosa con producción de ácido y no menos del 10% de gas. Los cultivos con reacción positiva se conservaron y se les determinó sus caracteres IMViC y la licuación de la gelatina. El medio pectinado sintético se preparó conforme a las instrucciones de McFadden *et al.* eliminando los tubos contaminados y usando como controles *Erwinia carotovora* y *Escherichia coli*, dos tubos con cada una de las cepas, incubando uno de cada uno a 30 y a 37° C.

Cada una de las reacciones estudiadas en este trabajo fue probada dos o tres veces en una misma cepa, para fijar bien sus caracteres.

RESULTADOS

Se estudiaron 20 muestras de leche de diverso tipo y diferente procedencia aislando las bacterias no esporuladas, Gram-negativas, fermentadoras de la lactosa con producción de ácido y no menos del 10% de gas, que de acuerdo con sus caracteres IMViC pueden considerarse como pertenecientes al grupo *Escherichia-Aerobacter*. En total se aislaron 154 cepas, de las cuales 75 se aislaron a partir del enriquecimiento en caldo lactosado simple con bromocresol-púrpura como indicador, y las 79 restantes a partir de medio pectinado sintético. Los resultados aparecen en las tablas I y II.

Los grupos establecidos según las reacciones IMViC y fermentación de la pectina se muestran en la tabla II en donde puede apreciarse que con las 75 cepas de origen lactosa se establecieron 5 grupos y con las 79 de origen pectina, 9 grupos. Los 5 primeros grupos son los siguientes: grupo I correspondiente a *E. coli* típica, con 51 cepas; grupo II correspondiente a *E. coli* indol negativa, con 6 cepas; grupo III a *Aerobacter aerogenes* con 4 cepas; grupo IV a intermediarios de *E. coli*, con 13 cepas y grupo V: a Intermediarios de *E. coli* fermentadores de pectina, con una cepa.

Los 9 grupos establecidos con las cepas de origen pectina son los siguientes: grupos I, II, III, IV, y V iguales a los anteriores, con 33, 1, 11, 17 y 1 cepas respectivamente; grupo VI correspondiente a la sección *coli* con 7 cepas; grupo VII intermediario de *E. coli* con 1 cepa; grupo VIII correspondiente a la sección *Aerobacter* con 6 cepas y grupo IX, intermediario de *E. coli* fermentador de pectina con producción de ácido solamente 1 cepa. Como se ve, se obtuvieron solamente 3 cepas coliformes fermentadoras de pectina, una aislada a partir de enriquecimiento en caldo-lactosado, y dos a partir de enriquecimiento en medio-pectinado. Dos de ellas produjeron ácido y gas, y una ácido solamente, siendo esta última licuadora de la gelatina.

TABLA I

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS DE LECHE ESTUDIADAS CON RESPECTO A SU PROCEDENCIA Y ALGUNOS DATOS BACTERIOLOGICOS

Número de la muestra	PROCEDENCIA	Licuación Gelatina	Fermentación de Lactosa			Fermentación de la Pectina		Crecimiento coliforme en Endo		Núm. de Cepas Coliformes aisladas de cada muestra (Total 15 Cepas)
			1 cc.	0.1 cc.	0.05 cc.	0.1 cc.	0.4 cc.	Caldo Lactosado	Medio Pectinado	
1	Pasteurizadora de Guamantla	-	Á	Á	Á	Á	+	+	+	8
2	Certificada de Cuautitlán	-	Á	Á	Á	Á	Á	+	+	8
3	Certificada de Los Robles	-	Á	Á	+	Á	Á	+	+	8
4	Certificada de El Rosario	-	Á	Á	Á	+	Á	+	+	8
5	Certificada del rancho S. Javier	-	Á	Á	+	Á	+	+	+	8
6	Certificada de San Antonio	-			+	+	+	+	+	8
7	Certificada entregada a dom.	+	Á	Á	Á	Á	+	+	+	8
8	Certificada del establo Temoluca	-	Á	Á	Á	+	Á	+	+	8

