

LACTOBACTERIAS EN MEDIOS DISGENESICOS Y EUGENESICOS

POR LOS DRES.

CARLOS A. SAGASTUME Y JORGE GASCON

Quienes manejan corrientemente fermentos lácticos, habrán tenido ocasión de observar que aún cuando se efectúen los transplantes a medios adecuados con la frecuencia y regularidad requeridas, no es excepcional la pérdida de alguna cepa, sin que ello pueda ser imputable a deficiencias en la técnica bacteriológica.

Al principio de este año nos hallamos frente a uno de esos casos. De entre las lactobacterias de nuestra colección había una cepa de un bacilo láctico del grupo acidúrico, aislado por nosotros del intestino humano, que considerábamos ya perdida. A raíz de su aislamiento desarrollaba muy bien en leche, la que coagulaba originando conveniente acidez. A los pocos subcultivos en leche, constatamos que el bacilo había perdido su aptitud coagulante, su poder acidógeno y que la observación microscópica de preparados teñidos, no nos revelaba ya la presencia de nuestra bacteria. Por ello fué que la conceptuamos ya perdida.

Recordamos entonces los trabajos recientemente comunicados por el eminente lactobacteriólogo Gorini a la Academia de Ciencias de París. Gorini refiriéndose en una de sus primeras comunicaciones a la inconstancia de la coagulación de la leche de parte de algunos estreptococos patógenos, comprueba que ella se corrige si se siembra la leche con una gran cantidad de cultivo en caldo (5 a 10 cm³) del germen. La influencia favorable es para Gorini debida a los *elementos nutritivos* del caldo, pues él obtiene el mismo resultado añadiendo a la leche esterilizada *caldo estéril, peptona, extracto de Liebig, agua de levadura o sangre*.

¿ Cuales son, se pregunta este autor, las sustancias de la leche destruidas o alteradas por la temperatura y a las cuales suplen los productos mencionados ? ¿ Trátase de *materias nitrogenadas* favorables a

la nutrición, o de *vitaminas*, o de *sustancias amortiguadoras*, o bien de una *codiastasa* de naturaleza mineral? La respuesta no es fácil, añade. Esas diversas sustancias parecen según Gorini estimular las propiedades coagulantes y caseolíticas de las bacterias, más bien que ejercer una acción eugenética, puesto *que no se observa diferencia sensible en el desarrollo ni en el número de bacterias*. Despiertan propiedades debilitadas en las bacterias, pero, no originan propiedades nuevas, puesto que adicionadas a cultivos en leche de gérmenes del grupo tífico, paratífico, o disentérico, no les confieren acción coagulante.

En una última comunicación de hace algunos meses refiere Gorini haber comprobado que la leche esterilizada a altas temperaturas se torna impropia para el cultivo de ciertas bacterias y que basta añadir a esa leche ciertas sustancias estimulantes, para restituirle sus propiedades nutritivas. También constata que hay leches de vacas sanas, cuyas leches no han sufrido ninguna esterilización y en las cuales ciertos fermentos lácticos simples o mixtos ácido-proteolíticos, no solamente no desarrollan, sino que mueren rápidamente. Llama a esas, *leches disgenésicas*.

Se pregunta Gorini si es posible transformar leches naturalmente disgenésicas en leches eugenésicas. Para averiguarlo siembra una cepa de *mamococcus* en diversas leches de vacas sanas, leches que por sus caracteres organolépticos, químicos y microscópicos, podían considerarse como perfectamente normales. Sobre 13 muestras de leche, 3 (o sea el 23 %) se mostraron disgenésicas. En las leches del mercado se encuentran menos casos de disgenésicas, por cuanto son mezclas provenientes de varios animales.

Basta añadir a las leches disgenésicas sustancias estimulantes como extracto de levadura, peptona de caseína a la dosis de 1 a 0.001 % para que estas leches se comporten como eugenésicas.

No es nada fácil, agrega el eminente bacteriólogo, explicar en que consiste la acción de esos estimulantes. Sus efectos son por así decir independientes de la dosis. Se les puede considerar como *catalizadores*. En el caso del *extracto de levadura* se podía pensar en la acción de una *vitamina*; en el caso de la peptona, en el aporte de un *suplemento de alimento nitrogenado*.

Sería interesante saber, continúa Gorini, si la misma vaca produce continuamente leche disgenésica o si la producción es accidental y está relacionada con la alimentación, mastitis, microflora mamaria anormal, etc.

