

Nuevos estudios de la influencia de especies de *Pseudomonas* sobre la fermentación aerogénica de la lactosa por el *Bacterium coli*.

VICTOR H. BERTULLO *

y LESLIE A. SANDHOLZER **

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (Bertullo y Sandholzer 1948) se encontró que el grupo de *Pseudomonas*, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* era capaz de prevenir la producción de gas del *bacterium coli* en caldo lactosado. Considerando que *Ps. aeruginosa* es capaz de producir cantidades considerables de ácido cianhídrico, se efectuaron nuevos estudios, con la finalidad de explicar este fenómeno.

Clauson y Young (1919) notaron que cuando la *Ps. aeruginosa* era cultivada bajo ciertas condiciones, producía ácido cianhídrico. Más tarde, Emerson, Baily y Cody en 1919 encontraron que el ácido cianhídrico se formaba en la proteína en putrefacción. Patty (1921) estudiando la producción de ácido cianhídrico de varias cepas de *Ps. aeruginosa* encontró que éste no es producido por una enzima filtrable. La cantidad de ácido cianhídrico producido, varía con el pH y con las diferentes cepas.

Quiroga y Bustamante (1940), efectuaron un estudio similar con cinco cepas de *Ps. aeruginosa* y obtuvieron una buena producción de ácido.

* Jefe del Contralor Sanitario del S.O.Y.P. — Profesor Agr. del Inst. de Industria Animal de la Facultad de Veterinaria.

** Fallecido. — Ex bacteriólogo. Jefe del U. S. Fish & Wildlife Laboratory - College Park, Maryland.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVOS:

a) Diez cepas de **Bacterium coli**, representando tres especies (**E. coli**; **A. aerógenos**; e **Intermediarios Escherichia-Aerobacter**) fueron usados, así como también seis cultivos de las mismas especies, aislados por el Sr. William Arcisz del U. S. Fish and Wildlife Service, de las aguas de la Bahía de Narragansett R. I. (U. S. A.).

b) Las cepas de **Ps. aeruginosa** fueron aisladas de los deshechos de alcantarilla crudos, del agua de mar y del agua de manantiales y clasificados de acuerdo al Manual de Bergey (1939).

MEDIOS DE CULTIVO:

a) Durante toda la experiencia, caldo lactosado y dextrosado normal (Difco) fueron utilizados y cuando se requirió el uso de las sales biliares o soluciones buffer de fosfato, éstas se hicieron de acuerdo a los métodos normales utilizados en el análisis de aguas.

b) Para el estudio de la producción de ácido cianhídrico, huevo total deshidratado (coagulado) Difco al 15 % en caldo nutritivo normal, con un pH de 5,4 - 5,8 fué considerado el mejor medio.

c) Se utilizó una solución al 4 % de cianuro de potasio, sin esterilizar e incorporada al medio de cultivo en forma aséptica antes de la siembra respectiva.

d) Para la aislación de **Ps. aeruginosa** de las diferentes aguas examinadas se utilizó el medio de cultivo de Georgia y Poe (1931) (Asparagina 0,3 %; K₂HP04 0,05 %; MgSO₄ 7H₂O 0,05 % y agua destilada) con la adición del 5 % de glicerina de acuerdo con la fórmula original de Gessard (1882).

METODOS

a) Cantidades variables de cianuro de potasio, fueron incorporados a tubos conteniendo caldos lactosado y dextrosado, como se muestra en la Tabla I. Luego, los tubos fueron inoculados con un cultivo de 24 horas, utilizando un ansa normal e incubándolos a 37°C durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas. La producción de gas fué observada a cada intervalo de tiempo. Posteriormente, variaciones menores en dilución fueron usadas y los resultados anotados en la Tabla II.

b) La acción de cianuro de potasio sobre los cultivos de organismos coli aislados de las aguas de la Bahía de Narragansett, fué determinada con una inoculación de un ansa, o de 1 c.c. Los resultados se presentan en la Tabla III y IV.

c) 1/2 % de sales biliares (Difco) fué agregado a caldos lactosado y dextrosado y esterilizados. La inoculación se preparó como se describe más arriba. Los resultados son reportados en la Tabla V.

d) Soluciones de fosfato buffer y soluciones de fosfato buffer más 0,5 % de bilis, fueron agregados a caldo lactosado. Los resultados son dados en la Tabla VI.

