

El agar de hígado glucosado para el aislamiento del *Lactobacillus bulgaricus*

POR S. SORIANO

En el curso de unos ensayos efectuados con el objeto de verificar la presencia del *Lactobacillus acidophilus* MORO en la flora intestinal de los niños, y habiendo obtenido muy buenos resultados utilizando en su aislamiento el agar de hígado glucosado aconsejado por J. C. TORREY (1), se nos ha presentado la ocasión de comprobar la posible utilidad de ese mismo medio en el aislamiento de otro microorganismo del mismo género: el *Lactobacillus bulgaricus* (GRIGOROFF) (= *Bacillus bulgaricus* o *Bacterium bulgaricum*), utilizado frecuentemente en la preparación de leches ácidas.

Es bien sabido que el *Lactobacillus bulgaricus* presenta mal desarrollo en los medios de cultivo comunes a base de carne (o no desarrolla del todo), y que cultiva relativamente bien en presencia de glucosa o lactosa, y mejor aun en los medios preparados a base de leche. El medio más apropiado para su desarrollo es la misma leche, que, a temperatura conveniente acidifica con gran actividad coagulándola rápidamente dentro de las 18 a 24 horas.

Para el aislamiento de este organismo, así como para los demás representantes de su grupo, se han aconsejado varios medios de cultivo, entre los cuales pueden citarse como los más corrientes la *gelatina* y *gelosa de suero de leche peptonada*, las mismas *de leche digerida* (digestión ácida con pepsina), o bien *de caseína digerida* adicionada de un azúcar, y en fin los medios de cultivo a base de *caldo de levadura autolisada* con adición también de un azúcar asimilable.

Aunque estos medios de cultivo aconsejados sucesivamente por distin-

(1) Véase bibliografía al final.

tos autores pueden ser muy favorables para el desarrollo de los *lactobacilos*, y la divulgación de otro medio más no tendría otro fin sino alargar su lista y aumentar, cuando llega el caso, las dificultades de elección de alguno de ellos, creemos, sin embargo que no será del todo inútil mencionar el excelente resultado obtenido en el aislamiento y cultivo del *Lactobacillus bulgaricus* empleando el agar de hígado glucosado de TORREY, especialmente por su facilidad de preparación, comparativamente a la dificultad que presentan algunas de las operaciones en los demás medios de cultivo citados (difícil clarificación del suero de leche, digestión de la caseína, autólisis de la levadura).

La preparación del medio (que podrá encontrarse en detalle en la publicación original de TORREY), es bien sencilla y se asemeja a la de un agar común glucosado en el cual se emplea hígado en lugar de carnaza. Damos a continuación los datos más importantes :

Se comienza por preparar un caldo de hígado, utilizando medio kilogramo de hígado (de vaca o de ternera, cortado en trozos pequeños o mejor pasado por máquina de picar), que se mezcla con un litro de agua destilada y se calienta en autoclave a 100° durante cerca de dos horas ; se filtra por un lienzo (apretándolo al final para hacer escurrir todo el caldo), y luego por algodón ; al filtrado se agregan 10 gramos de peptona y 20 gramos de agar y se calienta en autoclave sin presión durante una hora ; después de entibiar se arregla la reacción hasta $+3$ o $+4$ ácida a la fenolftaleína ; luego se filtra (clarificando si es necesario) y se agrega en fin al filtrado 10 gramos de glucosa y un gramo de fosfato de potasio (monofosfato o dipotásico).

Para ajustar la reacción a $+3$ ácido, se procede en la forma siguiente : Se toman 10 cc. del líquido a dosificar que se disuelven en agua destilada (tratándose de agar, el agua debe previamente entibiarse), neutralizándose en seguida cuidadosamente con solución n/10 de NaOH, usando fenolftaleína como indicador, y llegando hasta una débil coloración rosada persistente (es conveniente repetir la operación una segunda vez y utilizar la media de ambas determinaciones). El número de centímetros cúbicos de NaOH n/10 empleados, multiplicado por 10, da el número de cc. de solución n/1 de NaOH que debieran emplearse para hacer 1000 cc. del líquido neutros a la fenolftaleína.

La expresión $+3$ ácido significa : 3 cc. de un ácido n/1 en 100 cc. del líquido neutro (es decir, 30 cc. por litro), de modo que si en la titulación encontramos que para neutralizar el medio necesitamos agregar, por ejemplo 40 cc. de NaOH n/1 por litro, y puesto que luego debemos acidificar con 30 cc. de un ácido n/1, nos bastará entonces agregar únicamente 10 cc. de la solución n/1 de NaOH. Si en cambio, la cantidad de NaOH n/1 calculada es menor que 30 cc. por litro, entonces agre-

garemos directamente la cantidad de ácido que resulta por diferencia.

Siendo preferible, por numerosas razones, emplear medios de cultivo en los cuales no se conozca la acidez de titulación (como acabamos de ver), sino la acidez actual, es decir, la acidez dada por la concentración de iones H libres, sería conveniente entonces preparar el medio con un pH determinado, más bien bajo, favorable al desarrollo de los *Lactobacilos* (1). A este respecto mencionaremos que con una acidez de titulación de + 3,5 (empleando ácido acético), hemos obtenido, en este medio de cultivo, una acidez actual expresada por un pH alrededor de 6.