Recuerda que el mamococcus huésped habitual de la mama, hidroliza un poco la caseína y que toda la leche que se expende al público, contiene caseína hidrolizada por las bacterias que pululan después del ordeño. La propiedad disgenésica de ciertas leches no es atribuible según el autor a un principio microbicida o inhibidor, sino a la falta de una sustancia a la cual ha suplido la adición de estimulantes. Los fracasos de la técnica lechera, dice Gorini, en la obtención de cultivos seleccionados para la elaboración de manteca, yoghurt y la fabricación de quesos, se explican igualmente, sobre todo cuando se opera con leche de un solo tambo.

Termina su última comunicación admitiendo la posibilidad de que las leches disgenésicas para las bacterias, tuvieran propiedades nutritivas modificadas para el hombre y que la pasteurización y la esterilización alteren el poder alimenticio, así como modifican las propiedades nutritivas para ciertas bacterias. Estas bacterias podrían servir de « text » para apreciar las cualidades bioquímicas de una leche, cualidades que escapan a los métodos analíticos corrientes.

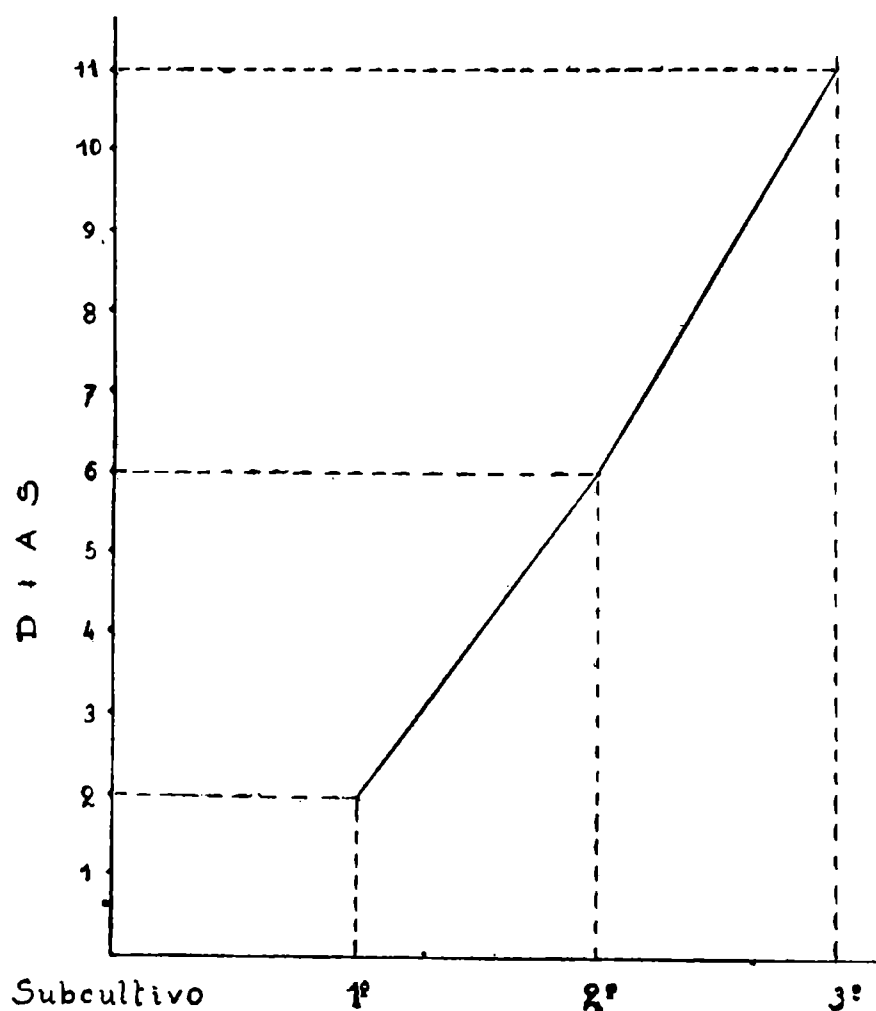
Volviendo al lactobacilo de nuestra colección al que aludíamos al principio, logramos poner claramente en evidencia sus exigencias eugenésicas pasándolo de los cultivos en leche, en los que había perdido su acción coagulante y acidógena y en los que no constatábamos al microscopio presencia de gérmenes, a leche-caldo como medio nutritivo. Inmediatamente readquiría sus propiedades originarias: coagulaba la leche en 24 a 48 horas producía buena acidez y desarrollaba abundantemente. Como contralor efectuamos la prueba inversa pasándolo de un medio eugenésico (leche-caldo) a un medio disgenésico (leche sola).