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE ACIDO CIANHIDRICO

La técnica utilizada fué la descrita por Patti (1921) con algunas modificaciones. En vez de la solución al 4 % de hidrato de potasio utilizada por Patti, usamos una solución N/10, porque encontramos que dicha solución proporcionaba suficiente potasio como para formar cianuro de potasio.

Hay otra ventaja: por ser la neutralización más fácil, y por evitarse

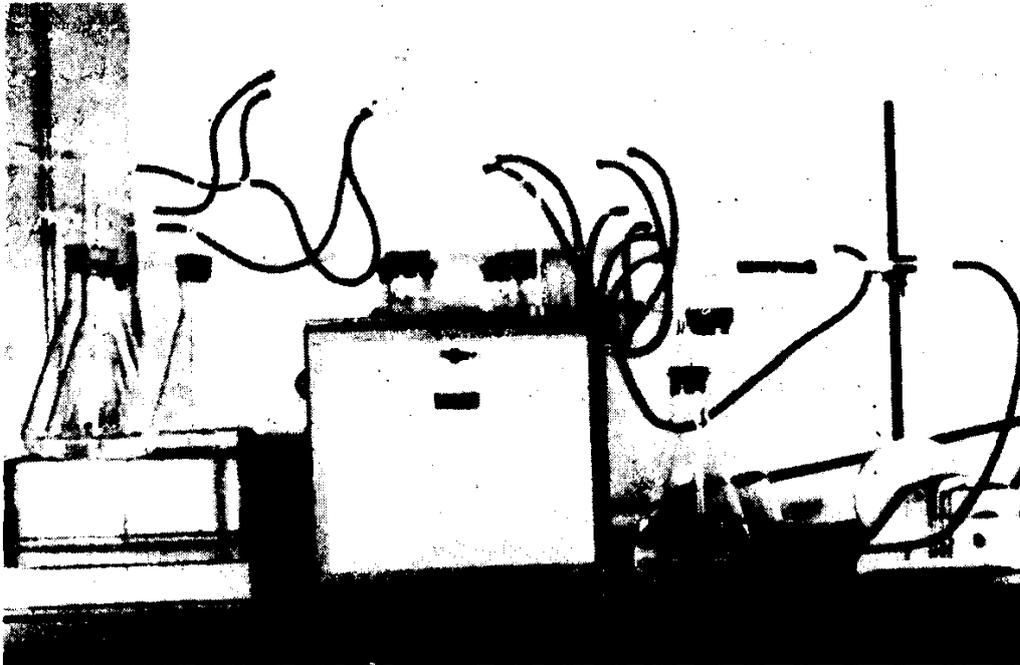


Figura N° 1

la precipitación de sales, que siempre enmascaran la reacción del calor.

El medio fué colocado en frascos de paredes rectas, de amplia base para permitir una buena superficie de aereación. El medio llenaba sólo un quinto del volumen, total. El aire burbujeado a través del líquido y recibido en solución de hidrato de potasio N/10 colocada en un matraz de Erlenmeyer. La corriente aérea era producida por una bomba de impulsión (bomba de aire Marco). Después de ser filtrado a través de algodón estéril, el aire fué primeramente lavado en una solución de hidrato de potasa al 2 % y luego, en una solución concentrada de ácido sulfúrico (figura N° 1). Los cultivos mantenidos durante 8 días a 37°C en baño maría

y con aereación continua (figura N° 2). El pasaje de espuma, producido por ciertas cepas de *Pseudomonas* en el matraz de recibo, fué evitado con el uso de las trampas de Kjeldahl, eliminando la dificultad comunicada por Quiroga y Monteverde (1945).

EVALUACION DE RESULTADOS

La cantidad de cianuro de potasio producida fué medida por el método de Schoembein (citado por Autenrieth, pág. 29, 1923).

A la muestra de 5 c.c. se le agregó suficiente alcohol absoluto como para producir una solución alcohólica al 50 %. Se utilizó ácido clorhídrico al 1 % para acidificar la muestra. Se agregaron luego 3 gotas de una solución al 5 % de tintura de guayacol y tres gotas de una solución de sulfato de cobre al 1 %. Luego la lectura se efectuó en un fotómetro Aminco tipo F (American Instrument Company) con un filtro 5,8 y célula de 1/2 pulgada.

