

PREPARACION Y USO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE LECHE DESCREMADA DE VACA

C.A. QUINONES-SOWERBY(*)

RESUMEN

Se describe la preparación y uso de un medio a base de leche descremada de vaca, utilizando como indicador el rojo fenol y enriquecida con peptona, extracto de levadura, etc., con una concentración final de agar-agar del 2 %.

Este medio de cultivo ha permitido objetivar reacciones claramente de fermentación de la lactosa, proteinólisis, lisis de los glóbulos butirosos, producción de pigmentos, etc.

Su forma sencilla de preparación, y la posibilidad de soportar el crecimiento de muchas bacterias muy exigentes lo hace muy útil para uso general en Bacteriología.

Palabras Claves: MEDIOS DE CULTIVO,
LECHE DESCREMADA,
BACTERIOLOGIA.

VETERINARIA 21 (91) 40-42 mayo-ago. 1985

SUMMARY

The method of preparation and use of a culture medium made up with cow skim milk. This includes Phenol Red as pH indicator, Yeast extract, etc., with 2 % of agar-agar.

This culture medium allowed to put in evidence very clearly the fermentative action on lactose, proteolysis, lysis of fat milk globules, pigment production, etc.

Its simple technology of preparation, the fact of supporting the growth of many fastidious bacteria makes it worth for general use in Bacteriology.

Key Words: CULTURE MEDIA, SKIM MILK,
BACTERIOLOGY.

VETERINARIA 21 (91) 40-42 may-aug. 1985

INTRODUCCION

A lo largo de varios años de desempeñar funciones en laboratorios veterinarios (de investigación, de diagnóstico o de producción) se comprueba que es difícil encontrar un medio de cultivo como el mejor o más completo para el trabajo normal de rutina en cuanto a diagnóstico y aislamiento de patógenos.

Particularmente se advierte este aspecto cuando en forma frecuente los agentes patógenos que pueden aislarse pertenecen a los grupos más exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas (bacterias fastidiosas).

Después de ensayar y estudiar muchos medios enriquecidos de diferentes maneras resulto destacable que la leche de vaca constituye un medio nutritivo casi completo y perfecto para sostener muy diferentes géneros de vida, equilibrada en sus diversos constituyentes y de fácil obtención, a un precio razonable (1).

Se dirigieron los esfuerzos a diseñar un medio a base de leche que permitiera estudios de dinámica de desarrollo, bioquímico, de morfología de colonias, aislamiento de bacterias, numeración y eventualmente para conservación, además de poder determinar ataque a proteínas, fermentación de la lactosa, etc. (2).

MATERIAL Y METODOS

Se formuló un medio basal con la siguiente constitución: Base agar rojo fenol (BARF).

Parte 1.

Extracto de carne	5	g
Cloruro de sodio	5	g
Extracto de levadura	3	g
Hidrolisado de lactalbumina	5	g
Triptosa	10	g

Fosfato disódico	1	g
Rojo fenol (sol. acuosa 10 %)	1.2	ml
Agar - agar	40	g
Agua destilada	1	litro

Modus operandi: En recipiente adecuado, calentar el agua hasta ebullición e ir agregando los ingredientes hasta disolución completa.

Ajustar a pH 6.9 con carbonato de sodio, sol. acuosa al 10 %. Repartir en botellas, unos 300 ml para una botella de un litro.

Esterilizar a 107-110° C. durante 20 a 30 min.

Parte 2.

En medio de leche líquida se formuló de la siguiente manera (medio leche-rojo fenol: LRF): A un litro de leche descremada de vaca, agregarle: Rojo fenol, solución acuosa 1.2 %: 1.2 ml
Ajustar a pH 6.8-6.9. Repartir en botellas, tubos, etc.

Esterilizar a 107-110° C. durante 20 a 30 min.

Preparación

Conviene preparar cantidades sensiblemente iguales de 1 y 2, las que se dejan enfriar a unos 55° C., se mezclan y se reparten en cajas de Petri, tubos (para pico de flauta, tubos de tapa rosca, etc.)

El color del medio debe ser aprox. de color damasco (pH 6.8-6.9) (3).

Como indicador hemos utilizado últimamente Rojo Fenol soluble en agua (de fórmula C19 H14 O5 S x Na, de Gibco, U.S.A., amarillo a pH 6.8 y rojo a pH 8.4) que nos ha dado un virado muy notorio, tanto en la acidificación por fermentación de la lactosa o cuando existió proteinólisis y el pH cambió a alcalino; no hemos visto que se produzca reducción.

RESULTADOS

En general se puede afirmar que el medio de cultivo propuesto permitió el desarrollo de una cantidad muy grande de bacterias grampositivas o gramnegativas, cocos, bacilos, hongos, levaduras, etc. (4).

* D.M.V. Director del Instituto de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria del Uruguay.

Ultimamente se la ha utilizado para el desarrollo de bacterias bioluminiscentes, también con éxito, aunque para obtener máxima producción de luz, fue necesario el agregado superficial de solución de cloruro de sodio al 3 %, dejando absorber por algunos minutos.

