

NUEVA PEPTONA DE ORIGEN VEGETAL COMO MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS Y HONGOS

(Medio de cultivo de Ceruzzi)

Dr. Francisco Ceruzzi*

Bioquímico y Farmacéutico

Jefe de Trab. Práct. - Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas
Fac. de Ciencias Médicas. - Univ. Nac. de Córdoba. - Rep. Argentina

INTRODUCCION

Es conocido el uso generalizado de los medios de cultivos de origen vegetal y su difusión en Bacteriología.- De los numerosos autores que describieron medios vegetales, sólo citaremos algunos a título ilustrativo: Edgerton (1918), usa las habas para el cultivo de bacterias y hongos ⁽⁹⁾; Mickle y Breed (1925), describen un medio en base a jugo de tomate, para *Lactobacillus* ⁽⁸⁾; Brewer (1943), usa diversos granos vegetales ⁽²⁾.- También son conocidos los medios de extracto de malta ⁽¹⁶⁾, de papa, la peptona de soja (o Fitona), la que constituye el ejemplo típico de peptona de origen vegetal ⁽⁸⁾, etc.-

Al observar estos medios de cultivos, se aprecia que la mayoría de ellos, usan partes del vegetal donde se concentran notablemente las sustancias nutritivas (frutos, semillas), o con alta proporción de sustancias de reserva (tubérculo por ejemplo).

En la presente comunicación, se prepara y describe un nuevo medio de cultivo para bacterias y hongos, usando como sustrato "hojas y tallos tiernos de alfalfa"; constituyendo este hecho, una diferencia con los anteriores, al usar estas partes del vegetal.

La alfalfa o alfa (*Medicago sativa* L.- Familia Leguminosas-Subfamilia Papilionadas- Orden Rosales)⁽¹¹⁾, llamada en Europa "Lucerne" o "Erba Médica", es una planta herbácea, perenne, originaria de Armenia y Asia Central, donde aún existe en estado silvestre (*Foto. No. 1*).

Es indudablemente la forrajera más valiosa y cultivada, tanto para corte como para pastorero⁽⁴⁻¹⁴⁾.

Como la gran mayoría de las Leguminosas, vive en simbiosis con bacterias fijadoras del Nitrógeno libre de la atmósfera; constituyendo una característica destacable de estas plantas, la obtención de elevadas cantidades de materia cuaternaria del tipo de las proteínas. Evidentemente, esta simbiosis bacteriana juega un rol importante en la abundancia de proteínas en estos vegetales.

Químicamente, estas proteínas pertenecen en su mayor parte, al grupo de las llamadas "globulinas vegetales", caracterizadas por su solubilidad en soluciones diluídas de sales neutras, por su reacción ácida, contenido en glicocola y por la falta de gliadina y glutelina⁽⁴⁾.

La elevada proporción de proteínas que contiene la alfalfa, sumado a la profusión de vitaminas y sustancias minerales (Ver cuadros No. 5 y 6), hacen de ella un alimento nutritivo de primerísima calidad (preconizado

inclusive en alimentación humana); de allí que se haya pensado en su utilización como sustrato para la preparación de medios de cultivos bacteriológicos y micológicos, objeto del presente trabajo.

Pero para ello, es necesario someter el vegetal al desdoblamiento de sus proteínas en polipéptidos y aminoácidos (paso indispensable para su utilización como nutriente por parte de las bacterias)⁽⁵⁾; para lo cual se utilizaron tres métodos: Hidrólisis enzimática, ácida y alcalina, obteniéndose así las peptonas que constituyen el sustrato nutritivo para la preparación del medio de cultivo que se propone.

MATERIALES Y METODOS:

I.- MATERIALES:

- a) Alfalfa (*Medicago sativa* L.): Variedad comercial de la zona. Plantas de tres meses de edad, de 50 cm. de altura, sin flores. Recolectadas en el mes de mayo/1996, en Guiñazú (Prov. de Córdoba). Se usaron las hojas y tallos tiernos de la mitad superior de la planta.
- b) Papaína (React. Merck)
- c) Sulfuro de Sodio (React. Merck)
- d) Sol. de HCl al 1%
- e) Sol. de OHNa al 0,5%
- f) Agar: Purified Agar (React. Difco)

II) MÉTODOS:

Las plantas se secaron en la estufa a 37 C durante seis días. Luego se pulverizaron las determinaciones cuantitativas siguientes:

CUADRO 1

ALFALFA FRESCA Y DESECA - DETERMINACION DE HUMEDAD Y PROTEINAS TOTALES

PARTE DEL VEGETAL ANALIZADO		HUMEDAD	PROTEINAS TOTALES
HOJAS Y	FRESCA	82,17 gr. %	6,5 gr. %
TALLOS TIERNOS	DESECADA	9,27 gr. %	26,02 gr. %

La humedad se determinó por método indirecto; las Proteínas totales, por el método de Kjeldahl.