9	Pasteurizada de la lechería Holanda	-	À	À	+	+	À	+	+	7
10	Leche cruda de Santa Fe	+	À	À	À	À	À	+	+	7
11	Pasteurizada Excélsior	-	À	À	À	+	À	+	+	8
12	Certific. de La Rosa de Castilla	+	À	À	À	À	À	+	+	8
13	Certificada de Canutillo	-	À	À	+	+	+	+	+	8
14	Leche cruda de Santa Fe	-	À	À	+	+	À	+	+	8
15	Pasteurizada de La Granja	-	À	À	+	+	+	+	+	8
16	Certificada del rancho Buena Vista	-	À	À	+	+	+	+	+	7
17	Pasteurizada de El Perujo	-	À	+	+	+	À	+	+	8
18	Pasteurizada de El Perujo	-	À	À	+	+	+	+	+	7
19	Certificada de la hacienda San Mateo Tecoloapan	-	À	À	+	+	À	+	+	7
20	Certificada Hda. San Miguel	-	À	À	+	+	À	+	+	7

+ = positiva. - = negativa. À = ácido y gas.

TABLA II

GRUPOS CONVENCIONALES DE LAS CEPAS AISLADAS Y SUS CARACTERISTICAS PRINCIPALES

GRUPO	Número cepas origen Lactosa	Número cepas origen Pectina	CARACTERES BIOQUIMICOS			CARACTERES IMViC				CLASIFICACION
			Fermentación de la pectina	Fermentación de la Lactosa	Licuaón de la gelatina	Indol.	R.M.	V.P.	Citrato	
I	51	33	-	0	-	+	+	-	-	<i>E. coli</i>
II	6	1	-	0	-	-	+	-	-	<i>E. coli</i>
III	4	11	-	0	-	-	-	+	+	<i>Aerobacter</i>
IV	13	17	-	0	-	-	+	-	+	Intermediario
V	1	1	À (2)*	0	-	+	+	-	+	Intermediario
VI	-	7	-	0	-	+	-	-	-	<i>E. coli</i>
VII	-	1	-	0	-	+	+	-	+	Intermediario
VIII	-	6	-	0	-	-	-	-	+	<i>Aerobacter</i>
IX	-	1	+(1)*	0	+	-	+	-	+	Intermediario
Totales.	75	79	3	154	1	94	126	15	55	

* Las cifras entre paréntesis, indican el número de cepas.

+ = positiva. - = negativa. À = ácido y gas.

TABLA III

DATOS DE LAS MUESTRAS Y NUMERO DE CEPAS AISLADAS DE CADA UNO DE LOS MEDIOS EMPLEADOS

Número de muestras	TIPO DE LECHE	Núm. de cepas origen pectina (medio sintético)	Núm. de cepas origen Lactosa	Núm. de cepas origen pectina que fermentan Pect. y Lactosa (Prueba final)	Núm. de cepas origen Lactosa que fermentan Pect. y Lactosa (Prueba final)	CLASIFICACION DE LAS CEPAS ORIGEN PECTINA Y LACTOSA		
						<i>Escherichia</i>	<i>Aerobacter</i>	Intermediarios
6	Pasteurizada	23	23	0	0	33	5	8
12	Certificada	48	45	1	0	58	15	20
2	Cruda (no certificada)	8	7	1	1	8	1	6
Cifras totales (154 cepas de 20 muestras)		79	75	2	1	99	21	34

Por último en la tabla III se suman diversos datos respecto al número de muestras y número de cepas aisladas de cada uno de los medios empleados así como la clasificación de las cepas aisladas.

