Fermentación de glucosa por bacterias del grupo coli-aerógenes

Por DELIA ROSA CANEPA y CARLOS S. DE LA SERNA

El estudio de los gérmenes de este grupo es de gran interés dado el desacuerdo actual en lo que respecta a su clasificación y la importancia que tienen en el análisis bacteriológico de las aguas de consumo cuando se buscan indicios de la contaminación fecal en las mismas.

Los procesos de fermentación de glucosa por estos organismos fueron estudiados principalmente por HARDEN y sus colaboradores, GREY, KLUYVER y sus discípulos.

El número elevado de productos que se forman a partir del azúcar; la variación de la proporción entre los mismos según las condiciones en las cuales se realiza la experiencia; la imposibilidad de seguirlos de cerca dada la velocidad que caracteriza a las reacciones y sumado a esto la dificultad de separar y dosificar substancias de constitución química semejante en un medio de cultivo, son circunstancias por las cuales es un problema complejo explicar el mecanismo de estos procesos aun cuando todos los investigadores coinciden en que es por una serie de reacciones intermedias que se llega del sustrato a los productos finales.

De acuerdo con el análisis cualitativo y cuantitativo del medio fermentado, HARDEN [1] encontró que el *B. coli* produce a partir de la glucosa las siguientes substancias: anhidrido carbónico, hidrógeno, alcohol etílico, ácidos fórmico,

acético, láctico y succínico y explicó su formación de una manera incompleta y poco satisfactoria que tiene sin embargo el mérito de haber sido la primera. Más tarde GREY [2] imaginó un esquema que interpreta bastante claramente el origen de la mayor parte de los productos, esquema del cual se desvió por no poder incluir en él el ácido succínico. Otros investigadores posteriores representaron el proceso de distintas maneras, pero en general han supuesto series de reacciones tales, que tanto los productos principales como los secundarios aparecen al final de la fermentación, es decir, que del punto de vista cualitativo concuerdan sus teorías con la experiencia. No obstante todas fallan en algo fundamental: sus autores no han tenido en cuenta que las relaciones cuantitativas entre los productos de desasimilación encontradas por el análisis cuidadoso del medio fermentado deben coincidir con las que se esperan según la teoría y esta consideración es tan importante que basta para destacar la enorme superioridad de los estudios que, en este sentido, realizaron en Delft, KLUYVER y sus discípulos.

Si el azúcar puede transformarse por acción de las bacterias según varios caminos de reacción, y si entre los productos primarios pueden haber reacciones secundarias independientes, es evidente que las cantidades parciales de los productos finales serán susceptibles de variar en cada experiencia, pero deben haber entre ellos, de acuerdo con el esquema considerado, relaciones definidas y constantes que se pueden comprobar calculando, en base a los resultados del análisis, el número de moléculas de cada substancia que corresponden a *n* moléculas de sustrato transformado y haciendo con estos datos un balance de fermentación. Si los resultados del balance son satisfactorios se tiene una prueba muy importante en favor de la teoría. Si por el contrario aquél no cierra, el esquema no es exacto o no es completo. En este caso siempre es posible ampliarlo de modo que concuerde con la experiencia, pero a veces se deben admitir para esto reacciones tales que el esquema deja de ser probable.

Encarando los estudios de esta manera KLUYVER y SCHEFFER [3-4], demostraron que el ácido succínico, en la fermentación de glucosa por el *B. coli*, se forma por ruptura de la molécula de azúcar en una molécula de cuatro átomos de carbono y otra de dos, y no por la condensación de dos moléculas de dos carbonos previamente formadas. Sus investigaciones les permitieron también hacer una clara interpretación de la fermentación de glucosa por el *B. cloacae* y el *B. aerógenes*, gérmenes que producen a partir de la glucosa las mismas substancias que el *B. coli* y además acetilmetilcarbinol y 2-3 butilenoglicol, dos productos que descubrieron en esta fermentación HARDEN y WALPOLE en 1906 [5].

Modificando en algo las técnicas de SCHEFFER, tanto en lo que se refiere a la disposición de las experiencias como al análisis del medio fermentado, hicimos varios balances de fermentación de glucosa con bacterias del grupo coli-aerógenes. Los gérmenes estudiados están identificados con los números 86, 3094, 50 forma capsulada, 50 forma no capsulada; en los tres ensayos de los investigadores norteamericanos para distinguir *E. coli* de *A. aerógenes* se comportan como sigue:

Germen	Reacción de Voges-Proskauer	Reacción del rojo de metilo	Desarrollo en medio de Koser
Cepa nº 86	—	+	+
» nº 3.094	+	—	+
» nº 50 (forma capsulada)	+	—	+
» nº 50 (forma no capsulada)	+	—	+

De acuerdo con esto los tres últimos pertenecen al género *Aerobacter* y el nº 86 es del tipo intermedio al cual WERKMAN y GUILLEN[6] propusieron darle el rango de género con el nombre *Citrobacter*. Las formas capsuladas y no capsuladas del nº 50 fueron obtenidas de un cultivo que el Ing. S. SORIANO logró por aislamiento monocelular de una cepa que fuera aislada a su vez de materia fecal por H. SOSA, quien observó también la disociación en ambas formas.