Preparación del medio de cultivo

Se siguieron tres técnicas, a saber:

Método I: Hidrólisis enzimática (2):

En un erlenmeyer, se colocan 50 gr. de alfalfa en polvo y se le agrega 850 ml. de agua destilada.

En otro, se disuelve 2,30 gr. de papaina de 125 ml. de agua

destilada. En caso de usar papaína como concentrado de polvo fino y blanco, trabajar bajo campana porque es tóxica; no en cambio con la forma granulosa común, como la usada en este trabajo.

En un tercer erlenmeyer, se colocan 0,38 gr. de sulfuro de sodio y 25 ml. de agua destilada, agitando hasta disolución, Se mezclan estas dos últimas soluciones y se deja en reposo 15 minutos.

Se agrega la mezcla anterior a la del vegetal y agua (pH de esta mezcla: 6,6).

Se ajusta el pH a 5 con HCl al 10%. Se deja en estufa a 37°C, durante 24 hs.

Se filtra a través de gasa y algodón, comprimiéndose el material hasta que pase todo el líquido. Se filtra por disco Seitz "K" o por papel de filtro Whatman N°1. Se completa hasta el volumen original de 1.000 ml., con agua destilada estéril. Se agrega NaCl al 0,5% (5 gr.).

Se ajusta el pH a 7,2 - 7,4 (para el cultivo de bacterias) y a 5,5 (para hongos). Se agrega agar al 1,5 - 2%.

Se esteriliza por tindalización o por vapor fluente.

Se dispone en placas de Petri o en tubos de ensayo en "pico de flauta".

Método II: Hidrólisis ácida:

En un erlenmeyer, se colocan 50 gr. de alfalfa en polvo. Se le agrega 1.000 ml. de Sol. de HCl al 1% (pH de esta mezcla: 3,8).

Se calienta en autoclave a vapor fluente, durante 30 minutos.

Se filtra como en el caso anterior y a partir de allí, se produce con los distintos pasos, en un todo igual como en el mismo método.

Método III: Hidrólisis alcalina:

En un erlenmeyer, se colocan 50gr. de alfalfa en polvo. Se le agrega 1.000 ml. de Sol. de OHNa al 0,5% (pH de esta mezcla: 9).

Se calienta en autoclave a vapor fluente, durante 30 minutos.

Se continúa como en los casos anteriores.

Nota: Los medios de cultivos así preparados, por cualquiera de los tres métodos, son de color pardo verduzco.

RESULTADO:

Los medios de cultivos, dispuestos en placas de Petri o en tubos de ensayo en "pico de flauta", fueron sembrados, las bacterias por estrías y los hongos, colocando inóculos en la superficie de los mismos. Los resultados obtenidos, se consignan en los cuadros siguientes:

CUADRO N° 2
DESARROLLO DE BACTERIAS EN EL MEDIO DE ALFALFA (PH: 7,2 -7,4)
PREPARADO SEGUN MET. I: HIDROLISIS ENZIMATICA

BACTERIA	T° de Inc	Tpo. de Inc.	Profusión del desarrollo	Características del desarrollo	Exámen microscópico	OBSERVACIONES
Staphylococcus aureus	37°	24h.	Abundante	Colonias butirosas opacas amarillos doradas	Morfología normal	
Gaffkya tetrágena	"	"	Muy abundante	Desarrollo y colonias amarillas	"	
Escherichia coli	"	"	Abundante	Colonias poco elevadas lisas incoloras	"	
Salmonella typhi	"	"	"	Colonias incoloras opacas translúcidas	"	
Salmonella typhimurium	"	"	"	Colonias pequeñas translúcidas incoloras	"	
Klebsiella pneumoniae	"	"	"	Desarrollo blanco grisáceo de aspecto mucoso	"	
proteus vulgaris	"	"	"	Película delgada translúcida	"	
Proteus morgani	"	"	"	Película delgada translúcida	"	
Citrobacter freundii	"	"	"	Colonias lisas incoloras	"	
Enterobacter aerogenes	"	"	Muy abundante	Colonias lisas blanco grisáceo	"	
Pseudomonas aeruginosa	"	"	Abundante	Desarrollo y colonias grandes diseminadas	"	Color verde esmeralda muy notable (Fotog.N°2)
Pseudomonas spp.	"	"	"	Desarrollo blanco diseminado	"	
Bacillus anthracis	"	"	"	Desarrollo elev.opaco blan. grisáceo, bordes irregular.	"	
Bacillus subtilis	"	"	"	Desarrollo diseminado color blanco	"	
Lactobillus plantarum	"	72 H	"		"	pH del medio:5,5.En anaerobiosis:sembrado p.punt.
Streptococcus spp.	"	48 h	"	Turbidez moderada del medio	"	Sembrado en medio líquido
Streptococ. pneumoniae	"	"	"	Turbidez notable del medio	"	Sembrado medio líquido-Nicroaerofilia(F.N°3)

