

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

PROF. DR. VICENTE CALLAO

Ars Pharm. VIII, 3-4 (1967)

Comparación de diversos métodos rápidos y sencillos en la investigación de la acción microbiana sobre los carbohidratos

por

A. Ramos, Rosa M.^a Díaz y V. Callao

La importancia que de las reacciones bioquímicas se deduce para la clasificación de las Bacterias en géneros y especies, hace que se incrementen las técnicas para abreviar y simplificar en la identificación microbiana. Ha sido numerosa la metódica expuesta en diferentes circunstancias concernientes a la investigación de cualquier tipo de enzima producido por los microorganismos. Según CLARCKE, P. H. y STEEL, K. J. (1966) los principales criterios que deben utilizarse en la elección de un nuevo procedimiento sencillo, son los siguientes: 1) que el medio de cultivo sirva para investigar varios enzimas simultáneamente; 2) que las pruebas se realicen en pocas horas, y 3) que el procedimiento elegido sea lo suficiente sencillo para aplicarse a gran número de cultivos. Entre los primeros que ensayaron un método rápido para investigar la formación de ácidos a partir de los azúcares merecen citarse a HANNAN, J. y WEAVER, R. H. (1948); técnica que fue modificada por MCDADE, J. J. y WEAVER, R. H. (1959). SANDERS et al. (1957) fueron los que sugirieron un procedimiento rápido de diagnóstico en placa. Este método es el recomendado por CLARCKE y STEEL (1966). En el presente trabajo realizamos un estudio de diversas modificaciones al anterior procedimiento.

MATERIAL Y METODOS

Medio de cultivo: Se han ensayado diferentes medios, que contenían distintos indicadores de viraje de pH; la composición del medio fue esencialmente la misma en todos los casos:

Peptona	2 g
ClNa	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	14 g
Agua destilada	1000 ml
Sol. preparada de indicador	20 ml

El pH final del medio se ajustaba a 7,3. Se distribuye en tubos de ensayo conteniendo 12 ml (para luego verter placas), esterilizando a 117° C. veinte minutos.

Se utilizaron tres medios diferentes de acuerdo con el indicador empleado; estos medios llevaban:

- Medio I: sol. indicadora de azul de bromotimol.
- Medio II: sol. indicadora de rojo neutro.
- Medio III: sol. indicadora de rojo fenol.

Carbohidratos ensayados: Hemos realizado experiencias con los siguientes: arabinosa, xilosa, ramnosa, fructosa, ga-

lactosa, glucosa, manosa, sorbosa, celobiosa, lactosa, maltosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa, rafinosa, inulina, salicina, adonitol, dulcitol, manitol, y sorbitol. Debido a la diferente solubilidad de los glúcidos objeto de estudio hemos preparado una disolución de los mismos de 0,2 g en 3 ml de agua destilada; de esta forma eran todos solubles a excepción de la salicina, que a pesar de ello se preparó en la misma conc. para operar en todos los casos en igualdad de condiciones.

Las soluciones se esterilizan por tinalización, y con ellas se impregnaban los discos de papel de filtro.

Discos: Nosotros utilizamos discos de un diámetro aproximado de 5,5 mm. Los preparamos con papel de millipore (de 0,5 micras de tamaño de poro) aunque creemos que pueden utilizarse papeles de filtro de otra marca o calidad.

Se impregnaban con soluciones de los distintos indicadores ensayados (azul bromotimol, rojo fenol y rojo neutro);

y otros discos se dejaban sin impregnar. Esterilizándolos al autoclave en el interior de tubos de ensayo. Antes de aplicarlos al medio de cultivo se humedecían en la solución del correspondiente azúcar; quedando en una concentración aproximada de unos 20 mg/disco.

Gérmenes: Se efectuaron experimentos con diversas cepas de Enterobacteriaceas, principalmente con *Klebsiella* y *Escherichia coli*, tipados serológicamente.

Resultados:

Debido a la amplitud en el número de gérmenes, y de azúcares ensayados: Hemos seleccionado los resultados más significativos, para evitar exponer numerosas tablas que apenas tuvieran suficiente validez; las tablas I y II, nos manifiestan el comportamiento de los tres medios indicando al mismo tiempo que se aprecian diferencias en positivities, de acuerdo con el microorganismo estudiado.