Según puede apreciarse en el cuadro 1 en el primer subcultivo nuestro bacilo, al que designamos So, coaguló la leche a las 48 h. A raíz del segundo pasaje a leche necesitó seis días para producir la coagulación y en el tercer subcultivo solo se registró coagulación al cabo de once días. Por ulteriores pasajes perdía definitivamente su aptitud coagulante y el desarrollo se tornaba cada vez más precario.

Admitimos entonces la posibilidad de que el bacilo So aislado del intestino humano no encontrara en la leche alguna sustancia existente en el complejo medio intestinal y que fuera de gran importancia para sus funciones metabólicas. ¿ Pero cual era esa sustancia ?

Vimos como Gorini suponía que esas sustancias estimulantes contenidas en el caldo, en la sangre, en el agua de levadura y en la peptona,

podían ser de la más diversa, opuesta y desconocida constitución, pues pensaba en una vitaminia, o en una codiastasa mineral, o en cuerpos amortiguadores o en sustancias nitrogenadas. Excepción hecha de los glucidos y lipidos lo había supuesto casi todo.



Cuadro 1.

Nosotros, que desde hace unos años venimos estudiando con particular interés el bioquimismo de las bacterias lácticas, nos inclinamos a una hipótesis mucho más concreta. La leche integral contiene diversos aminoácidos. Por hidrólisis de caseína de leche de vaca Abderhalden y otros autores han identificado y evaluado cerca de 15. El investigador alemán Riffart, de Frankfurt, ha comprobado que en una muestra de leche cruda, un día después de ordeñada, la cantidad de nitrógeno ácido aminado es de 14 miligramos por litro y en la misma muestra de leche hervida de 25. Al segundo día, en la leche cruda la cantidad se ha cuadruplicado (60 miligramos) y al tercer día se ha quintuplicado (75 miligramos).

Supusimos nosotros que las exigencias eugenésicas de algunas lactobacterias podrían imputarse a la necesidad para cumplir sus actos metabólicos, de ciertos aminoácidos en determinada cantidad. Para averiguarlo efectuamos el siguiente experimento sintetizado en el cuadro 2.

SUBSTANCIAS EUGENESICAS

1 cm ³ de solución al 1/100 de	Leche	Fermento láctico	Contralor
Glucocola	9 cm ³	0,5 cm ³	1 cm ³ de solución de cada sustancia más 9 cm ³ de leche, sin fermento.
Tirosina	9 cm ³	0,5 cm ³	
Cistina	9 cm ³	0,5 cm ³	
Arginina	9 cm ³	0,5 cm ³	
Fenilalanina	9 cm ³	0,5 cm ³	
Triptofano	9 cm ³	0,5 cm ³	
Glucosamina	9 cm ³	0,5 cm ³	
Peptona	9 cm ³	0,5 cm ³	
1 cm ³ de agua destilada .	9 cm ³	0,5 cm ³	

Cuadro 2.

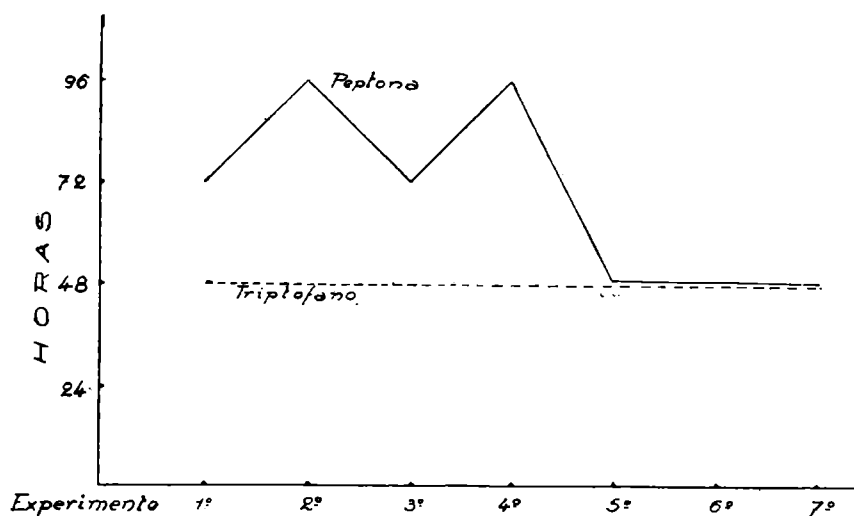
Fueron preparados una serie de tubos conteniendo una serie de aminoácidos, glucosamina y peptona al 1 0/00 en leche; todos se esteriliza-