CUADRO N° 3: DESARROLLO DE HONGOS EN EL MEDIO DE ALFALFA (pH:5,5)
PREPARADO SEGUN MET.:1 HIDROLISIS ENZIMATICA

ESPECIE	T° de Inc	Tpo. de Inc.	Profusión d desarrollo	Características del desarrollo	Exámen microscópico	OBSERVACIONES
<i>Candida albicans</i>	37°C	24 h	Abundante	Colonias cremosas húmedas	Morfología normal	
<i>Nocardia asteroides</i>	"	48 h	"	Colonias plegadas granuladas color crema	"	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	"	48 h	"	Colonias blanco crema, húmedas brillantes	"	
<i>Microsporum gypseum</i>	"	72 h	"	Colonias algodonosas elevadas, blancas	"	Fotog. N° 4
<i>Epidermophyton floccosum</i>	"	72 h	"	Colonias polvorientas amarillas verdosas	"	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	"	15 d	Moderado	Desarrollo seco, yesoso gris verdoso	"	
<i>Cephalosporium acremanium</i>	"	72 h	"	Desarrollo rugoso, radiado blanquísimo	"	En Sabouraud: color amarillo intenso
<i>Fonsecaea padrosoi</i>	"	5 d	"	Colonia parduzca de aspecto gamuzado	"	
<i>Seccharomyces cerevisiae</i>	"	48 h.	Abundante	Colonia y películas blancas húmedas, cremosas	"	
<i>Saccharomyces lactis</i>	"	24 h.	"	Colonias blancas húmedas, cremosas	"	
<i>Zygosacharomyces app.</i>	"	72 h.	"	Desarrollo húmedo color blanco	"	
<i>Aspergillus giganteum</i>	"	72 h.	"	Desarrollo pulverulento blanco, después verdoso	"	
<i>Aspergillus glaucus</i>	28°C	96 h.	"	Desarrollo algodonoso blanco	"	A 1° ambiente: mejor desarrollo
<i>Aspergillus fumigatum</i>	37°C	72 h.	Moderado	Desarrollo polvoriento verde amarillento	"	
<i>Aspergillus niger</i>	"	72 h.	"	Desarrollo algodonoso blanco poco polvoriento	"	
<i>Aspergillus oryzae</i>	"	72 h.	Abundante	Desarrollo algodonoso blanco	"	
<i>Penicillium notatum</i>	"	72 h.	"	Desarrollo rugosos algodonoso blanco ceniza	"	
<i>Penicillium cememberti</i>	28°C	7 d.	"	Desarrollo blanco grisáceo	"	A 37°: No tubo desarrollo
<i>Stretomyces app.</i>	"	72 h.	Escaso	Desarrollo húmedo color blanco	"	
<i>Nucor racamosus</i>	37°C	72 h.	Abundante	Desarrollo algodonoso grisáceo	"	
<i>Alternaria alternate</i>	28°C	72 h.	"	Desarrollo algodonoso, blanco poco elevado	"	A T° ambiente: mejor desarrollo
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	37°C	72 h.	"	Desarrollo húmedo blanco grisáceo	"	
<i>Circinella nigra</i>	"	72 h.	"	Desarrollo algodonoso blanco grisáceo	"	
<i>Pichia belgica</i>	28°C	96 h.	"	Colonias pequeñas, húmedas blancas	"	A T° ambiente: mejor desarrollo
<i>Hormodendron compactum</i>	37°C	15 d.	Escaso	Desarrollo verde grisáceo polvoriento	"	
<i>Curvularia geniculata</i>	"	20d.	Nulo			En medio destud (Mel 1) Desarrollo abundante, algodonoso blanco anaranjado

**CUADRO N°4:
SIEMBRA DIRECTA DE DIVERSOS MATERIALES PATOLOGICOS EN EL MEDIO DE ALFALFA**

MATERIAL	Sembrado en medio preparado según	T° de Inc.	Tpo. de Inc.	Profusión del desarrollo	Exámen Microscópico
Flujo vaginal	Mét. I H. enzimática	37°C	24 hs.	Abundante	Muy abundantes bastones Gram negat. y algunos Gram posit.
Espuito	"	"	"	Abundante	Cocos Gram Negat. Algunos diplococos Gram. posit. y bastones Gram negat.
Úlcera de pierna	"	"	"	Muy abundante	Abundantes estafilococos y algunos bastones Gram. posit.
Secreción endometrial	"	"	"	Abundante	Muy abundantes bastones Gram. negat. y algunos cocos y diplococos Gram Posit.
Escobillado faríngeo	"	"	"	Abundante	Diplococos Gram negat. arriñonados del tipo de N.catarrhalis. Cocos y Diplococ. G. pos.
Escobillado faríngeo	Mét. II H. ácida (medio líquido)	"	48 h.	Turbidez notable	Abundante cantidad de Diplococos Gram. posit.
	Mét. II-H.ácida + 10% sangre de conejo(med.líquido)	"	48 h.	Turbidez muy notable	Muy abundante cantidad de diplococos Gram. posit y en cortadas cadenas.