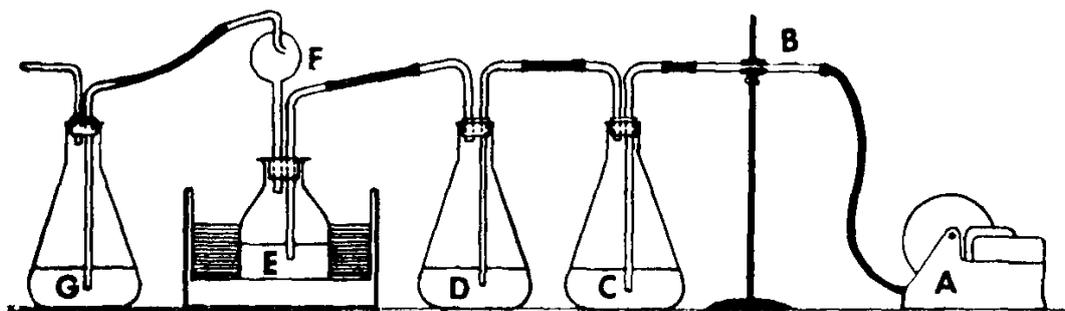


Fig. N° 2

- A — Bomba de aire.
- B — Filtro.
- C — Solución de KOH al 2 %.
- D — Solución de H_2SO_4 concentrado
- E — Matraz c/medio de cultivo.
- F — Trampa de Kjeldahl.
- G — Solución KOH N/10.

El tiempo de lectura se hizo entre los 90 y 120 segundos, partiendo del momento en que todos los ingredientes habían sido mezclados.

Encontramos que la reacción de Schoembein es buena si se desarrolla a un pH conveniente. Vemos que el mejor pH es 6,4. Un pH más alcalino da un color verde o azul verdoso que es característico de las soluciones de sulfato de cobre en un medio alcalino, mientras que un pH más ácido la decolora hasta la desaparición total del color.

Los valores fueron obtenidos de una curva normal previamente hecha con la técnica descrita por Autenrieth y Kuantmeyer (1923).

RESULTADOS

En general, los resultados muestran que el cianuro de potasio es capaz de inhibir la fermentación de la lactosa o crecimiento de los organismos coli, dependiendo de la concentración usada en el medio de cultivo.

La data en la tabla N° 1, indica que 0,2 c.c. de una solución de cianuro de potasio al 4 % permite el crecimiento cuando un ansa de cultivo de **E. Coli, A. aerogenes y Esch. — Aerobac. Intermediarios**, son agregados a caldo lactosado. Pero para interpretar los resultados obtenidos con cianuro de potasio (KCN) en términos de ácido cianhídrico (HCN) es necesario decir que en 1 c.c. de una solución de cianuro de potasio al 4 % hay 0,04 de esta sal. Por lo que, cuando 1 c.c. de esta solución es agregado a 10 c.c. de caldo lactosado, caldo dextrosado, etc., habrán 0,004 de cianuro de potasio por c.c. o 0,0004 grs. cuando se agrega 0,1 c.c. La equivalencia molecular de HCN a 4 grs. de KCN es 1,65 grs. por lo que 0,0004 grs. de KCN serán iguales a 0,000165 de HCN. De este modo en 0,2 c.c. del medio se encontrarán 0,000330 grs. de HCN o expresado en partes por un millón (300 p. p. m.).

Sin embargo, toma 0,5 de una solución de cianuro de potasio al 4 % para permitir el crecimiento cuando un ansa de cultivo de **E. coli A. aerogenes e Intermediarios Esch-Aerobact**, son agregados a la dextrosa, o expresados en partes por millón (825 p. p. m.).

La mayor sensibilidad de la bacteria en caldo dextrosado, fué notada en los primeros experimentos.

Por los datos en la Tabla II se saca en conclusión que 148,5 p. p. m. de HCN permite un buen crecimiento cuando se agrega a un ansa de cultivo en caldo lactosado y que 45,9 p. p. m. permiten la fermentación de la lactosa.

En caldo dextrosado, 148,5 p. p. m. de HCN permiten el crecimiento y 33 p. p. m. la fermentación de la dextrosa. Los resultados en la Tabla N° III muestra que 660 p. p. m. de HCN permiten un crecimiento muy pobre de 1 c.c. de cultivo de organismos coli en caldo lactosado y que la misma cantidad permite la fermentación gaseosa en caldo dextrosado de un mismo volumen.

