

BAM - Medio para seleccionar colonias de enterobacterias ⁽¹⁾

J. J. MONTEVERDE, C. A. HERMIDA, N. MORÁN y D. H. SIMEONE (*)

(Recibido: 14 de diciembre, 1967)

RESUMEN

Se dan a conocer los detalles sobre composición y preparación del medio semisólido "Buenos Aires modificado" (BAM) que contiene urea, lactosa e indicadores de Andrade y azul de timol. BAM permite revelar en cultivos bacterianos, la hidrólisis de urea por producción de álcali, de lactosa por formación de ácidos y gases, producción de indol, SH₂, apreciación directa de la movilidad y además posibilidad de obtener material para reacciones serológicas. Este medio se recomienda para diferenciar bacterias pertenecientes a los grupos *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, y *Providencia*.

SUMMARY

A semisolid culture media is proposed: "Buenos Aires modificado" (BAM) containing urea, lactose and both Andrade's and thymol blue indicators for *Enterobacteriaceae* selection.

The single-tube BAM media detects: hydrolisis of urea by alkali production, hydrolisis of lactose by acid or acid and gas, indole and hydrogen sulfide production, motility and gives a bacterial growth useful for serological tests.

BAM media is recommended for the differentiation of: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* and *Providencia* groups.

(1) Realizado en la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Cátedra de Microbiología. (Plan 117 C.A.F.P.T.A.).

(*) Profesor Titular Regular, Ayudante Segundo, Jefe de Trabajos Prácticos y Profesor Asociado Regular, respectivamente.

El empleo de un medio semisólido con lactosa, urea e indicadores de Andrade y azul de timol, también llamado medio "Buenos Aires" (BA), fue recomendado (MONTEVERDE, 1948) para seleccionar colonias sospechosas de pertenecer a los géneros *Shigella* y *Salmonella*. El comportamiento del BA fue comparado frente a los medios de Sosa, Surraco-Pereyra, Krumwiede, Hajna y Russell, propuestos para propósitos similares.

ARAUJO COSTA y SOLÉ VERNIN (1955), hallaron al BA superior a los medios de Krumwiede-Korn, Kligler, Triple-Sugar Iron-Agar (TSI), Singer, Surraco-Pereyra, Zía, Chao-Chin y Bader-Kotz, proponiendo el agregado de sacarosa y señalando la posibilidad de obtener información sobre producción de SH_2 e indol, como así también obtener desarrollo bacteriano para pruebas serológicas. En otra publicación (MONTEVERDE, y col. 1963) se consideraron las modificaciones anteriores señalándose que no se traducían en ventajas prácticas.

RAPPAPORT y col. (1956) recomendaron un medio sólido diferencial UMAGIS, que permite revelar ataque a urea, manita, producción de indol y SH_2 pudiéndose emplear el desarrollo bacteriano para reacciones serológicas; este medio tiene similitudes con BAM en sus fundamentos y propósitos, aspectos que serán considerados más adelante.

El presente trabajo se refiere a los cambios introducidos al medio BA que permiten determinar con una sola siembra: movilidad, hidrólisis de urea, hidrólisis de lactosa con formación de ácido o ácido y gas, producción de in-

dol y de SH_2 . El nuevo medio, "Buenos Aires Modificado" (BAM), ha sido aplicado en la diferenciación de los grupos que componen la familia *Enterobacteriaceae* (EWING, 1966), a saber: *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Providencia*.

PARTE EXPERIMENTAL

La conocida dificultad para investigar indol en cultivos bacterianos desarrollados en medios que contienen un hidrato de carbono por ellos atacado, dio motivo a varios ensayos. Los experimentos realizados permitieron llegar a la siguiente fórmula:

| | |
|------------------------------|--------|
| Peptona (2) | 2,0 g |
| Urea | 1,0 g |
| Lactosa | 0,3 g |
| Indicador de Andrade (*) | 1,5 ml |
| Indicador azul de timol (**) | 0,3 ml |
| Agar | 0,3 g |
| Agua destilada | 100 ml |

pH 6,8

| | |
|--------------------|----------------|
| (*) Fucsina ácida | 0,25 g |
| Na OH/N | 16 ml (aprox.) |
| Agua destilada | 100 ml |
| (**) Azul de timol | 1,6 g |
| Na OH/0,1 N | 34,4 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

Preparación del medio

Por razones prácticas se cumple en dos etapas, A y B.

| | |
|----------------|---------|
| A: Peptona | 2 g |
| Agar | 0,3 g |
| Agua destilada | 93,2 ml |

(2) Ver Control de aptitud de los componentes.