Finalmente, el desarrollo de bacterias contenidas en diversos materiales patológicos, puede observarse en el cuadro siguiente:

CUADRO N° 5:
COMPOSICION QUIMICA DE LA ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) PARTE AEREA DESHIDRATADA MOLIDA-MINIMO 22 % DE PROTEINAS (10)

		natural	seco			natural	seco
Materia seca	%	92,9	100,0	Riboflavina	mg/kg	17,4	18,7
Cenizas	%	10,3	11,1	Tiamina	mg/kg	4,2	4,5
Fibra bruta	%	18,5	19,9	tocopherol	mg/kg	151,0	162,5
Grasas	%	3,7	4,0	Vitamina B	mg/kg	7,80	8,39
Fracción no-N	%	37,9	40,8	Vitamina K8	mg/kg	8,50	9,15
Proteina (N x 6,25)	%	22,5	24,2	Vitamina A equiv.	UI/g	422,0	454,1
Calcio	%	1,48	1,59	Alanina	%	1,30	1,40
Cloro	%	0,52	0,56	Arginina	%	1,00	1,08
Hierro	%	0,045	0,048	Ac. aspártico	%	2,30	2,47
Magnesio	%	0,34	0,36	Ac. glutámico	%	2,30	2,47
Fosforo	%	0,28	0,30	Glicina	%	1,10	1,18
Potasio	%	2,51	2,70	Histidina	%	0,60	0,64
Sodio	%	0,11	0,12	Isoleucina	%	0,90	0,97
Cobalto	mg/kg	0,300	0,323	Leucina	%	1,70	1,83
Cobre	mg/kg	11,1	11,9	Licina	%	1,00	1,08
Yodo	mg/kg	0,200	0,215	Metionina	%	0,40	0,43
Manganeso	mg/kg	37,0	39,8	Fenilalanina	%	1,20	1,29
Selenio	mg/kg	0,540	0,581	Polina	%	1,10	1,18
Zinc	mg/kg	20,0	21,5	Serina	%	0,90	0,97
Caroteno	mg/kg	252,5	271,7	Treonina	%	1,00	1,08
Colina	mg/kg	1853,0	1994	Triptófano	%	0,60	0,64
Acido fólico	mg/kg	3,00	3,23	Tirosina	%	0,80	0,88
Niacina	mg/kg	53,8	57,3	Valina	%	1,20	1,29
Acido pantotámico	mg/kg	55,0	58,5				

Nota: Con ligeras diferencias el desarrollo de las bacterias y hongos que figuran en los tres cuadros anteriores, es semejante al que se observa en los medios preparados por los métodos II y III.-

Discusión:

I) Es conocido que los requerimientos nutritivos de la bacterias son:

a) Compuestos necesarios como fuente de energía.- b) Compuestos indispensables para la síntesis de material celular: Fuente de carbono. Compuestos para obtener Nitrogeno.- factores de crecimiento (aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc.) c) Iones inorgánicos y oligoelementos (5-12).

Asimismo, que muchos hongos obtienen Carbono y energía, de los carbohidratos, ácidos orgánicos, péptidos, etc. y que las fuentes de nitrógeno incluyen compuestos orgánicos, como aminoácidos (6).

La composición química de la alfalfa, provee holgadamente de todos estos requerimientos nutritivos: composición que puede observarse en los cuadros siguientes.

II) Indefectiblemente hay que someter el material a un proceso de hidrólisis de sus proteínas, ya que las moléculas completas de las mismas, difícilmente entran en la célula bacteriana y por consiguiente deben ser hidrolizadas a subunidades más pequeñas, antes de poder ser utilizadas como fuente de Nitrógeno; por que como es conocido, las bacterias que poseen enzimas proteolíticas extracelulares, son relativamente pocas (5).

Este hecho explica la ausencia total de desarrollo, al haberse intentado la preparación del medio de cultivo, dejando simplemente el material en maceración durante una semana, ya que en este caso no hay desdoblamiento de proteínas. Por consiguiente, sin previa hidrólisis del material, no hay posibilidad de obtener un medio apropiado para el desarrollo bacteriano o fúngico.