DISCUSION

Ya ha sido señalada la heterogeneidad del grupo "coliforme" (Parr, 1939; Elrod, 1941, b y c), y la variabilidad de las pruebas bioquímicas así como las estrechas relaciones entre los representantes de dicho grupo. Por otra parte, el género *Erwinia* complica las relaciones. Para unos investigadores este género reúne a las bacterias de la pudrición blanda, para otros está estrechamente relacionado con las formas típicas de *Escherichia-Aerobacter* (Burkey, 1928) o con los intermediarios (McFadden *et al.*, 1942), admitiéndose una estrecha relación sistemática *Erwinia*-coliformes. (Stanley, 1932, 1939; Stuart, 1938; Parr, 1939; Dowson, 1939, 1941; Elrod, 1941; McFadden *et al.*, 1942). Por un lado Parr admite el género *Erwinia* sobre bases puramente utilitarias sin posición genética alguna y, en cambio, Elrod señala que la colocación de los organismos de la pudrición blanda en un género aparte de los coliformes es válida, pues la propiedad que tienen de liberar proto-pectinasa es un criterio de suficiente valor para separar a las *Erwinia* virulentas de otros fermentadores de la lactosa, estando relacionadas por una parte con *E. freundii* por sus caracteres IMViC y con *A. cloacae* por su propiedad de licuar rápidamente la gelatina, producir ácido del glicerol y ser móviles, pero distinguiéndose de las *Erwinias* en que éstas producen proto-pectinasa.

Suart *et al* (1938, 1940, 1944) también indican la posibilidad de confusión entre cultivos de *Erwinia* y organismos coliformes y Pederson y Breed (1928) señalan que algunas cepas no pigmentadas de *Serratia* pueden clasificarse como *Aerobacter*. McFadden y colaboradores (1942), por otra parte, encontraron que algunas cepas fermentadoras de pectina aisladas del agua y que además licuaban rápidamente la gelatina y utilizaban el ácido úrico, pueden ser cepas no pigmentadas de *Serratia*. Estos mismos autores concluyeron que no es posible establecer el significado sanitario en el agua de los organismos Gram-negativos, no esporulados, fermentadores de la lactosa y la pectina hecho que también ha sido corroborado en otro trabajo (Sánchez Marroquín y Ferrera, 1943).

Por último Burkey (1928) y Coles (1928) encontraron que algunas cepas de coliformes eran capaces de producir ácido y gas de un medio pectinado sintético.

En el presente trabajo se aislaron 2 cepas productoras de ácido y gas en medio pectinado y una que sólo produjo gas. Estas 3 cepas, obtenidas de 154 cepas coliformes pertenecen al grupo de los intermediarios, según la clasificación de Parr: 2 de ellas con los caracteres IMViC: + + - +, y la otra con: - + - +, por lo que se infiere que las 3 están aparentemente relacionadas con *E. coli*, pero tomando en cuenta que *Erwinia* y algunas veces *Serratia* presentan esos caracteres, esta clasificación no resulta razonable por falta de datos taxonómicos precisos para ambos géneros. Sin embargo como las 3 producen proto-pectinasa, bien pudieran catalogarse como probables *Erwinias*.

Dado que sólo se aislaron estas 3 cepas fermentadoras de pectina, su significado sanitario en la leche es poco apreciable, pudiendo interpretarse su presencia como una contaminación casual.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

En 20 muestras de leche de diversa procedencia, se investigó la incidencia de las bacterias coliformes fermentadoras de pectina, aislándolas a partir de enriquecimientos en caldo-lactosado y en medio sintético pectinado de McFadden *et al.*, con resiembra en ambos casos en medio de Endo y gelosa-eosina-azul de metileno, obteniéndose en total 154 cepas coliformes.

Al clasificar estas 154 cepas según sus caracteres IMViC se obtuvieron los resultados siguientes: 84 cepas de *E. coli* típica; 8 de *E. coli* indol-negativa; 7 de las sección *coli* indol-positiva y R: M.-negativa; 15 de *Aerobacter* típico; 30 de intermediarios de *E. coli* indol-negativa; 1 intermediaria de *E. coli* indol-positiva y R. M.-positiva; 6 de la sección *Aerobacter*, V. P.- negativas y citrato-positivas; 1 intermediaria de *E. coli*, indol-negativa, fermentadora de la pectina con producción de ácido y proteolítica, y 2 intermediarias de *E. coli* que fermentaron la pectina con producción de ácido y gas.

Una de las cepas se obtuvo a partir de enriquecimiento en lactosa, y las otras 2 a partir de enriquecimiento en medio pectinado, dos de ellas procedieron de una misma muestra de leche certificada.