La Tabla IV presenta los datos de la acción del cianuro de potasio sobre un ansa o un c.c. de cultivos de **E. coli, A. aerogenes e Intermediarios Esch-Aerobac.** Este experimento fué efectuado para determinar la acción del material sobre una pequeña y una cantidad masiva de cultivo. Los resultados muestran que 16,5 p. p. m. de HCN permiten formación de gas cuando se agrega un ansa de cultivo en caldo lactosado y 49,5 p. p. m. cuando se agrega a 1 c.c. de cultivo (0,1 c.c. y 0,3 c.c. de una solución de KCN al 4 %, respectivamente).

Sin embargo, en caldo dextrosado 33 p. p. m. de HCN permiten la

fermentación cuando se agrega un ansa de cultivo de organismos coli y 82,5 p. p. m., cuando se agrega 1 c.c. de los mismos cultivos. Los resultados en la tabla N° V indican la acción de la bilis sobre el crecimiento de los cultivos. 82,5 p. p. m. permiten la formación de gas en caldo lactosado de 1 c.c. de cultivos de organismos coli. 16,5 p. p. m. de HCN permiten la fermentación de un ansa de cultivo y 184,5 p. p. m. de HCN en caldo dextrosado el crecimiento de 1 c.c. de cultivo; mientras que 33 p. p. m. de HCN permiten la fermentación en el mismo caldo de un ansa de cultivo.

Las referencias en la tabla N° VI muestra los resultados de la acción de una solución de fosfato Buffer cuando éste se agrega al caldo lactosado. 33 p. p. m. de HCN permiten la formación de gas de 1 c.c. de cultivo; pero por el estudio de la acción combinada de la bilis y de la solución de fosfato Buffer en caldo lactosado requiere 49,5 p. p. m. de HCN para la fermentación de la lactosa.

El estudio de la producción de ácido cianhídrico fué efectuada con varias cepas recién aisladas de *Ps. aeruginosa* obtenidas de diferentes fuentes naturales. Los resultados están presentes en la Tabla N° VII.

Se efectuó un estudio para determinar el efecto de la modificación del pH de las aguas en las cuales *Esch. coli* fué cultivada a 37°C., los resultados se incluyen en la tabla N° VIII.

Se deseaba determinar cuánto tiempo requeriría *Esch. coli* para bajar el pH al óptimo requerido para la producción de ácido cianhídrico por *Ps. aeruginosa*. Es un hecho bien conocido que *Ps. aeruginosa* produce mayor cantidad de aquel entre un pH de 5,4 a 5,8.

Este pH no fué obtenido después de 10 días de incubación en agua corriente, agua de cisterna, agua de mar, caldo nutritivo, alcanzándolo sólo en caldo lactosado.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados arriba mencionados, la producción de ácido cianhídrico por ciertas cepas de *Ps. aeruginosa* es capaz de inhibir la fermentación de la lactosa por *E. coli* o su crecimiento dependiendo de la concentración. De ahí que surge la evidencia de que muchos cultivos de *Ps. aeruginosa* son capaces de producir *per se* suficiente ácido cianhídrico como para producir esa inhibición, lo que explicaría el fenómeno de que *Esch. coli*, no se encuentra comúnmente en aguas en donde *Ps. aeruginosa* es abundante.

Por otra parte, el ácido cianhídrico producido por *Ps. aeruginosa* puede ser reforzado por el ácido cianhídrico que puede estar presente en el agua tal como el sulfocianato que se encuentra en los cuerpos en el agua tal como el sulfocianato que se encuentra en los cuerpos y excreciones de los animales que puede ser convertido a cianuro por agentes oxidantes, (Hall 1938) o por la putrefacción de los tejidos animales

(Gettler y Baine 1938); o de los suelos que contienen una alta concentración de materia vegetal rica en glucósidos cianóforos que pueden ser hidrolizados en el suelo y producir ácido cianhídrico o sus sales y ser llevados al agua por las lluvias, (Scobey 1946).