III) La hidrólisis de las proteínas, puede llevarse a cabo por distintos métodos: Hidrólisis enzimática, ácida o alcalina (13).

Hidrólisis enzimática: Las enzimas proteolíticas, hidrolizan proteínas, separando enlaces peptídicos específicos y produciendo así peptonas características. Una gran variedad de peptonas pueden ser

obtenidas así, permitiendo que diferentes enzimas proteolíticas, actúen sobre diferentes sustratos proteicos.

Comercialmente, se usan tres enzimas: Pancreatina, pepsina y papaína.

La pancreatina, es una mezcla de extracto crudo de páncreas. Contiene tripsina, quimiotripsina y lipasas. Requiere la presencia de iones Ca^{++} para su reacción autocatalítica sobre las proteínas.

La pepsina, es extraída de la mucosa del estómago de animales. Es muy selectiva en su acción sobre los enlaces peptídicos y prefiere aquellos con enlaces aromáticos.

La papaína, es probablemente la más usada en la preparación de medios de cultivos.

La papaína comercial, es un látex seco y granuloso, extraído del fruto y hojas de la planta "Carica papaya". Un concentrado enzimático muy activo, puede obtenerse como un polvo fino y blanco, pero esta forma es tóxica y su inhalación debe evitarse a toda costa⁽³⁾.

En el presente trabajo, se usó la papaina comercial (látex seco y granuloso), pero en caso de trabajar con el concentrado enzimático de polvo fino y blanco, hay que tomar las precauciones debidas para evitar su inhalación y se debe trabajar siempre bajo campana.

La papaína, es activada por agentes reductores, como grupos sulfitos y sulfidrillos. Esto explica el uso de SNa₂ en la técnica usada en este caso. Es asimismo, inactivada por agentes oxidantes, como peróxidos y oxígeno, los cuales bloquearían los grupos -SH-.

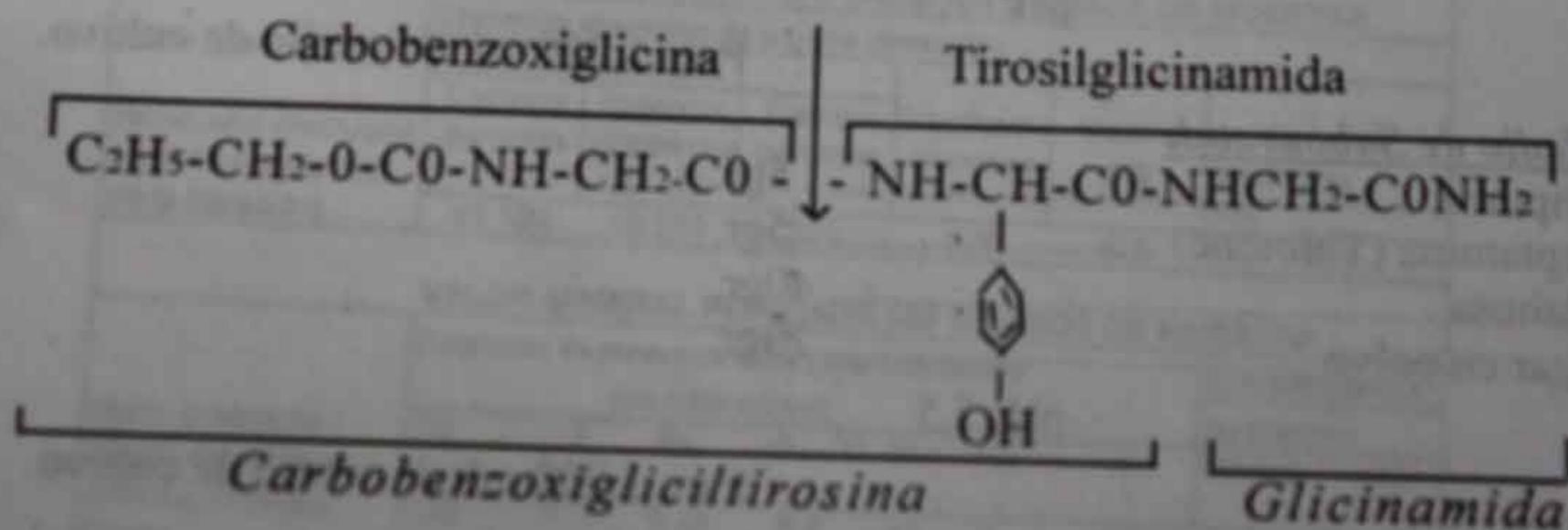
La papaína, es activa a un pH amplio, pero inestable a menos de 3 y más de 11.

Altos niveles de Hidratos de Carbono fermentables están presentes también en el residuo de la peptona final y esto debe ser tenido en cuenta, por que influye en forma positiva en el desarrollo bacteriano ⁽³⁾.