Se tratan los componentes por calentamiento hasta disolución; se deja enfriar a 20°C y se ajusta el pH a 6,8 ± 0,1; se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Si se presentaran precipitados pueden eliminarse filtrando por papel u otro agente similar, para obtener un medio adecuadamente transparente. Si se hace esto último se vuelve a esterilizar, ahora a 115°C durante 15 minutos.

B: (3)

| | |
|-------------------------------------|--------|
| (1) Solución acuosa de urea | |
| 50 % | 2,0 ml |
| (2) Indicador de Andrade | 1,5 ml |
| (3) Solución de azul de timol | 0,3 ml |
| (4) Solución acuosa de lactosa 10 % | 3,0 ml |

Al volumen total de A, previamente fundido y luego enfriado a 70°C ± 10°C, se agregan asépticamente (1), (2), (3) y (4) mezclando bien. En este momento y estando el medio homogéneamente en fase líquida, se puede fraccionar en tubos estériles de 10 x 100 mm, a razón de 4 ml en cada uno. Los tubos se llevan en posición vertical a B.M. a 80°C durante 10 minutos para eliminar eventuales burbujas de aire, enfriándolos luego rápidamente.

Una vez hecho esto el medio se encuentra en condiciones para ser sembrado o para su conservación en heladera (aprox. 4°C). Si el tiempo de conservación se estima en más de 20 días,

(3): (1), (2), (3) son autoestériles después de 24 horas a temperatura ambiente; (4) se puede esterilizar agregando exceso de cloroformo y agitando repetidas veces o por filtración. La solución B completa es autoestéril luego de 48 horas a temperatura ambiente.

conviene mantener los tubos cerrados de manera que se evite la evaporación y/o contaminación. Las posibilidades de conservación se aumentan considerablemente manteniendo por separado A y B en continentes adecuadamente obturados.

Los sucesivos tratamientos térmicos pueden ocasionar transitorios cambios en el color del medio que no afectan finalmente su tonalidad normal (pajizo-verdoso).

Al modo de preparación indicado se le pueden introducir distintas variantes, siempre que no se altere la proporción y calidad de los ingredientes y se tenga en cuenta la labilidad térmica de alguno de ellos (urea, indicador de Andrade), debiendo prestarse especial atención al control ulterior de diferenciación.

Controles

a) Control de aptitud de los componentes.

Su resultado estará dado por la comparación de las lecturas correspondientes al control de diferenciación, con las propiedades bioquímicas conocidas de las especies a probar.

No debe descartarse que el contenido en triptofano de la peptona en uso sea insuficiente, como para que los cultivos exhiban sus propiedades indológenas. En caso de requerirse el agregado de triptofano, la prueba se conducirá sobre BAM con distintas concentraciones del aminoácido; para ello se puede preparar en cinco frascos, el medio con sus componentes para 100 ml pero contenidos en 98 ml, para agregar estérilmente 2 ml de diferentes soluciones acuosas estériles de triptofano a cada frasco a fin de obtener un gradiente

decreciente, a partir de una concentración del 1 %. El control biológico correspondiente dará indicación acerca de la concentración que debe agregarse para corregir la peptona.

Con respecto a la producción de SH_2 también es necesario realizar un control previo de la peptona a emplear. Algunas peptonas contienen azufre en cantidad suficiente como para permitir una producción de SH_2 detectable en los papeles reactivos, en el lapso de 24 horas a 37°C , por parte de aquellos gérmenes que normalmente lo producen.

Si la peptona es deficiente, se puede realizar un ensayo similar al señalado en el caso del triptofano, agregándose en este caso monoclóhidrato de cisteína, en gradiente decreciente, a partir de una solución acuosa estéril al 0,5 %.

Debe tenerse en cuenta que un exceso de azufre puede dar lugar a que, especies tenidas como no productoras, aparezcan ennegreciendo los papeles reactivos para SH_2 .

En el caso de que una peptona haga aparecer falsos productores de SH_2 (*E. coli*, *Klebsiella sp.*) lo aconsejable es no emplearla en la preparación del BAM.

Las pruebas anteriormente citadas deben efectuarse manteniendo constante la concentración de lactosa (Difco); aun cuando con el hidrato de carbono no se han tenido problemas, en el caso de que ello ocurriera se podrían subsanar de modo similar al indicado para la peptona.

La peptona a usar debe posibilitar la obtención de suficiente desarrollo, en el lapso de 24 hs- 37°C , como para hacer evidenciables las propiedades bioquímicas antedichas. Eventualmente el déficit

de nutrientes de una peptona puede ser corregido mediante el agregado de apropiada cantidad de suero estéril.

La experiencia recogida con el uso de BAM ha demostrado que "Bacto Tryptone" (4) reúne los requisitos como para aconsejar su empleo en la preparación de este medio.