Observaciones

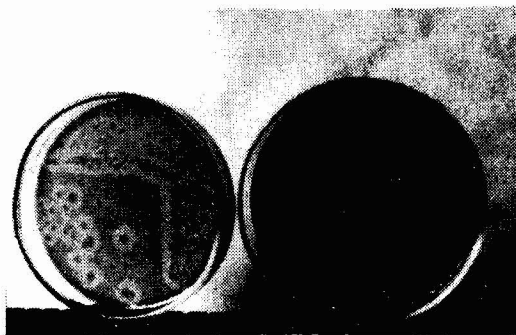
Después del desarrollo bacteriano, el medio puede permanecer sin cambios o pueden observarse algunos de los siguientes cambios:

Ataque de la lactosa: Se detecta por viraje del color, que de un tono damasco pasa al amarillo claro, comenzando alrededor de las colonias en desarrollo; si se reconoce el aroma en la boca del tubo, se percibe un olor típico de fermentación láctica. Este es el caso típico de algunos estreptococos.

Respecto de **proteólisis**, se deben distinguir dos aspectos: 1) Virado del medio (aún mismo lejos de la colonia) al color rosado o rosado-lila, aprox. pH 7.8, o un violado (aprox. pH 8.4) conservándose opaco el medio.

Este efecto aparecería debido a la hidrólisis de la caseína y/o proteína soluble. Si se observa microscópicamente se comprueba conservación de los glóbulos butirosos. Esta reacción es típica de *Neisseria ovis*, y probablemente de otros tipos también, como por ejemplo una *Neisseria* spp aislada del saco conjuntival de perros padeciendo queratoconjuntivitis aguda.

2) Virado del medio al color violacio-lila: el medio de cultivo en la parte que rodea a las colonias se vuelve transparente en forma de halo.

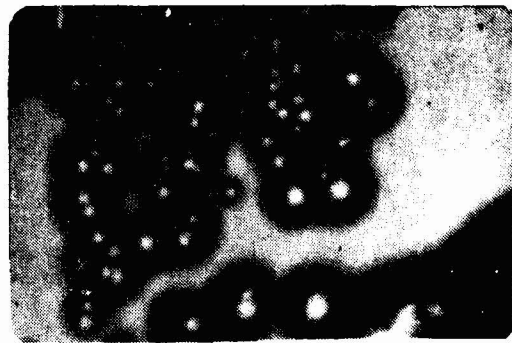


Dos placas de Petri con medio de agar leche cultivado por 72 horas; se observa alcalinizado general del medio. A la Izq.: desarrollo de *Moraxella bovis*; obsérvese el halo de lisis que rodea a las colonias. A la Der.: desarrollo de *Neisseria ovis*; se comprueba ataque a la proteína (alcalinización) pero no lisis de glóbulos butirosos.

Microscópicamente se aprecia la desaparición, la lisis de los glóbulos butirosos; este aspecto comienza y es más notorio alrededor de las colonias de bacterias. Esto se comprueba en *Bacillus* spp, *Moraxella bovis*, etc.

3) Virado del medio a amarillo claro (aprox. pH 6.60 y conversión a transparente: este es el caso típico de muchas cepas de estafilococo patógeno, durante cuyo desarrollo predomina la fermentación de la lactosa (volviendo el pH ácido) sobre la proteinólisis y la lisis de los glóbulos butirosos (que es muy intensa, por otra parte).

Con respecto a otros patógenos, por ejemplo bacterias patógenas anaerobias esporuladas como *Clostridium septicum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. perfringens (welchii)* tipos B, C, y D; *Cl. tetani*, así como *Cl. oedematiens*, han crecido dando colonias típicas (Sterne & Batty, 1976). (5).



Placa de agar leche cultivada por 72 hs. *Moraxella bovis*. Se observan áreas de lisis que rodean a las colonias proteolíticas y que lisan los glóbulos butirosos.

Asimismo han desarrollado algunos contaminantes poco exigentes, como por ejemplo *Clostridium sporogenes*.

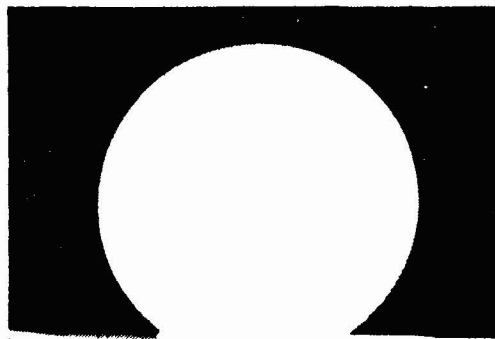
Entre las bacterias aerobias grampositivas, han desarrollado muy bien *Bacillus anthracis*, *Bacillus* spp (diferentes tipos), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Str. agalctiae*, *Str. equi*, *Str. spp*, *Corynebacterium pyogenes*, etc.

Entre las bacterias gramnegativas han desarrollado muy bien *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella bovis*, *Neisseria ovis*, *Neisseria* spp (aislada con el Dr. Calvo de un cuadro de queratoconjuntivitis aguda de un canino, 1983), diversas bacterias bioluminiscentes, *Br. abortus cepa 19*, etc.