Nº	Substancias	24 h	48 h	72 h	120 h
1	Glucocola	—	—	—	—
2	Tirosina	—	—	—	+
3	Cistina	—	—	±	+
4	Arginina	—	—	—	—
5	Fenilalanina	—	—	—	±
6	Triptofano	—	+	+	+
7	Glucosamina	—	—	—	—
8	Peptona .	—	+	+	+
9	Contralor	—	—	—	—

Cuadro 3.

ron y sembraron con idéntica cantidad de nuestro fermento láctico. Como contralor fué dispuesta una serie igual de tubos, pero sin sembrarlos. Por incubación a 37° se registraron los resultados consignados en el cuadro 3.

Se ve que así como la glucosamina y los aminoácidos glucocola, arginina y fenilalanina no presentan acción alguna, otros cuerpos en cambio, tales la peptona y los aminoácidos tirosina, cistina y triptofano ejercen acción eugenésica y unos como triptofano y peptona en forma más marcada que los otros, puesto que hacen disminuir el tiempo necesario para la coagulación de la leche por la cepa. So de once días a dos días.



Cuadro 4.

Repetimos en diferentes días, siete experimentos idénticos al descrito y en el cuadro 4, solo se da cuenta en forma de gráfica de la acción estimulante de las dos sustancias más activas, la peptona y el triptofano. Se deduce que la acción eugenésica del triptofano es mayor y más constante que la de la peptona, pues con ésta la coagulación se registró en 3 experimentos a los dos días, en 2 experimentos a los tres días y en 2 experimentos a los cuatro días. Con el triptofano en cambio los resultados no pudieron ser más regulares; siempre se constató coagulación a los dos días con una cepa que sin la concurrencia de dicho aminoácido solo coagulaba la leche en once días.

Deseando esclarecer la forma en que se producía el estímulo sobre el fermento, de parte de las sustancias eugenésicas, efectuamos numerosos experimentos para estudiar su influencia:

- 1.º Sobre la actividad acidogénica:
- 2.º Sobre la multiplicación bacterica y
- 3.º La duración o conservación de la acción estimulante.



FIG. 1. — Cultivo en leche-caldo.



FIG. 2. — Cultivo en leche.

ACTIVIDAD ACIDOGENICA

Acido láctico ‰	48 h
Glucocola	1.26 g
Tirosina	1.62 g
Cistina	2.44 g
Fenilalanina	1.98 g
Triptofano	2.88 g
Glucosamina	1,67 g
Peptona	3.20 g
Leche	1,26 g

Cuadro 5.

En el cuadro 5, damos cuenta de como está relacionada la rapidez de coagulación con la actividad acidogénica. Se constata que aquellas sustancias como triptofano y peptona que más estimulaban la velocidad de coagulación son también las que más han estimulado la formación de ácido láctico; en tanto que la glucocola, glucosamina, etc., que no favorecían la acción coagulante, tampoco actúan sobre el poder acidogénico.

Por lo que concierne a la influencia de las sustancias eugenésicas sobre la multiplicación del lactobacilo en estudio, realizamos nuestros experimentos eligiendo un aminoácido como la glucocola que no ejercía acción alguna según ya se ha visto, sobre la acción coagulante ni acidogénica, otro ácido aminado como el triptofano que poseía acción estimulante en ambos casos.

La numeración microbiana fué efectuada por el método original de uno de nosotros (Sagastume y Solari). Ese nuevo método será objeto de una comunicación en la próxima sesión.