Aparentemente, **Esch. coli**, no es capaz de producir en diez días bajo condiciones experimentales el mejor pH para la producción de ácido cianhídrico por **Ps. aeruginosa**, pero es necesario recordar que con un mayor espacio de tiempo con temperaturas convenientes y con agentes acidificantes que pueden ser encontrados en el agua, el grupo de **Ps. aeruginosa** puede obtener el pH óptimo para producir ácido cianhídrico. Por lo expuesto el grupo de **Ps. aeruginosa** debería investigarse en aguas sospechosas de polución fecal toda vez que **Esch. coli** no se encuentre por los métodos de rutina.

CONCLUSIONES

1º) El ácido cianhídrico producido por cultivos de **Ps. aeruginosa** inhibe la fermentación de los azúcares por **Esch. coli** o previene el crecimiento dependiendo ello de la concentración del ácido.

2º) El ácido cianhídrico producido por **Ps. aeruginosa** podría explicar en parte, el fenómeno inhibitorio de **Esch. coli** y su desaparición en zonas en donde **Pseudomonas aeruginosa** es abundante.

3º) Se recomienda investigar sistemáticamente el grupo de **Pseudomonas aeruginosa** en zonas sospechosas de polución fecal si **Esch. coli** no se encuentra por los métodos de rutina.

CONCLUSIONS

1º) Hydrocyanic acid produced by cultures of **Ps. aeruginosa** inhibits the fermentation of sugars by **E. coli**, or prevents growth, depending upon the concentration of the acid.

2º) Hydrocyanic acid produced by **Ps. aeruginosa** could explain in part, the inhibitory phenomenon of **E. coli** and its disappearance in zones where **Ps. aeruginosa** is abundant.

3º) It is recommended to investigate systematically **Ps. aeruginosa** group in zones suspected of fecal pollution, if **E. coli** is not found by routine methods.

CONCLUSIONS

1º) L'acide cyanhydrique produit par les cultures de **Ps. aeruginosa** inhibe la fermentation des sucres par l'**Esch. coli** on prévient la croissance selon la concentration de l'acide.

2º) L'acide cyanhydrique produit par **Ps. aeruginosa** pourrait rendre

compte, en part, du phénomène inhibiteur d'*Esch. coli* et de leur disparition des zones où *Pseudomonas aeruginosa* abonde.

3°) On recommande rechercher systématiquement le groupe des *Pseudomonas aeruginosa* dans les zones suspectes de pollution fécale si on ne trouve pas l'*Esch. coli* par les moyens de routine.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

1) Die in Kulturen von "Pseudomonas aeruginosa" gebildete verhindert die Zuckergärung durch "Bacillus Coli" oder beugt seinem Wachstum je nach der Säurekonzentration vor.

2) Die durch Pseudomonas aeruginosa gebildete Blausäure könnte zum Teil die Wachstumshemmung des Bacillus Coli und sein Verschwinden in den Zonen erklären, in welchen Pseudomonas aeruginosa reichlich vorhanden ist.

3) Die systematische Untersuchung auf Vorkommen der Gruppe Pseudomonas aeruginosa in Zonen, die auf Kotverunreinigung verdächtig sind, wird empfohlen im Falle sich Bacillus Coli nicht durch die gewöhnlichen Methoden nachweisen lässt.

REFERENCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASS. 1946. Standard Methods for the Examination of Water and Sewage. Ninth Ed. New York.
- AUTENRIETH. 1923. Die Auffindung der Gifte. Fünfte Auflage.
- AUTENRIETH W. and QUANTMEYER. 1923. Ibid. Page 503.
- BERGEY D. H. 1939. Manual of Determinative Bacteriology. Fifth Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- BERTULLO V. H. and SANDHOLZER L. A. Inhibition of the Fermentation by Colyform Bacteria in the Presence of Pseudomonas, aeruginosa (unpublished paper).
- HALL W. T. 1938. Ind. Ing. Che, Ann. Ed. 10-1935 (Cited by Scobey).
- GEORGIA F. and POE C. H. 1931. Study on Bacterial Fluorescence in Various Media. I. - Inorganic Substances necessary for Bacterial Fluorescence, Jour. of Bact. 22-347.
- GESSARD R. 1882. De la Pyocyanine et son Microbe. Thesis. Paris.
- GETTLER A. O. and BAYNE H. 1938. Am. Jour, Med. Scien. 195. 132-198 (Cited by Scobey).
- QUIROGA S. S. and BUSTAMANTE J. J. 1940. Produccion de Acido Cianhidrico por *Ps. aeruginosa* (B. piocianico) Rev. Sud. Am. de Endocr. Imm. Quimiot. XXIII N° 9-10.
- PATTY A. F. 1921. The production of Hydrocyanic Acid by Bacillus pyocyaneus. Jour of Inf. Dis. 29, 73-77.
- SCOBAY R. R. 1946. The Role of Water in the Etiology of Poliomyelitis. Arch. of Pediat. 63 N° 11.