Los resultados analíticos figuran en los cuadros I, IV, V y VI: los II y III corresponden a los resultados obtenidos por SCHEFFER en fermentaciones de glucosa por el *B. coli* y el *B. aerógenes* (*Aerobacter aerógenes* de la nomenclatura americana) respectivamente.

CUADRO I

Nº 86 (en agua de levadura con 2 % de glucosa y 2 % de CO_3Ca)

Productos	Gramos	% del C de la glucosa	Moles de substancia por 50 moles de glucosa fermentada		
			Anhídrido carbónico	Hidrógeno	Acetaldehida
Glucosa añadida . .	35,5				
Glucosa residual . .	23				
Glucosa consumida .	12,5	100			
Anhíd. carbónico . .	1,6	8,7	26	—	—
Hidrógeno	0,086	—	—	31	—
Ac. fórmico	0,023	—	0,4	0,4	—
Ac. acético	1,9	15	—	—	23
Ac. láctico	6,8	55	55	55	55
Ac. succínico	1,3	10,4	15,6	15,6	7,8
Alcohol etílico . . .	1,6	16,6	—	—	25
H_2/CO_2 1,2 . . .		105,7	97	102	111,8

CUADRO II

B. coli en agua de levadura con 2 % de glucosa y 2 % de CO_3Ca

Productos	Gramos	% del C de a glucosa	Moles de substancia por 50 moles de glucosa fermentada		
			Ahídrido carbónico	Hidrógeno	Acetaldehida
Glucosa añadida . .	35,70				
Glucosa residual . .	18,90				
Glucosa consumida .	16,80	100			
Anh. carbónico . . .	1,86	7,5	22,6	—	—
Hidrógeno	0,082	—	—	22	—
Ac. fórmico	0,09	0,3	1,0	1,0	—
Ac. acético	2,51	14,9	—	—	22,4
Ac. láctico	7,03	41,9	42,0	42,0	42,0
Ac. succínico	3,00	18,2	27,2	27,2	13,6
Alcohol etílico . . .	1,91	14,8	—	—	22,3
H_2/CO_2 0,96 . . .		97,8	92,8	92,2	100,3

"Folia Biologica" tiene un tiraje de 9.000 ejemplares y se distribuye gratuitamente

CUADRO III

B. aerógenes en agua de levadura con 2 % de glucosa y 2 % de CO_3Ca

Productos	Gramos	% del C de la glucosa	Moles de substancia por 50 moles de glucosa fermentada		
			Anhídrido carbónico	Hidrógeno	Acetaldehida
Glucosa añadida . .	37,80				
Glucosa residual . .	0,00				
Glucosa consumida .	37,80	100			
Anh. carbónico . . .	14,87	26,8	80,5	—	—
Hidrógeno	0,20	—	—	23,8	—
Ac. fórmico	0,72	1,2	3,7	3,7	—
Ac. acético	0,21	0,5	—	— 0,8	0,8
Ac. láctico	2,12	5,6	5,6	5,6	5,6
Ac. succínico	0,80	—	—	—	—
Alcohol etílico . . .	6,42	22,2	—	33,2	33,2
Acetilmetilcarbinol .	vestig.	—	—	—	—
2-3 butilenoglicol . .	9,98	35,2	—	26,4	52,8
H_2/CO_2 0,29 . . .		91,5	89,8	91,9	92,4

CUADRO IV

Nº 3094 (en agua de levadura con 2 % de glucosa y 2 % de CO_3Ca)

Productos	Gramos	% del C de la glucosa	Moles de substancia por 50 moles de glueosa fermentada		
			Anhídrido carbónico	Hidrógeno	Acetaldehida
Glucosa añadida . .	35,6				
Glucosa residual . .	1,5	100			
Glucosa consumida .	34				
Anh. carbónico . . .	11,5	23,1	69	—	—
Hidrógeno	0,18	—	—	24	—
Ac. fórmico	0,22	0,4	1,3	1,3	—
Ac. acético	0,28	0,8	—	— 1,2	1,2
Ac. láctico	6,9	20,3	20,3	20,3	20,3
Ac. succínico	0,8	2,5	3,6	3,6	1,8
Alcohol etílico . . .	4,1	15,7	—	23,7	23,7
Acetilmetilcarbinol .	0,19	0,8	—	—	1,4
2-3 butilenoglicol . .	7,2	28,6	—	21,2	42,4
H_2/CO_2 = 0,34 . .		92,2	94	93	91

De la comparación de los cuadros I, II y III se concluye que el germen de tipo intermedio tiene más semejanzas con el *B. coli* que con el *B. aerógenes* como lo denotan las relaciones H_2/CO_2, $CH_3.CH_2OH/CH_3.COOH$, las cantidades de ácidos láctico y succínico y sobre todo la no producción de 2-3 butilinoglicol y acetilmetilcarbinol. Interpretando el mecanismo de la fermentación de acuerdo con el esquema de Kluyver para el *B. coli* [3] el balance resulta aceptable, pues como se ve en el cuadro I, la suma de las cifras en cada una de las tres columnas de la izquierda, no se aleja mucho de 100 que es lo que exige la teoría.