Usando el *agar de hígado glucosado*, se ha obtenido también (contrariamente a lo que esperábamos por tratarse de un medio bastante azucarado y por la acidez) una vitalidad del *Lactobacillus bulgaricus* mayor que en leche, resultando que, cultivos sembrados en estría al ser transplantados a leche después de un mes de envejecimiento la han coagulado en 24 a 48 horas, mientras que los cultivos conservados en leche, de la misma edad, resultan estériles, siendo aún difícil en algunos casos recuperarlos de tubos de leche de 15 días. Esta conservación de la vitalidad del *Lactobacillus bulgaricus* en el *agar de hígado glucosado* requiere una más detallada verificación, por lo cual nos contentamos simplemente con mencionarla.

Agradecemos al doctor A. SORDELLI su gentileza al permitirnos reproducir las microfotografías adjuntas, tomadas para la colección del Museo del Instituto Bacteriológico Argentino.

Noviembre 24 de 1926.

BIBLIOGRAFIA

CANNON, P. R., *A biological study of aciduric bacteria*, en *Journal of infection diseases*, página 227, 1924.

COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC (SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS) en *Manual of methods of pure culture study of bacteria*. 4ª edición. Geneva. New York, 1923.

HUNTER, C. A., *A preliminary report of media for the cultivation of the lactobacillus group*, en *Abstracts of bacteriology*, VIII, número 1, 1924.

KULP, W. L., and RETTGER, L. F., *A comparative study of Lactobacillus acidophilus* (MORO) and *Lactobacillus bulgaricus* MASSOL, en *Journal of bacteriology*, IX, página 357, 1924.

RAHE, A. H., *The classification of the aciduric bacteria*, en *Journal of bacteriology*, III, página 407, 1918.

TORREY, J. C., *New differential plating method for B. bifidus* (TISSIER) and *B. acidophilus* (MORO). en *Journal of bacteriology*, II, página 435, 1917.

(1) Para obtener un medio de cultivo con un pH deseado, consúltese el *Manual of methods of pure culture study of bacteria* de la *Society of american bacteriologists*.

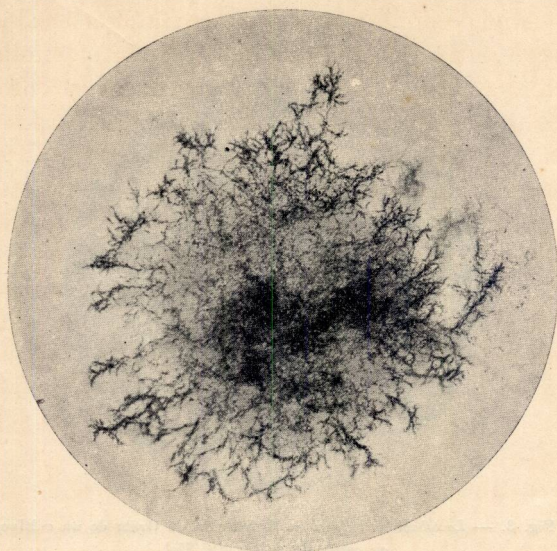


Fig. 1. — Colonia profunda de *Lactobacillus bulgaricus* en agar de hígado glucosado
(Aumento 20 diámetros)

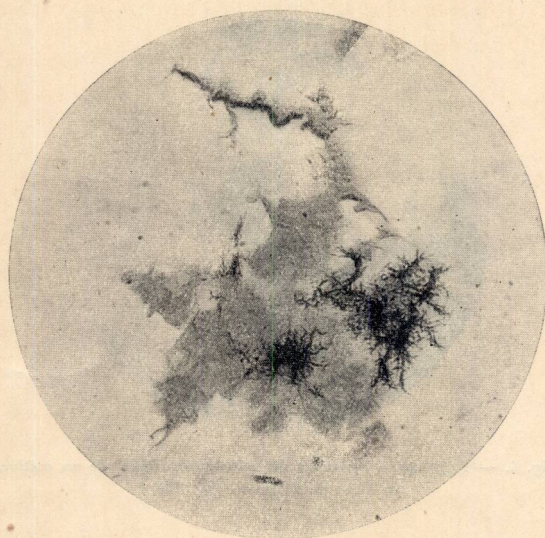


Fig. 2. — Colonia superficial en el mismo medio de cultivo
(Las porciones más negras son profundas.) (X 30)

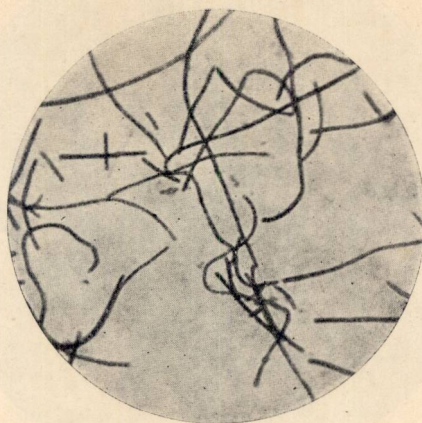


Fig. 3. — *Lactobacillus bulgaricus*. Coloración de Gram de un cultivo en estria de 2 días. ($\times 850$)

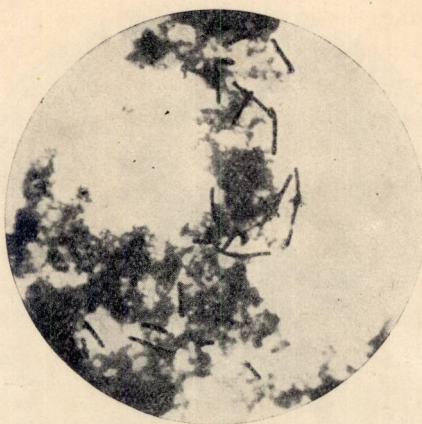


Fig. 4. — Preparación coloreada del mismo organismo, de un cultivo en leche de 24 horas. ($\times 850$)