La forma de actuar de la papaína sobre los enlaces peptídicos, por ejemplo sobre un tripéptido es:

Hidrólisis de la Carbobenzoxiglicil Tirosilglicinamida ⁽¹³⁾

Hidrólisis de la Papaína



Respecto a la hidrólisis ácida, los primeros experimentos fueron llevados a cabo por Braconnot en 1820. Se usan ácidos fuertes, generalmente HCl , como en este caso.

La hidrólisis alcalina, es menos empleada por provocar racemización de los ácidos aminados, lo que no se observa en la hidrólisis ácida, pero tiene la ventaja de que no descompone la triptofano, mientras que la ácida lo destruye (3).

IV) Evaluación comparativa de la profusión del desarrollo:

Se realizó comparando este medio de cultivo que se propone, con "Agar nutritivo", para el desarrollo de bacterias y con el medio de "Sabouraud", para los hongos; siendo la composición de ambos medios la siguiente:

Nutrient Agar (Oxoid):

Extracto de carne	1 gr.
Extracto de levadura	5 gr.
Peptona	5 gr.
CINa	5 gr.
Agar N°3 Oxoid	15 gr.

pH: 7,4

Para 1.000 ml. de medio de cultivo.

Medio de Sabouraud:

Triptona	5 gr.
Peptamina (Thiotone)	5 gr.
Maltosa	40 gr.
Agar en polvo	20 gr.

pH: 5,5

Para 1.000 ml. de medio de cultivo.

Para la evaluación del crecimiento, en el caso de las bacterias o de los hongos levaduriformes, se preparó una suspensión de cada una de ellas en agua destilada estéril, en una concentración aproximada de 300.000.000 microorganismos (comparado la turbidez en Nefelómetro de Mac Farlan); de las que se sembraron tanto en el medio propuesto, como en Agar nutritivo o Sabouraud, diluciones determinadas que se diseminaron con espátula de Drigalski, en los medios dispuestos en placas de Petri.

Los resultados obtenidos, se consignan en los cuadros siguientes:

CUADRO 6: COMPOSICION QUIMICA DE LA ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) FRESCA (15)

VALOR CALORICO Y PLASTICO POR CADA 100 Gr. DE MUESTRA								
Parte analizada	Composición química de la parte comestible (en gramos)					Calorías		
	Hidratos de Carbono	Proteínas	Grasas	Agua	Celulosa			
Hojas y peciolo	0,30	6,40	1,04	40	2,35	36		
VALOR VITAMINICO POR CADA 100 GRAMOS DE MUESTRA								
Parte analizada	Contenido vitamínico de la parte comestible							
	Carotina gammas	Potencia Vitaminica A - UI	Tiamina gammas	Riboflavina gammas	Niacina mg	Acido ascórbico mg		
Hoja(corte efectuado 10 A 15 días antes de la floración)	11,100	18,500	220	176	0,6	181		
VALOR MINERAL POR CADA 100 GRAMOS DE MUESTRA								
Parte analizada Alfalfa (Medicago sativa L.) Fresca Cruda	Contenido de minerales en la parte comestible (en miligramos)							Predominancia (unidades) Básica Ácida
	Ca	P	Fe	Cu	C	Na	K	
	112	7	5,48	0,5	43	6	459	7,75

CUADRO N°7: EVALUACION COMPARATIVA DEL DESARROLLO EN AGAR NUTRITIVO Y MEDIO DE ALFALFA PREPARADO SEGUN MET. I: HIDROLISIS ENZIMATICA

Especie	Dilución sembrada	T° de Inc.	Tpo. de Inc.	N° de colonias contadas en:			Observaciones
				Agar Nutritivo	Sabouraud	M. Alfalfa (Mét. I)	
Gaffkya tetrágena	1:10.00	37°C	48 h.	70	76	
Klebsiella pneumonias	"	"	24 h.	240	2700	
Escharchia coli	"	"	24 h.	400	360	En medio de alfalfa Col. el doble más grandes
Pseudomonas spp.	"	"	24 h.	42	30	
Criptococcus neoformans	"	"	72 h.	37	46	
Saccharomyces lactis	"	"	72 h.	7	51	En medio de alfalfa Col. más grandes
Saccharomyces cerevisias	"	"	96 h.	6	12	
Candida albicans	"	"	48 h.	9	6	

CUADRO N° 8 EVALUACION COMPARATIVA DEL DESARROLLO EN AGAR NUTRITIVO O SABOURAUD Y MEDIO DE ALFALFA PREPARADO SEGUN MET. II: HIDROLISIS ACIDA