TABLA I

CALDO LACTOSADO

Solución de KCN al 4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°									
	Escherichia coli					Aerobacter aerogenes			Aer-Esch. Intermediar.	
	A	B	C	D	E	A	B	C	A	B
1 ml. (1650)*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.5 (825)*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4 (660)*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.3 (495)*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.2 (330)*	+	+	+	—	+	+	+	—	—	+
0.1 (165)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CALDO DEXTROSADO

Solución de KCN al 4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°									
	Escherichia coli					Aerobacter aerogenes			Aer-Esch. Intermediar.	
	A	B	C	D	E	A	B	C	A	B
1 ml. (1650)*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.5 (825)*	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
0.4 (660)*	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
0.3 (495)*	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
0.2 (330)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1 (165)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

0.1 gr., KCN. = 0.000165 HCN o 165 p. p. m.

(—) Sin crecimiento.

(+) Crecimiento.

(*) p. p. m.

TABLA II

CALDO LACTOSADO

Solución de KCN al 0.4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACT. COLIF CEPA N°									
	Escherichia coli					Aerobacter aerogenes.			Aer-Esch. Intermediar.	
	A	B	C	D	E	A	B	C	A	B
0.9 (149.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.8 (132.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.7 (115.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.6 (99.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5 (82.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4 (66.)*	+	+G	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3 (49.5)*	+	+G	+	+	+	+	+	+	+	+
0.2 (33.)*	+	+	+G	+	+	+	+	+	+	+
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
Testigo	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

CALDO DEXTROSADO

Solución de KCN al 0.4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACT. COLIF CEPA N°									
	Escherichia coli					Aerobacter aerogenes.			Aer-Esch. Intermediar.	
	A	B	C	D	E	A	B	C	A	B
0.9 (149.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.8 (132.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.7 (115.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.6 (99.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5 (82.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4 (66.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3 (49.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.2 (33.)*	+G	+G	+G	+	+	+	+	+	+	+
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
Testigo	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

(+) Crecimiento.

(G) Formación de gas.

(*) p. p. m.

0.1 grm. KCN = 0.000165 HCN o sean 165 p. p. m.

TABLA III

CALDO DEXTROSADO

Solución de KCN al 4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Intermediarios Aer - Esch.			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.4 (660)*	—	+G	—	+G	—	+G	—	+G	—	+G	—	+G
0.3 (495)*	—	+G	—	+G	—	+G	—	+G	+	+G	—	+G
0.2 (330)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.1 (165)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G

()* p. p. m.

CALDO LACTOSADO

Solución de KCN al 0.4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Aer - Esch. Intermediarios			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.4 (660)*	—	—	—	+*	—	+*	+	+*	+	+*	—	+*
0.3 (495)*	—	—	—	+*	—	+*	+	+*	+	+*	—	+*
0.2 (330)*	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+
0.1 (165)*	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+

0.01 grm. KCN = 0.0000165 HCN o 16.5 p. p. m.

(—) Sin crecimiento.

(+) Crecimiento.

(+*) Un crecimiento muy pobre

(G) Formación de gas.

()* p. p. m.