TABLA I

Valor comparativo de los tres medios ensayados frente a dos estirpes diferentes de *Klebsiella* (lectura a las 3 hr.)

Azúcar	Gérmén: Medio:	Klebsiella (4)			Klebsiella (5)		
		I	II	III	I	II	III
Glucosa		++	++	++	+	++	+ ⁺
Manita		++	++	++	+	++	++
Inosita		++	++	++	+	-	+
Sorbita		++	++	++	D	-	-

NOTA: El medio I lleva incorporada la sol. indicadora azul de bromotimol.
 El medio II la sol. de rojo neutro.
 El medio III la sol. de rojo fenol.
 ++ reacción muy positiva.
 + reacción positiva.
 D reacción dudosa.
 - reacción negativa.

TABLA II

Valor comparativo de los tres medios ensayados frente a dos estirpes diferentes de *Escherichia coli* (lectura a las 4 hr.)

Azúcar	Gérmén		E. coli (49)			E. coli (439)		
	Medio		I	II	III	I	II	III
Glucosa			++	++	++	—	+	++
Maltosa			+	—	+	++	+	+
Inosita			—	—	—	D	—	—
Dulcitol			+	D	+	—	D	+

En la tabla III exponemos el valor comparativo del empleo de los discos de celulosa impregnados con colorante o sin impregnar tal indicador. -

TABLA III

Valor comparativo utilizando discos con indicador, o sin indicador (lectura a las 4 hr.) Germen estudiado: Klebsiella

Azúcar	Medio I		Medio II		Medio III	
	c	s	c	s	c	s
Lactosa	++	+	++	D	++	+
Fucosa	D	D	D	D	+	D
Rafinosa	+	+	+	D	++	+
Sacarosa	++	+	+	+	++	+

c = discos impregnados con el mismo indicador que el del medio.

s = discos sin indicador (solo con el azúcar).

En la tabla IV, exponemos las diferencias apreciadas de operar con el mismo colorante indicador en el medio de cultivo, y disco; y las que se aprecian al utilizar diferentes colorantes en el medio de cultivo, y en el disco.

TABLA IV

Valor comparativo del empleo de discos impregnados del mismo o distinto colorante-indicador que el medio

Azúcar	Medio (I)			Medio (II)			Medio (III)		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
Glucosa	++	++	++	++	+	++	++	+	+
Galactosa	D	+	+	++	D	+	++	+	D
Melecitosa	D	D	+	+	—	D	++	D	D
Rafinosa	D	+	+	+	+	+	++	—	+

(1) Discos con azúcar impregnados con azul de bromotimol.

(2) Discos con rojo neutro.

(3) Discos con rojo fenol.

COMENTARIOS Y DISCUSION

En las cuatro tablas expuestas hemos procurado entresacar los resultados que creemos más significativos, y al final de las experiencias efectuadas podremos deducir el procedimiento que consideramos ideal entre todos los ensayados.

En las Tablas I y II, puede apreciarse como el buen funcionamiento del método depende no sólo del medio de cultivo, sino también de los gérmenes objeto de estudio; es muy importante para deducir una técnica acertada el ensayar el mayor número posible de microorganismos, pues en caso contrario se obtendrían falsas consecuencias. Puede apreciarse como el medio de cultivo más efectivo es el número III, aunque las diferencias fueran pequeñas en todos los casos, pues el hecho de que en la tabla aparezcan discrepancias no corresponde a la totalidad de los resultados, pues como anteriormente apuntamos solo hemos señalado los resultados más significativos. No obstante podemos concluir que los medios que mejor funcionan son el número III (con rojo fenol como indicador), y el I (con azul de bromotimol), siendo el menos efectivo el II (con rojo neutro como indicador).