MULTIPLICACION BACTERICA

48 h a 37° C

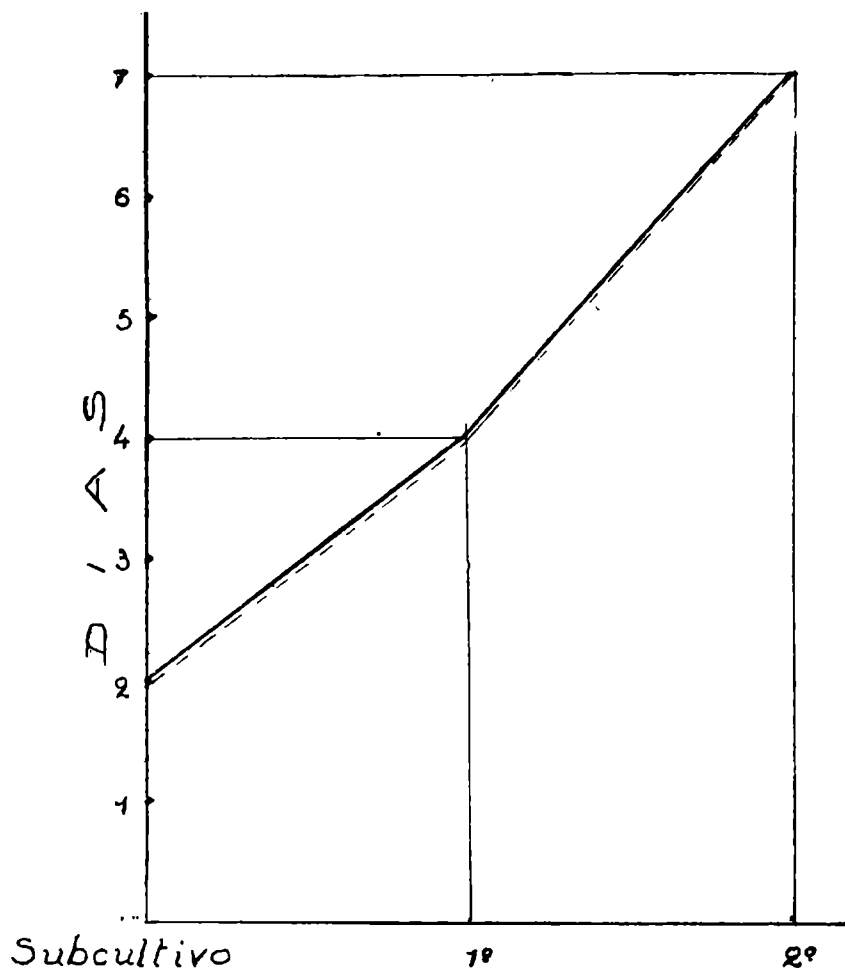
Glucocola	60.000.000
Triptofano	85.000.000

Cuadro 6

En el cuadro 6 se observa que al cabo de 48 h. a 37° los cultivos de idéntica cantidad de nuestro bacilo So en leche-glucocola acusaron la presencia de 60 millones de bacterias por centímetro cúbico, mientras que aquellos en leche + triptofano contenían una cantidad mucho mayor: 85 millones.

El triptofano pues, estimulaba la acción coagulante, la actividad acidogénica y la multiplicación bacteriana.

Era también de gran interés averiguar si el estímulo sobre la acción coagulante ejercido por las sustancias eugenésicas perduraba o se perdía por sucesivos pasajes a leche sola.



Cuadro 7.

Se constata por el cuadro 7 que el lactobacilo que gracias a la acción estimulante del triptofano y de la peptona coagulaba la leche en 48 h. pasándolo una primera vez a leche sola, ya invierte doble lapso de tiempo en coagularla. Si de ese primer subcultivo se efectúa un segundo subcultivo en leche sola, la coagulación solo se registra en siete días.

Como este hecho tuviera mucha analogía con el que mencionamos al principio cuando usábamos leche-caldo como medio nutritivo, efectuamos un experimento comparativo cuyo protocolo se transcribe en forma de cuadro 8.

CONTRALOR FINAL

Medios	Conc.	Cepa So	Coag.	Acidez
Leche caldo	caldo $\frac{1}{3}$	0.5 cm ³	48 h	8,50 ‰
Triptofano	$\frac{1}{1000}$	0,5 cm ³	72 h	5,61 ‰
Peptona	$\frac{1}{1000}$	0,5 cm ³	120 h	5,48 ‰
Leche	—	0,5 cm ³	No	—

Cuadro 8.