TABLA IV

CALDO LACTOSADO

Solución de KCN al 4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Aer - Eseh. Intermediarios			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.9 (149.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.8 (132)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.7 (115.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.6 (99)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5 (82.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4 (66)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3 (49.5)*	+	+G	+	+	+	+G	+	+	+	+G	+	+
0.2 (33)*	+	+G	+	+	+	+G	+	+	+	+G	+	+
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

CALDO DEXTROSADO

Solución de KCN al 4 %

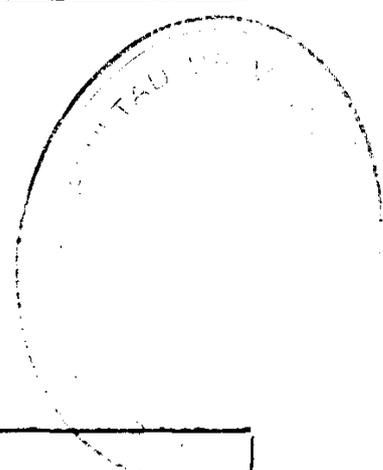
c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Intermediario Aer - Esch.			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.9 (149.5)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.8 (132)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.7 (115.5)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.6 (99)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.5 (82.5)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.4 (66)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.3 (49.5)*	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G	+	+G
0.2 (33)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

TABLA V

CALDO LACTOSADO — Bilis al 0.5 %

Solución de KCN al 0.4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Intermediario Aer - Esch.			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.5 (82.5)*	+	+G	+	+G	+	+	+G	+G	+	+	+	+
0.4 (66.)*	+G	+G	+	+G	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
0.3 (49.5)*	+G	+G	+	+G	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
0.2 (33.)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G



CALDO DEXTROSADO — Bilis al 0.5 %

Solución de KCN al 4 %

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Intermediario Aer - Esch.			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.5 (82.5)*	+	+	+	+G	+	+	+G	+G	+	+	+	+G
0.4 (66.)*	+G	+G	+G	+G	+	+G	+G	+G	+	+G	+G	+G
0.3 (49.5)*	+G	+G	+G	+G	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
0.2 (33.)*	+G	+G	+G	+G	+	+G	+G	+G	+	+G	+G	+G
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

(+) Crecimiento.

(G) Formación de gas.

()* p. p. m.

0.01 KCN = 0.0000165 HCN o 16.5 p. p. m.

TABLA VI

CALDO LACTOSADO — Fosfato Buffer

Solución al 0.4 % de KCN

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Intermediario Aer - Esch.			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.5 (82.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4 (66.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3 (49.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.2 (33.)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G
0.1 (16.5)*	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

CALDO LACTOSADO — Fosfato Buffer — Bilis 0.5 %

Solución al 0.4 % de KCN

c.c. de KCN por 10 c.c. de medio	BACTERIA COLI CEPA N°											
	Escherichia coli				Aerobacter aerogenes				Intermediario Aer - Esch			
	A		B		A		B		A		B	
	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.	Ansa	1 c.c.
0.5 (82.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4 (66.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3 (49.5)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+G	+G
0.2 (33.)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+G	+G	+G
0.1 (16.5)*	+	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G

(+) Crecimiento.

(G) Formación de gas.

() * p. p. m.

0.01 grm. KCN = 0.0000165 HCN o 16.5 p. p. m.

TABLA VII

PRODUCCION DE HCN POR VARIAS CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

Cepas	Resultados en micro-miligramos
PR LA	112
NB 2A	133.8
GS 4A	156.2
GS MA	117.5
NB 3B	71.48
NB 4B	30.7
NB 5B	71.5
NB 6B	143.38
1A GS	54.77
NB 3A	120.61
CP 1Z	159.8

TABLA VIII

VARIACIONES DEL PH, DE VARIAS AGUAS INOCULADAS CON UN CULTIVO DE 48 HORAS DE BACTERIUM COLI E INCUBADAS DURANTE DIEZ DIAS A 37 GRADOS CENTIGRADOS

Días	Agua de manantial	pH original 6.9 Agua corriente pH original 7.7	Agua de mar pH original 8.3	Caldo lactosado pH original 6.7	Caldo nutritivo pH original 6.75
1	7.2	7.4	8.2	4.7	6.8
2	7.0	7.4	8.2	4.7	6.9
3	6.9	7.3	7.6	4.75	7.0
4	6.7	7.2	7.4	4.8	7.8
5	6.7	7.2	7.4	4.8	7.9
6	6.7	7.3	6.9	4.9	8.2
7	6.6	7.3	6.9	4.9	8.3
8	6.4	7.4	6.9	4.9	8.5
9	6.2	7.4	6.4	4.95	8.5
10	6.0	7.3	6.4	5.0	8.6

El agua y el medio fueron esterilizados durante quince minutos a 115 lbs.

Después de ésto, el pH original fué determinado. Los valores fueron tomados con un medidor de pH Beckman.