En pocas oportunidades —en el uso de una partida de medio preparado con leche descremada líquida— se ha apreciado dificultad para el desarrollo bacteriano, y aún cuando se ha sospechado la presencia de antibióticos o algún inhibidor, en ningún caso pudo comprobarse ese extremo; procurando obviar ese problema se usa en la actualidad leche descremada en polvo para consumo humano y no se ha observado problema alguno.

Ultimamente se están utilizando Placas de Petri con este medio para confirmar acción germicida en antisépticos y desinfectantes, técnica que se piensa comunicar próximamente (en colaboración con el Dr. Ramos, 1983).

En general no se ha observado "hausch" en las bacterias que dan el fenómeno. Desde el punto de vista de la producción de pigmentos (sean éstos difusibles en el medio o bien queden contenidos

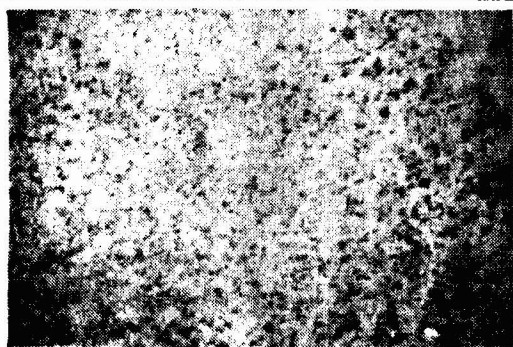


Placa de agar leche cultivada por 72 hs. *Staph. pyogenes*. Se observan acidificación (ataque a la lactosa) y amplias zonas de lisis de glóbulos butirosos.

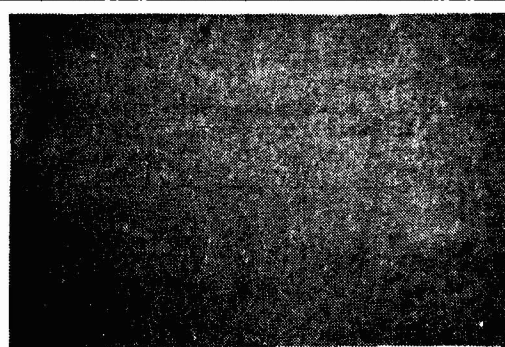
en la célula bacteriana), ha sido muy destacable en *Staphylococcus spp* (de todos los tipos que se han ensayado: *aureus*, *albus* y *citreus*), *Pseudomonas spp* (especialmente *Ps. aeruginosa*), en *Serratia marcescens*, etc.

En cuanto a la actividad proteolítica podemos establecer con facilidad la acción de algunos patógenos, como por ejemplo puede observarse en la Tabla I.

T A B L A I				
Microorganismo	Acción sobre los glóbulos butirosos	pH	Producción pigmento SOL.	Coloración colonia
<i>Staph. patógenos</i>	Gran halo de lisis	ácido	—	xxxx
<i>Moraxella bovis</i>	Mediano halo de lisis	alcalino	—	xx
<i>Neisseria ovis</i>	negativo —	alcalino	—	xx
<i>Clostridium tetani</i>	negativo —	sin cambio	—	—
<i>Cocos marinos bioluminiscentes</i>	negativo —	alcalino	—	x (1)
<i>Str. equi</i>	negativo —	sin cambio	—	x
<i>Ps. aeruginosa</i>	Gran halo de lisis	alcalino	xxxx	x
<i>Str. Termophilus</i>	negativo —	ácido	—	—



Corte (perpendicular a la superficie) de cultivo en agar leche (en caja de Petri). Zona no atacada. Se observa presencia de glóbulos butirosos (100x).



Corte (perpendicular a la superficie) de cultivo en agar leche (en caja de Petri). Zona atacada y comienzo de zona no atacada. No se observan glóbulos butirosos.

DISCUSION

Luego de varios años de utilizar un medio de cultivo a base de leche descremada de vaca, se presenta el método de preparación y resultados de su uso.

Este medio se ha enriquecido con el agregado de extracto de levadura, hidrolisado de lactalbúmina (este se ha eliminado en algunos casos sin cambiar los resultados), triptosa y extracto de carne (también se ha suprimido).

Se ha utilizado este medio de cultivo en el trabajo general de laboratorio microbiológico veterinario, en el estudio de materiales de diagnóstico y ha dado muy buenos resultados, y según el crecimiento bacteriano puede rendir indicaciones muy útiles en cuanto al tipo de microorganismo que desarrolla. Por lo expuesto se sugiere su utilización general y se recomienda se comuniquen los resultados que se obtengan.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 BAKER, F.J., Manual de Técnica Bacteriológica. Acribia, 1970.
- 2 CALMETTE, A., BOQUET, A. NEGRE, L. & BRETEY, J. Manuel technique de Microbiologie et de Sérologie, Masson, 1948.
- 3 DIFCO. Manual de Bacteriología (Recopilación de temas). Madrid, 1977.
- 4 OXOID. The Oxoid Manual. 3rd ed, 1972.
- 5 STERNE, M. & BATTY, I. Pathogenic Clostridia, London, Butterworths, 1976.

Recibido para publicarse: 28-5-84.