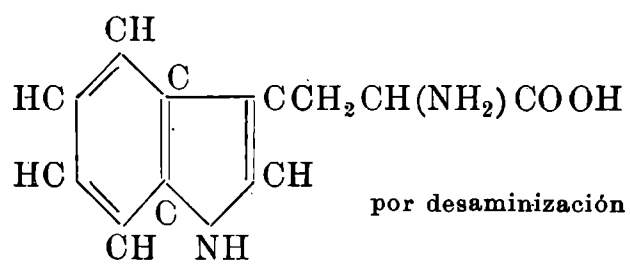
Se desprende de él que la acción eugenésica del caldo, triptofano y peptona es bien evidente. La acción del caldo, medio peptonado tan complejo y que se ha usado en tan gran proporción, no sabemos aún a que sustancia de entre sus componentes debe ser imputada. Otro tanto diremos de la peptona Witte asociación de peptidos de molécula grande, de en re los cuales ignoramos cual es el que ejerce la acción estimulante.

Por el contrario el triptofano es un aminoácido de estructura molecular perfectamente conocida desde que fué aislado por Hopkins y Cole.

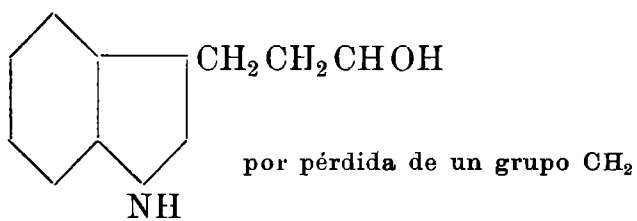
Es interesante recordar como lo hacemos en el cuadro 9 las relaciones genésicas del escatol e indol, originados por las bacterias intestinales a expensas de la molécula de triptofano y creemos que constituye una observación nueva, nuestra constatación de que el bacilo láctico con que hemos trabajado, necesita para su normal bioquimismo la presencia de moléculas como la de triptofano.

Vamos para terminar, a referir una última observación interesante: cuando efectuábamos subcultivos de un medio eugenésico (leche-caldo) a un medio disgenésico (leche) se notaban ciertos cambios morfológicos en el fermento láctico que en un principio nos indujeron a pensar

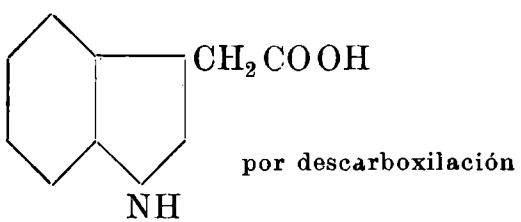
TRIPTOFANO



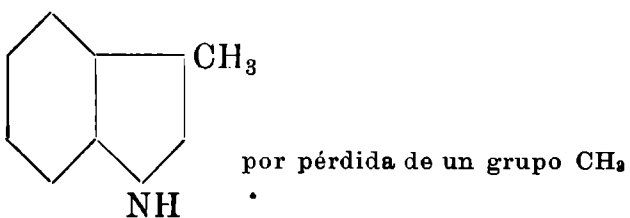
Ac. INDOLPROPIONICO



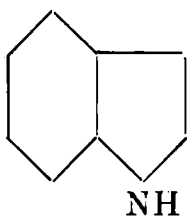
Ac. INDOLACEICTO



β METILINDOL (ESCATOL)



BENZOPIRROL (INDOL)



Cuadro 9.

en una contaminación. Como el hecho se repitiera reiteradamente hicimos aislamientos en placas, no desarrollando otra especie que nuestro bacilo láctico en sus colonias típicas. La cepa se conservaba pues pura. Trátase de un interesante caso de pleomorfismo bacterico condicionado por factores eugenésicos y disgenésicos. Según puede observarse en las microfotografías el bacilo que en leche-caldo está constituido por artículos finos, largos, de estructura homogénea; por pasajes a leche sola se torna corto, grueso, de bordes esfumados, con gruesas granulaciones ya capitulares, ya en toda su masa protoplásmica. Se subdivide en artículos cortos, con aspecto estreptobacilar que harían pensar en una especie diferente.

En este primer capítulo de nuestro trabajo nos hemos ocupado únicamente del aspecto cualitativo de la cuestión. Tenemos en marcha el estudio de la faz cuantitativa, así como de interesantes acciones sinérgicas en el bioquimismo de los fermentos lácticos que comunicaremos en su oportunidad.

Departamento de Bioquímica - Facultad de Química y Farmacia - La Plata.