Se concluye que el significado sanitario en la leche, de las bacterias aerobias, Gram-negativas, no esporuladas, fermentadoras de la lactosa y de la pectina, es poco apreciable, ya que de 154 cepas coliformes aisladas, solamente 3 fermentaron la lactosa y la pectina, pudiendo interpretarse su presencia en la leche como una contaminación casual.

SUMMARY

154 coliform bacteria were isolated from 20 milk samples and studied regarding the incidence of pectin-fermenting strains among them. The results indicated that only three fermented pectin and were classified as *E. coli* intermediates. It is assumed therefore that the presence of the pectin fermenting coliform bacteria in milk is somewhat unimportant and possesses little or no sanitary significance.

BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1941. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. New York, N.Y.
- BURKEY, L. A. 1928. The fermentation of cornstalks and their constituents. I. Studies of the pectin fermenting bacteria. *Iowa State Coll. J. Sci.*, 3:57-100.
- 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.
- 1941. The identification of the bacteria commonly causing soft-rot in plants. *Ann. Applied Biol.*, 28:102-106.
- ELROD, R. P. 1941. a. Serological Studies of the Erwinieae. I. *Erwinia amylovora*. *Bot. Gaz.*, 103:123-131.
- 1941. b. Serological studies of the Erwinieae. II: Soft-rot group; with some biochemical considerations. *Botan. Gaz.*, 103: 266-279.
- 1941. c. The Erwinia-Coliform Relationship. *Jour. Bact.*, 44:433-440.
- LINK, G. K. y W. H. TALIAFERRO. 1928. Further agglutination test with bacterial plant pathogens. II Soft-rot group.

Bacillus aridus and *Bacillus carotovorus*. *Bot. Gaz.*, 85:198-207.

- LONG, H. F., T.I. HENRICK y B. W. HAMMER. 1944. Heat resistant coliform organisms with particular reference to butter. *Jour. Milk Technol.*, 7 (1) :20 (Iowa Agric. Exp. Sta. Am.)
- MALCOLM, J.F. 1939. The enrichment of *Aerogenes-cloacae* types in milk held at low temperatures: with observations on the relative rates of growth of *Aerogenes-cloacae* and *B. coli* types in milk at different temperatures. *Jour. Dairy Rev.* (W. Scotland Agric. Coll. Glasgow), 10 (3): 410-425.
- McFADDEN, D.B., R.H. WEAVER y M. SCHERAGO. 1942. The sanitary significance of pectin-fermenting, lactose-fermenting, Gram-negative, nonspore forming bacteria in water. *Jour. Bact.*, 44:191-200.
- MINUT, J. 1945. En procura de una ajustada reflexión de la "colimetría" post-tratamiento térmico de la leche. *Ind. Lechera*, 27:315.
- MURPHY, J. M. y J. J. HANSON. 1943. Infection of the bovine udder with coliform bacteria. *New Jersey Agric. Exp. Sta. Sussex Cornell Vet.*, 33 (1):61-77.
- 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.
- ROULANDS, A. 1939. The udder as a possible source of coliform organisms in milk. *Jour. Hyg.*, 39:454-462.
- SANCHEZ MARROQUIN, A. y B. FARRERA. 1948. Bacterias coliformes fermentadoras de pectina I. Su incidencia en el agua. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 8:47-57.
- STANLEY, A. R. y C. R. ORTON. 1932. Bacterial stalk rot of sweet corn. (Abst.) *Phytopath.*, 22:26.
- 1939. Physiologic and serologic studies of the soft-rot and colon group of bacteria. *W. Va. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 287.
- STUART, C. A., A. M. GRIFFIN y M. BAKER. 1938. Relationships of coliform organisms. *J. Bact.* 36:391-410.
- STUART, C. A., F. L. MICKE y E. K. BORMAN. 1940. Suggested growing of slow lactose fermenting coliform organisms. *Am. J. Pub. Health.* 30:499-508.
- STUART, C. A., K. M. WHEELER, y A. M. GRIFFIN. 1938. Coliform organisms in certified milk. *Jour. Bact.* 36 (4): 411-418.
- E. K. BORMAN, y K. M. WHEELER. 1944. Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. *Jour. Bact.* 48 (3): 351-367.