Especie	Dilución sembrada	T° de Inc.	Tpo. de Inc.	N° de colonias contadas en:			Observaciones
				Agar Nutritivo	Sabouraud	M. Alfalfa (Mét. II)	
Gaffkya tetrágena	1:100.000	37°C	48 h.	30	67	Fotog. N° 5
Citrobacter freundii	"	"	24 h.	1415	2572	En medio de Alfalfa Col. más grande
Proteus Morganii	"	"	24 h.	1670	505	En medio de Alfalfa Col. cuatro veces mayores
Cándida albicans	1:100.000	"	24 h.	55	60	En medio de Alfalfa Col. más grande
Criptococcus neoformans	"	"	48 h.	260	273	

CUADRO N° 9 EVALUACION COMPARATIVA DEL DESARROLLO EN AGAR NUTRITIVO O SABOURAUD Y MEDIO DE ALFALFA PREPARADO SEGUN MET. III: HIDROLISIS ALCALINA

Especie	Dilución sembrada	T° de Inc.	Tpo. de Inc.	N° de colonias contadas en:			Observaciones
				Agar Nutritivo	Sabouraud	M. Alfalfa (Mét. III)	
Klebsiella pneumonias	1:10.00	37°C	24 h.	296	292	
Enterobacter aerogenes	"	"	24 h.	5400	5330	En medio de alfalfa Col. tres veces mayores
Cándida albicans	1:10.000	"	48 h.	290	254	
Saccharomyces cerevisias	"	"	72 h.	111	128	
Criptococcus neoformans	"	"	72 h.	85	84	
Saccharomyces lactis	"	"	48 h.	298	308	Fotog. N° 6

Al observar los cuadros procedentes, se advierte, por el número de colonias contadas y por la profusión del desarrollo, que el medio propuesto es semejante o más rico que el Agar Nutritivo o que el medio de Sabouraud, para el desarrollo de bacterias y hongos, respectivamente.

Por otro lado, también se realizó comparaciones del desarrollo en ambos medios, en el caso de las bacterias, sembrando inóculos iguales con ansa calibrada (de 4 mm. de diámetro interno y alambre calibre 28 S.W.G. de platino o nicromo) y en el caso de los hongos no levaduriformes, depositando inóculos de tamaños semejantes, en Sabouraud y en el medio propuesto.

V) Se ha preferido desecar el material en estufa a 37° C., ya que secado al sol presenta una serie de pérdidas en su contenido nutritivo; por el contrario, deshidratado artificialmente, conserva la composición y digestibilidad de las proteínas y potencialidad de Vitamina "A" (Caroteno). Efectivamente, el Caroteno o Provitamina "A", se conserva en su totalidad por el deshidratación (7).

VI) El desarrollo en este medio de bacterias exigentes, tales como Streptococcus Spp. y la falta de formas degenerativas o de involución (Ver Cuadros N° 2 y 3), que como es sabido, se producen cuando las bacterias crecen en condiciones nutritivas deficientes (1), demuestra que se trata de un medio de cultivo "enriquecido", que

no sólo permite el desarrollo de bacterias comunes, sino también de bacterias exigentes.

VII) Ventajas económicas del medio propuesto:

Es indudable, que el alto precio de los medios de cultivos, hace necesario pensar continuamente en su abaratamiento.

Al respecto y para establecer comparaciones del costo de este medio con otros usados, se dan los siguientes datos (precios en comercio de la ciudad de Córdoba (R.A.):

-Agar nutritivo (Britania): Por 100 gr.:\$25.

Para 1 litro de medio: 31 gr. Precio por litro: \$7,75.

-Agar Sabouraud glucosado (Britania): Por 100 gr.:\$19.

Para 1 litro de medio: 65gr. Precio por litro: \$12.

De estos datos, se deduce que el precio del medio que se propone es muy bajo y se reduce al precio de la Papaína, ya que el SNa_2 es una sustancia muy barata:

-Papaína (Merck): Por 100 gr.: \$47. Pero con 100 gr. de ésta pueden prepararse 43 litros de medio. O sea:

Precio del medio propuesto, por litro: \$1.

Más aún, el precio del medio preparado por los otros dos métodos (hidrólisis ácida y alcalina), es ínfimo.

En resumen, el bajísimo costo del medio que se propone es innegable y lo hace apropiado para su uso corriente, en reemplazo de los medios tradicionales.

CONCLUSION

Por lo expuesto, se puede concluir que la peptona obtenida de la "alfalfa" (*Medicago sativa* L.), por hidrólisis enzimática, ácida o alcalina, constituye un sustrato muy adecuado para la preparación de medios de cultivos para el desarrollo de bacterias y hongos, la que reúne indudablemente los requerimientos energéticos y plásticos, necesarios para su desarrollo y multiplicación.