Respecto al procedimiento en el que solo se utiliza indicador en el medio, y no en el disco; debemos señalar que no es totalmente eficiente, ya que el color blanco del disco de papel millipore junto con la ligerísima modificación del pH del medio hace que se dificulte la apreciación del viraje del medio, que a veces solo se verifica entre el medio y el disco; por esta circunstancia la observación resulta totalmente imprecisa, pues el viraje queda entorpecido (si no es muy intenso); mientras que si por el contrario el disco de papel va coloreado, aunque solo se produzca un ligero viraje entre el disco y el medio, este es fácil de apreciar, por el correspondiente viraje del disco. (Ver Tabla III).

También hemos trabajado en medios de cultivo desprovistos de indicador; sin embargo, aunque puedan ser utilizados en casos de una excesiva necesidad en la rapidez del método, no es conveniente su empleo por obtenerse mejores resultados con el empleo de indicador en el medio de cultivo.

En consecuencia, el método que consideramos ideal entre los ensayados es aquel que emplea como medio de cultivo el propuesto con el número III, es decir, con indicador de rojo fenol, operando con discos de papel de filtro millipore coloreados con solución alcalina de azul de bromotimol, e impregnados con los correspondientes azúcares; el viraje al amarillo nos evidencia la formación de ácidos. En aquellos otros casos en los que se emplean discos coloreados también se obtienen buenos resultados, con excepción de las técnicas en que se emplean colores distintos para el colorante y el medio capaces de interferir entre sí; como ejemplo el rojo neutro con el rojo fenol. El empleo de discos con el mismo indicador que el que existe en el medio de cultivo, da muy buenos resultados, pero inferiores a los que se obtienen cuando los indicadores son distintos (excepción hecha, de los casos en que se produzca interferencia).

El método propuesto como ideal, tiene sus ventajas e inconvenientes. Como principales inconvenientes podemos mencionar:

- 1) El que se requieran aproximadamente 24 horas para obtener una lectura completa, ya que previamente debe realizarse una incubación masiva en la placa en la que posteriormente realizaremos la investigación.
- 2) El método solo aprecia la formación de ácidos, y no la de gases.

Las ventajas del mismo son: 1) la facilidad de operar frente a numerosos azúcares al mismo tiempo, lo que simplifica dificultades y operaciones de otros procedimientos; 2) la sencillez en la preparación del método, por el cual podemos disponer de los discos impregnados del colorante, así como de las soluciones de azúcares, totalmente estables, lo que permite su empleo en cualquier circunstancia; 3) la posibilidad de apreciar no sólo la formación de ácidos, sino también la utilización de los azúcares, ya que al difundir estos en el medio si el germen los utiliza, aparece como un halo de mayor crecimiento alrededor del disco.

Sobrepesadas las ventajas e inconvenientes, podemos deducir la validez del método, en la investigación rápida

de la acción microbiana sobre los carbohidratos.

RESUMEN

Se estudian comparativamente las ventajas e inconvenientes de diferentes métodos rápidos empleados en la investigación de la acción microbiana sobre los carbohidratos. El procedimiento ideal es el que emplea un medio de cultivo con rojo fenol, y discos impregnados con la solución del azúcar e indicador de azul de bromofenol a pH alcalino.

SUMMARY

Comparativa a study is made of the advantages and disadvantages of different rapid methods applied to the investigation of the action of microorganisms on carbohydrates. The ideal procedure is the one which uses a culture medium with phenol red and paper disks impregnated with the sugar solution and bromophenol blue indicator at alkaline pH.

BIBLIOGRAFIA

- CLARCKE, P. H. y STEEL, K. J. (1966). "Rapid and simple biochemical tests for Bacterial identification". Pág. 111, en "Identification Methods for Microbiologists". Academic Press. London.
- HANNAN, J. y WEAVER, R. H. (1948). "Quick microtechniques for the identification of cultures. II Fermentations". J. Lab. Clin. Med. 33, 1338.
- MCDADE, J. J. y WEAVER, R. H. (1959). "Rapid methods for the detection of carbohydrate fermentation". J. Bact. 77, 65.
- SANDERS, A. C., FABER, J. E. y COOK, T. M. (1957). "A rapid methods for the characterization of enteric pathogen using paper discs". Appl. Microbiol. 5, 36.

Granada, Marzo 1967.