CUADRO V

Nº 50 forma capsulada (en agua de lev. con 2 % de glucosa y 2 % de CO_3Ca)

Productos	Gramos	% del C de la glucosa	Moles de substancia por 50 moles de glucosa fermentada		
Glucosa añadida . .	35		Anhídrido carbónico	Hidrógeno	Acetaldehida
Glucosa residual . .	6				
Glucosa consumida .	29	100			
Anh. carbónico . . .	5,8	13,6	41	—	—
Hidrógeno	0,16	—	—	24,8	—
Ac. fórmico	0,08	0,18	0,5	0,5	—
Ac. acético	1,57	5,4	—	— 8,1	8,1
Ac. láctico	10,4	36	36	36	36
Ac. succínico	1,34	4,7	7	7	3,5
Alcohol etílico . . .	2,9	13	—	19,6	19,6
Acetilmetilcarbinol .	0,26	1,2	—	—	1,9
2-3 butilenoglicol . .	3	13,8	—	10	20
H_2/CO_2 = 0,61 . .	--	87,9	85	90	89

CUADRO VI

Nº 50 forma no capsulada (en agua de lev. con 2 % de glucosa y 2 % de CO_3Ca)

Productos	Gramos	% del C de la glucosa	Moles de substancia por 50 moles de glucosa fermentada		
Glucosa añadida . .	36		Anhídrido carbónico	Hidrógeno	Acetaldehida
Glucosa residual . .	4				
Glucosa consumida .	32	100			
Anh carbónico . . .	6,4	13,6	41	—	—
Hidrógeno	0,18	—	—	25,3	—
Ac. fórmico	0,19	0,4	1,2	1,2	—
Ac. acético	1,5	4,7	—	— 7	7
Ac. láctico	12,8	40	40	40	40
Ac. succínico	1,7	5,4	8	8	4
Alcohol etílico . . .	3,3	13,5	—	20,2	20,2
Acetilmetilcarbinol .	0,35	1,4	—	—	2,2
2-3 butilenoglicol . .	4	16,6	—	12,5	25
H_2/CO_2 = 0,61 . .		95,6	90	100	98

Comparando los cuadros V y VI se ve que ambas formas del germen Nº 50 actúan sobre la glucosa de una manera muy semejante, pero en el caso de la forma capsulada el porcentaje de la glucosa fermentada que se recupera en los productos de desasimilación es menor, debido sin duda, como sugirió el Dr. A. SORDELLI, a la cantidad de hidrato de carbono que la bacteria utiliza para la formación de la cápsula. En estos dos casos y en el del germen Nº 3094 los balances de fermentación son satisfactorios como se ve en los cuadros IV, V y VI cuando se explica el mecanismo del proceso con el esquema de KLUYVER para el *B. aerógenes* teniendo en cuenta también la proporción no despreciable de ácido succínico que producen sobre todo las dos formas del Nº 50.

Aun cuando de acuerdo con sus estudios, las diferencias entre *B. coli* y *B. aerógenes* (cuadros II y III) son bastante netas, SCHEFFER considera que en realidad se deben englobar en un esquema todas las transformaciones que pueden tener lugar en la fermentación de azúcar por los gérmenes de este grupo, difiriendo unos de otros en la mayor o menor capacidad para seguir un camino determinado. En nuestras experiencias, tal vez por diferencias de las condiciones en las cuales se efectuaron, el Nº 3094 que es el *B. aerógenes* tipo de la colección del laboratorio de Delft traído por el Ing. S. SORIANO, tiene con respecto al *B. coli* menos diferencias que las encontradas por SCHEFFER. Las cepas Nº 50 se acercan al *B. coli* aun más, porque transforman alrededor del 45 % de la glucosa en ácidos láctico y succínico, pero mantienen la característica genérica de la producción de 2-3 butilenoglicol y acetilmetilcarbinol que, de acuerdo con nuestros resultados es, en lo referente a fermentación de glucosa, la diferencia indiscutible entre *Escrerichia* y *Aerobacter*, que hace por lo tanto de la reacción de VOGES-PROSKAUER la reacción por excelencia en la diferenciación de los mismos.

BIBLIOGRAFIA

[1] HARDEN, A. *Journ. Chem. Soc.*, 79, 610, 1901.
[2] GREY, E. C. *Proc. Roy. Soc.*, B. 87, 472, 1914.
[3] KLUYVER, A. J. *The chemical activities of microorganisms.* London, 1931.
[4] SCHEFFER, M. A. *De suikervergisting door bacteriën der coli groep.* Diss Delft. 1928.
[5] HARDEN, A. and WALPOLE, G. S. *Proc. Roy. Soc.*, B. 77, 399, 1906.
[6] WERKMAN, V. H. and GUILLEN, G. F. *Journ. Bact.*, 23, 167, 1932.

Nota. — Este resumen corresponde a las tesis de DELIA ROSA CÁNEPA y CARLOS S. DE LA SERNA, efectuadas en los laboratorios del Instituto Bacteriológico bajo la dirección del doctor ALFREDO SORDELLI.