Que esta materia prima, es un recurso óptimo para el cultivo de bacterias y hongos, no solamente por tratarse de un vegetal cosmopolita de fácil adquisición y por su riqueza en proteínas, vitaminas y sustancias minerales, si no por la sencillez de la preparación del medio de cultivo y por su bajísimo precio. Finalmente, que éste constituye un medio "enriquecido", al permitir también el desarrollo de bacterias exigentes.

RESUMEN:

**NUEVA PREPONA DE ORIGEN VEGETAL COMO MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS Y HONGOS
(MEDIO DE CULTIVO DE CERUZZI)**

*En la presente comunicación, se prepara y describe un nuevo medio de cultivo para bacterias y hongos, usando como sustrato la peptona obtenida por hidrólisis enzimática, ácida o alcalina, de hojas y tallos tiernos de "alfalfa" (*Medicago sativa* L.).*

Se detallan las técnicas de preparación de este nuevo medio de cultivo, se mencionan las especies bacterianas y fúngicas que desarrollan y las características del crecimiento, como también la evaluación comparativa de proliferación con otros medios de cultivos.

Se concluye que la "alfalfa", constituye indudablemente un recurso óptimo, para la preparación de medios de cultivos bacteriológicos y micológicos, por tratarse de un vegetal cosmopolita y de fácil adquisición, por la gran cantidad de sustancias nutritivas que contiene, por la sencillez de la preparación del medio y por su bajo costo.

SUMMARY:

**NEW PEPTONE OF VEGETAL ORIGIN AS CULTURE MEDIA FOR BACTERIAS AND FUNGIS.
(CERUZZI'S CULTURE MEDIA)**

In the present research a culture media for bacterias and fungus is described, using as sustrato the peptone obtained by enzymatic, acid or alkaline hifrolisis of new stalks and leaves of "alfalfa" (Medicago sativa, L.).

The differents technics for the preparation of this culture media are detailed. The bacterial and fungal species that are grown, their growth characteristics and the proliferative evaluation compared with other culture media are mentioned.

Then we conclude that the peptone obtained of alfalfa is an optical way for the preparation the bacteriological and mycological culture media, mainly because is a cosmopolitan vegetal, very easy to obtain.

The great quality of nutritios substances in the preparation and low price, make the ideal way for elaboration of alturnetive culture media.

BIBLIOGRAFIA:

- 1).- Bier, o. *Bacteriología e Inmunología* - López Libreros Edit. (Buenos Aires) - 13a. Ed. 1970 - 94.
- 2).- Brewer, J.H. *Vegetal bacteriological media as substitutes for meat infusion media* *J. Bacter.* 1983 -46- N° 4 - 395.
- 3).- Bridson, E. *Oxoid Lab. The developmen, manufacture and control of Micribiological media* MPPhil CBiol FIBMS - *Technical Consultan Printed in the the U.K.* 1994 -12, 22, 24, etc.
- 4).- Burkart, A. *Las leguminosas argentinas* - ACME Agency, S.R.L. (Buenos Aires) 2a. Ed. 1952 - 24, 64, 75 y 336.
- 5).- Burrows, W. *Tratado de Microbiología* - Edit. Interam. S.A. (México) 1989 - 148 y 171.
- 6).- Carpenter, P.L. *Microbiología* Edit. Interam. S.A. (México) 1969 - 142.
- 7).- Del Pozo, M. *La Alfalfa: Su cultivo y aprovechamiento* - Edit. Mundi Prensa (Madrid) -1971 - 287 y 292.
- 8).- *Difco Manual of Deshidrate Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures* - Difco Laboratories (Detroit, Michigan U.S.A.) 9a. Ed. 1989 -73, 246 y 247.
- 9).- Edgerton, C.W. *Bean pod meal for culture media* *Phytopath.* 1998 -8-445.
- 10).- Ensminger, M.E. *Producción porcina* - Librería "El Ateneo" (Buenos Aires) 4a. Ed. 1970-485.
- 11) Gil, E. y Schürhoff, P.N. *Curso de Botánica General y Aplicada*- Edit. Labor S.A. (Barcelona) 3a Ed. 1959-306 y 313.
- 12).- Jawetz, E.; Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. *Manual de Microbiología Médica* Edit. "El Manual Moderno" S.A. (México) 15a Ed. 1995-83
- 13).- Novelli, A. *Química Orgánica (I y III)* - Edit. "El Ateneo" (Buenos Aires)- 2a Ed. 19975- I: 939 - III: 937 y 940.
- 14).- Parodi, L.R. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería* - Edit. ACME S.A.C.I. (Buenos Aires) - 1964 -785.
- 15).- *Tablas de la composición química de los alimentos.*- Univ. Nac. de Córdoba.- Depart. de Acción Social.- 1994-10, 14 y 110.
- 16) *The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and other Laboratory Services.*- Oxoid Limited (London)- 3a. Ed. 1987-182.