

## MICROBIOLOGÍA, ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS

### MEDIOS DE CULTIVO ALTERNATIVOS PARA EL DESARROLLO DE DISTINTAS MICOBACTERIAS.

ROMERO, Magali<sup>1</sup>; ALVARADO PINEDO, Fiorella<sup>2</sup>; DI PAOLO, Adrian<sup>2</sup>; PERALTA, Luis<sup>2</sup>; FERNANDEZ, Martin<sup>3</sup>; MOYANO, Roberto<sup>4</sup>; SANTANGELO, María<sup>5</sup>; TRAVERÍA, Gabriel<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Becaria de estudio de la CIC. Buenos Aires. Argentina. CEDIVE.

<sup>2</sup> CEDIVE. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP. Alvear y Salta (7139). Chascomús.

<sup>3</sup> Becario de entrenamiento de la Facultad de Cs. Veterinarias, UNLP.

<sup>4</sup> Becario de CONICET. Buenos Aires. Argentina. INTA Castelar.

<sup>5</sup> Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA. Los Reseros y Las Cabañas, 1712 Castelar, Argentina. Correo de contacto: magaliandrea.romero@yahoo.com.ar

#### INTRODUCCIÓN

Las micobacterias son bacilos Gram positivos y ácido alcohol resistentes; algunas de ellas se definen como medio ambientales, no patógenas y otras generan enfermedad en animales, humanos o ambos. La técnica diagnóstica considerada de oro es el cultivo bacteriológico, donde se utilizan distintos medios para determinar características fenotípicas de las colonias como su tamaño, color, rugosidad y su velocidad de crecimiento. Esta técnica es laboriosa y complicada debido a que, entre otros factores, estas bacterias son muy exigentes para su crecimiento y desarrollo. A los laboratorios que realizan el diagnóstico de enfermedades producidas por micobacterias les podría ser de utilidad contar con un cepario de micobacterias ambientales, ya que éstas se pueden utilizar para aumentar la especificidad de otras técnicas diagnósticas, como las serológicas. El objetivo de este trabajo es utilizar distintos medios de cultivo para el crecimiento de dos micobacterias ambientales (*Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium smegmatis*) y una patógena (*Mycobacterium avium* subsp *avium*).

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se prepararon 4 medios de cultivo que fueron sembrados en distintos momentos. A partir del protocolo de elaboración del medio Lowenstein Jensen se realizaron las siguientes modificaciones: por un lado, el agregado de agar al 1,5% (de aquí en adelante M1) el cual fue fraccionado en tubos de vidrio de 1,8 cm de diámetro por 10 cm, colocando aproximadamente 12 ml de medio en cada uno, para el crecimiento de *M. phlei*. Para el crecimiento de esta cepa, además se probó la elaboración de un medio de carácter bifásico (M2), donde se utilizó como fase sólida a M1 pero sin harina de papa y con el aumento del pH mediante la sustitución del fosfato de potasio monobásico por el fosfato de sodio dibásico, quedando regulado en 7. Este medio se autoclavó en botellas de Roux dejándolos inclinados para que solidifique de esa manera. Una vez sólido se agregó el caldo, el cual se preparó con los siguientes ingredientes: 320 ml de agua destilada; 0,077 gr. de fosfato disódico; 0,05 gr. de sulfato de magnesio; 0,12 gr. de citrato de magnesio; 0,72 gr. de asparragina; 2,8 ml de glicerina.

Por otro lado se probó la utilización de un medio de cultivo deficiente en hierro con el fin de recuperar micobactina, el sideróforo liposoluble producido por estas bacterias. Así, se usó la receta del medio de cultivo desarrollado por Hall y Ratledge (1982), (de aquí en adelante M3), fraccionado en tubos inclinados para que se forme el pico de flauta, donde se sembró *M. phlei*, *M. smegmatis* y *M. avium* subsp *avium*.

Posteriormente se utilizó esta receta como base para la parte sólida de un medio bifásico (M4) con menos proporción de agar (1,5%); el caldo se preparó con los mismos ingredientes que el

sólido pero sin el agregado de agar. En este último medio de cultivo se sembraron las mismas cepas que en M3.

Todos los medios sembrados fueron incubados en estufa a 37°C. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos hasta 2 meses de incubación.

## RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos en el crecimiento en la siguiente tabla:

Cepas	Medios de cultivo											
	M1			M2			M3			M4		
	3 días	7 días	>10 días	3 días	7 días	>10 días	3 días	7 días	>10 días	3 días	7 días	>10 días
<i>Mycobacterium Phlei</i>	+	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>avium</i>	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	+	++	+++	+	+	++

Referencias. (-) no hubo desarrollo; (+) escaso desarrollo; (++) moderado desarrollo; (+++) abundante desarrollo; (S/S) sin sembrar.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*M. smegmatis* sólo se sembró en los medios 3 y 4 (deficientes en hierro) mostrando un muy buen desarrollo en ambos medios. Esta cepa fue utilizada para la extracción de micobactina, requerida para el crecimiento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* que requiere del agregado de micobactina en el medio de cultivo.

*M. phlei* fue sembrado en los 4 medios; en los medios 3 y 4 (medios deficientes en hierro y otros nutrientes) no hubo desarrollo. Por el contrario en los medios 1 y 2 su desarrollo fue muy bueno, destacándose en el medio 2 (bifásico), el cual se probó como una alternativa para obtener mayor masa somática. El propósito de utilizar este medio fue lograr que las bacterias comiencen su crecimiento en la fase sólida y luego pueda expandirse a la fase líquida. Esta cepa es utilizada para la pre-adsorción de sueros utilizados en diferentes métodos diagnósticos.

Por último, *M. avium* subsp *avium* fue sembrado en los medios 3 y 4 y si bien su crecimiento fue escaso en ambos, desarrolló mejor en el medio 3. De esta manera logramos desarrollar un medio bifásico adecuado para el desarrollo de una micobacteria de crecimiento lento, visualizándose crecimiento desde el tercer día de inoculación.

Estos hallazgos nos podrían ayudar a mejorar los medios de cultivo normalmente utilizados, teniendo la prudencia de hacer otros ensayos para corroborar la veracidad de los resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- GORDON R; SMITH M. Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. J Bacteriol. 1953; 66(1):41-48.
- BERNARDELLI A. Manual de procedimientos de SENASA, clasificación fenotípica de las micobacterias. 2007. 1-63. Disponible: <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1443-mlab.pdf>.
- HALL R; RATLEDGE C. A simple method for the production of mycobactin, the lipid-soluble siderophore, from mycobacteria. FEMS Microbiology Letters 1982; 15: 133-136.