Si el indicador de Andrade es repetidamente esterilizado por calentamiento, pierde sensibilidad; su rendimiento también puede verse afectado por sustancias reductoras producidas por acción bacteriana sobre ciertas peptonas cuyo uso debe evitarse. El medio calentado tiene un color rojizo que debe volver al pajizo verdoso una vez enfriado.

Con respecto al agar se emplea en fibra, de muy buena calidad, lavado durante 24 horas en agua corriente y finalmente enjuagado 3 veces en agua destilada y secado.

b) Control de diferenciación:

Cada partida de medio se controla incubando a 37°C un tubo sin sembrar y otros sembrados separadamente con *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serratia*; eventualmente puede agregarse *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, etc. Las siembras se efectúan por punción lateral, colocándose luego las tirillas de papel para determinación de SH_2 e indol. Los resultados observados deben concordar con los señalados en los cuadros 1, 2 y 3.

Investigación de SH_2 : Se realiza por medio de papeles embebidos en solución sobresaturada de subacetato de plomo.

(4) Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan.

El ennegrecimiento de su extremo es manifiesto en los cultivos productores de SH₂.

Investigación del indol: Se efectúa según una variante desarrollada por uno de los autores (HERMIDA, 1967), que consiste en introducir una tirilla de papel de filtro (estéril), sin ningún agregado previo, en el interior de un tubo ya sembrado, junto a la tira para SH₂. El revelado de las tiras para detección de indol se realiza luego de la incubación, por medio de una gota de reactivo de Ehrlich o de Kovacs, apareciendo color lila en los cultivos indológenos. Las tiras correspondientes a los cultivos negativos quedan amarillas.

Interpretación de resultados

Cuando la siembra se efectúa a partir de bacterias Gram negativas de morfología típica, de cultivos puros o de aislamientos sobre medios selectivos, a las 24 hs.-37°C los resultados posibilitan

la orientación dentro de los grupos que componen la familia *Enterobacteriaceae*.

La prolongación de la incubación hasta 96 horas favorece la aparición de cambios en el color del medio que ayudan en la caracterización de componentes de los grupos *Shigella*, *Arizona*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Serratia*; con respecto a los 4 últimos grupos algunos atacan urea además de lactosa.

El ataque a lactosa se aprecia con nitidez principalmente en las primeras 24 horas de incubación, con aparición de viraje al rojo; a veces esto solo se observa en el tercio inferior, pudiendo a las 48, 72 ó 96 horas producirse viraje al verde o verde-azulado en los grupos que además de lactosa, hidrolizan urea (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Serratia*).

Los cuadros 1, 2 y 3 sintetizan los datos que aporta la siembra de BAM en relación con la identificación de *Enterobacteriaceae*.

CONSIDERACIONES

El medio BAM es básicamente el medio BA al que se le han introducido los cambios necesarios para que, en una siembra, sea posible investigar además de SH_2 e indol, movilidad, ataque a la urea y producción de ácido o ácido y gas de lactosa; existe además la posibilidad de utilizarlo con agregado de sacarosa y también de obtener por centrifugación material antigénico para pruebas serológicas.

El concepto de "represión catabólica" sobre la síntesis de triptofanasa (BEGGS, y col. 1965) es el fundamento de la modificación del medio BA tendiente a posibilitar la producción de indol.

Con este fin se buscó una concentración de lactosa cuya hidrólisis fuese revelable por viraje del indicador de Andrade y cuyos productos catabólicos dejaran de inhibir la síntesis de triptofanasa en un lapso menor de 24 horas. Se obtuvo así indicación de hidrólisis del hidrato de carbono y de producción de indol en 24 horas (inóculo en fase logarítmica), usando una concentración de lactosa Difco de 0,3 % p.v. La disminución de la intensidad del viraje ácido fue compensada aumentando la cantidad de indicador de Andrade hasta 1,5 % v.v.

La investigación de indol según la variante recomendada (HERMIDA, 1967) tiene una serie de ventajas que son señaladas en dicho trabajo.

Cuando se siembran bacterias del género *Proteus* este medio permite revelar precozmente los indolígenos, pero la producción de SH_2 no es posible apreciarla sino después de 72 horas. Esto

puede ser de interés cuando la búsqueda va dirigida a la identificación de enterobacterias ureolíticas. En este caso una alternativa sería realizar, previo subcultivo, la detección de SH_2 por métodos clásicos. Ensayos que estamos efectuando indican que al disminuir la concentración de urea al 0,5 % p.v. se puede obtener en 24 horas indicación de su ataque y al mismo tiempo la producción de SH_2 .

Lo expuesto implica que en este tipo de medio es necesario efectuar en la fórmula básica aquellos cambios indispensables para que la diferenciación responda a lo esperado, teniendo en cuenta la variable calidad con que se presentan comercialmente algunos de sus componentes y la compleja interrelación de los procesos bioquímicos que tienen lugar en ellos por acción bacteriana.

