

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 SNa_2 en la técnica usada en este caso. Es asimismo, inactivada por agentes oxidantes, como peróxidos y oxígeno, los cuales bloquearían los grupos $-SH-$.

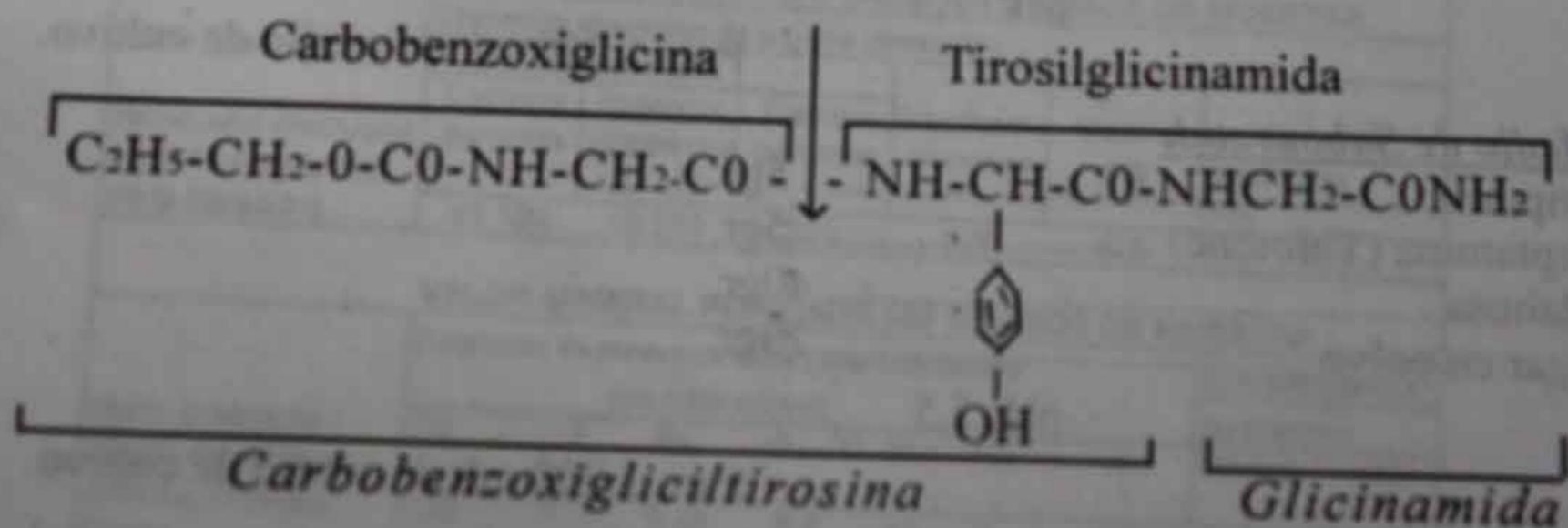
La papaína, es activa a un pH amplio, pero inestable a menos de 3 y más de 11.

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 Tirozilglicinamida ⁽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 tetragena	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 tetragena	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.