El empleo de BAM adicionado con sacarosa, fue realizado comparativamente con BA en una investigación de salmonelas en carnes y ganglios linfáticos equinos (5). Se estudiaron 800 colonias sospechosas aisladas en medio *Shigella-Salmonella* (SS), a las 24 horas se eliminaron con ambos medios, por viraje azul o rojo 380 colonias. En BA se presentaron 420 colonias sospechosas, lo que obligó a su estudio bioquímico preliminar; con BAM fueron eliminadas 360 de estas 420 colonias, lo cual significó el ahorro de 3240 tubos conteniendo distintos medios de cultivo; fue evidente entonces la rapidez diagnóstica, la disminución del trabajo y un apreciable ahorro de materiales.

(5) Trabajo en ejecución en la Cátedra de Microbiología (Escuela Veterinaria). Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad de Buenos Aires (1967).

Sobre las 60 colonias separadas por BAM, 27 pertenecían al grupo *Salmonella* por confirmación bioquímica y serológica. Los 33 cultivos restantes se eliminaron aplicando las pruebas adicionales que van más adelante y que permiten mayores ajustes, ya que tanto BAM como otros medios similares sólo posibilitan aproximaciones en el diagnóstico de grupos bacterianos.

La inicial confusión entre *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, esta última de frecuente hallazgo en microbiología entérica, se puede eliminar parcialmente con BAM, puesto que *Ps. aeruginosa* no produce SH₂; *Alcaligenes* por proteólisis, puede lentamente virar el medio al verde; la confusión entre *Vibrio* y algunas *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Providencia* es posible, especialmente cuando la población no proviene de agar SS.

En las primeras 24 horas y aun antes, BAM permite identificar *E. coli*, *P. mirabilis* y *P. vulgaris*; a veces en 24-48 horas facilita ubicar *K. pneumoniae*, *C. freundii* y *E. tarda*, es decir que permite definir especies bacterianas.

Cuando dentro de los grupos de *Enterobacteriaceae* se requieren nuevas diferenciaciones recomendamos un primer grupo de reacciones: KCN, malonato, glucosa, rafinosa e inosita y luego, si es necesario, un segundo grupo: ramno-

sa, sorbita, maltosa y agar Christensen; en esta forma pueden diferenciarse, entre otros a *Salmonella* de Arizona, *Providencia* de *Alcaligenes*, *Enterobacter* de *Serratia* y *Enterobacter* entre sí.

Se insiste en la necesidad de que la siembra del medio se haga a partir de colonias purificadas; los reisolamientos efectuados a partir de medios selectivos (SS) no revelaron contaminaciones sino en escasas oportunidades.

BAM une a su relativa facilidad de preparación un apreciable tiempo de conservación en heladera y una clara y rápida apreciación de los resultados.

Dado que en su oportunidad BA fue cotejado con varios medios similares, queda por considerar BAM en relación con UMAGIS (RAPPAPORT y col. 1956). Este último no revela movilidad y no posee la claridad dada por el uso de dos indicadores, por otra parte la manita no posee el mismo valor diferencial que la lactosa en enterobacterias y además no es acertado el criterio de los autores en la separación de grupos patógenos y apatógenos en base a los cambios observados en el medio. UMAGIS por último puede conducir a confusión entre *Salmonella* y *Shigella* con *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAUJO COSTA, G. e SOLE VERNIN, C. *Sobre una modificação do meio de Monteverde*. Memorias do Inst. O. Cruz, Rio de Janeiro, 1955, 1. 106-114.
- BEGGS, W. H. and LICHSTEIN, H. C. *Repression of tryptophanase synthesis in E. coli*. J. Bact., 1965, 89. 996-1004.
- EWING, W. H. *Enterobacteriaceae taxonomy and nomenclature*. Nat. Communicable Dis. Center; Atlanta, Georgia, 1966, 1-23.
- HERMIDA, C. A. *Variante para la detección de indol en cultivos bacterianos*. IV Jornadas Fac. de C. Vet. de La Plata, Rep. Argentina, 1967 (En prensa).
- MONTEVERDE, J. J. *Medio de cultivo semisólido con lactosa, urea y doble indicador para seleccionar salmonetas y shigelas*. La Semana Médica, Bs. As., 1948, 55. 846-848.
- MONTEVERDE, J. J. y FAUQUER, A. *Diagnóstico de Enterobacterias*. I) Medio de cultivo para la selección de colonias. Univ. Bs. As. Fac. Agr. y Vet. Cát. de Microbiol. Bol. Especial N° 3, 1963, 1-12.
- RAPPAPORT, F., STARK, G. J. and KONFORTI, N. *UMAGIS medium. A medium for single tube differentiation of enteric bacteria*. App. Microbiol., 1956, 4. 157-161.