

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

## Evaluación del Agar Azul Bromotimol Lactosa introducido en BioCen con cepas de referencia

### Assessment of Agar Blue Bromotimol Lactose introduced in BioCen using reference strains

**Maikel Fausto Villegas Blanco**

Investigador. Licenciado en Biología. Aspirante a Investigador. Centro Nacional de Biopreparados, La Habana. Cuba.

---

#### RESUMEN

**OBJETIVO:** exponer los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas a los medios de cultivo Agar azul bromotimol lactosa producido en BioCen, Cuba, y el comercializado por la Merck, Alemania, destinado para la diferenciación de microorganismos especialmente las enterobacterias, por su capacidad de fermentar la lactosa.

**MÉTODOS:** se ensayaron un total de 13 cepas certificadas y una aislada de muestra de agua, pertenecientes al Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo (BioCen).

**RESULTADOS:** las cepas evaluadas en ambos productos mostraron similitud en cuanto a su respuesta y a las características morfológicas de las colonias. Los valores del índice relativo de crecimiento (IRC) para 10 cepas superaron el 90 %, resultando el 71,5 % del total, mientras que solo 4 cepas reflejaron valores inferiores, resultando el 28,5 % del total. Todas las cepas sobrepasaron el valor recomendado (> 70 %), además las características culturales desarrolladas respondían a las reportadas.

**CONCLUSIONES:** los resultados alcanzados en la determinación del IRC demuestran la buena calidad del medio producido en BioCen frente a cepas de referencia, tomando como criterio el hecho de que todos los microorganismos ensayados mostraron valores del IRC superiores al valor recomendado.

**Palabras clave:** Agar azul bromotimol lactosa, enterobacterias, fermentación.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** to show results obtained in evaluations performed in agar blue bromotimol lactose culture media produced in BioCen, Cuba, and that marketed by Merck, Germany, created for microorganism differentiation, specially the Enterobacter ones, due to its ability for lactose fermentation. **METHODS:** we assayed a total of 13 certified strains and another isolated from water sample, from Research Department of Culture Media (BeioCen).

**RESULTS:** values of Growing Relative Index for 10 strains were above 90 %, with 71,5% of total, while that only 4 strains showed lower values to a 28,5 % of total. All strains exceeded the recommended value (>70%).

**CONCLUSIONS:** strains evaluated in both products showed similarity as regard its response and to morphologic features of colonies.

**Key words:** Agar blue Bromotimol lactose, Enterobacter, fermentation.

---

## INTRODUCCIÓN

Como grupo, las enterobacterias son las responsables de una tercera parte de los aislamientos en las bacteriemias, de dos tercios de los aislados en gastroenteritis y de tres cuartas partes de los aislamientos en infecciones del tracto urinario.<sup>1</sup> La infección por este grupo está muy relacionada con la infección hospitalaria ya que están muy difundidas, tanto entre los pacientes como en el ambiente hospitalario.<sup>2</sup>

El uso de la lactosa para detectar su fermentación por determinados microorganismos, ha sido uno de los pasos más representativos en la formulación de medios de cultivo destinados a la diferenciación de enterobacterias, ya que la degradación de este carbohidrato a ácido con el consecuente viraje en el color del indicador utilizado, es una característica compartida por muchos representantes de este grupo. El agar azul bromotimol lactosa es muy útil para el aislamiento, enumeración e identificación de *E. coli* y coliformes a partir de muestras de bebidas y muestras de alimentos<sup>3</sup>. Proporciona una satisfactoria diferenciación morfológica de las colonias con características diagnósticas claras. Por tal motivo el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) ha desempeñado un papel esencial en las investigaciones desarrolladas para la producción de diagnosticadores en nuestro país y especialmente para la red nacional de salud pública. Por estas razones el objetivo principal del presente trabajo consistió en la evaluación comparativa del desempeño entre los medios agar azul bromotimol lactosa de BioCen y Merck, con cepas microbianas de colección, American Type Culture Collection (ATCC).

## MÉTODOS

En el estudio se utilizaron 13 cepas de referencia (ATCC) y 1 cepa aislada de muestra de agua: *Aeromonas* sp. (aislada), *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus avium* ATCC 14025, *Enterobacter cancerogenus* ATCC 33241, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157:H7

ATCC 35150, *Klebsiella oxytoca* ATCC 43863, *Morganella morganii* ATCC 9886, *Proteus inconstans* ATCC 9886, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia rubidae* ATCC 27593, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus xylosus* ATCC 29970.

Se utilizaron los medios de cultivos agar azul bromotimol lactosa (BioCen, lotes 6010000, 6020000, 6030000) y (Merck, lote VM 556739609).

Los cultivos microbianos fueron estandarizados a una concentración bacteriana de 50 % de transmitancia, se utilizó un espectrofotómetro (Ultrospec 2000. C130017), se realizó la lectura a 580 nm. A partir de esta concentración se prepararon diluciones seriadas hasta lograr  $3,0 \times 10^2$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitros) correspondiente a la dilución  $10^{-6}$ . Se inocularon 0,2 mL de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de cada microorganismo ( $n=2$ ), en placas que contenían los 3 lotes de BioCen y el medio control Merck. Se adicionó el inóculo en el centro de la placa y a continuación se distribuyó lo más homogéneamente posible por toda la superficie del medio con ayuda de la espátula de Drigalsky. Finalmente, se procedió a la incubación de las placas a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  durante 18 a 24 h.

Para determinar el Índice Relativo de Crecimiento (IRC) en el agar azul bromotimol lactosa, BioCen, se utilizó la siguiente ecuación: <sup>4</sup>

$$\text{IRC} = (\text{NCE} / \text{NCC}) * 100$$

$$\text{NC} = ? C / (n_1 + 0,1 n_2) * d$$

Donde:

IRC: índice relativo del crecimiento.

NC: número total de UFC en todas las placas.

NCE: número total de UFC del medio experimental en todas las placas.

NCC: número total de UFC del medio control en todas las placas.

100: coeficiente para expresar el resultado en porcentaje.

C: sumatoria de UFC en todas las placas.

$n_1$ : número de placas en la primera dilución.

$n_2$ : número de placas en la segunda dilución.

d : la menor dilución utilizada para el cálculo.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete de programas GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

## RESULTADOS

Los ensayos de los medios de cultivo pertenecientes a las dos firmas frente a diversas cepas de colección arrojaron resultados satisfactorios, al observarse las características culturales esperadas en cada una de las especies bacterianas y mantener las mismas un desarrollo similar en ambos productos.

Las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* 0157:H7 ATCC 35150 se caracterizaron por la presencia de colonias amarillas, con diámetro de 1-2 mm, convexas, centro oscuro y bordes claros. Similar color de las colonias desarrollaron las cepas de *C. amalonaticus* ATCC 25405, *C. freundii* ATCC 8090, *E. avium* ATCC14025, *K. oxytoca* ATCC 43863, *S. rubidaea* ATCC 27593 y *S. xyloso* ATCC 29970. La cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 manifestó un crecimiento diferente, representada por colonias azules, de diámetro < 2 mm, convexas, bordes regulares. Similar respuesta experimentaron *Aeromonas* sp., *E. cancerogenus* ATCC 33241, *M. morganii* ATCC 25830, *P. inconstans* ATCC 9886 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Se estableció una comparación entre el agar azul bromotimol lactosa de BioCen (lote 1, 2, 3) y Merck (control) relacionando el recuento de las colonias para cada duplicado de placas por lotes (Fig. 1).

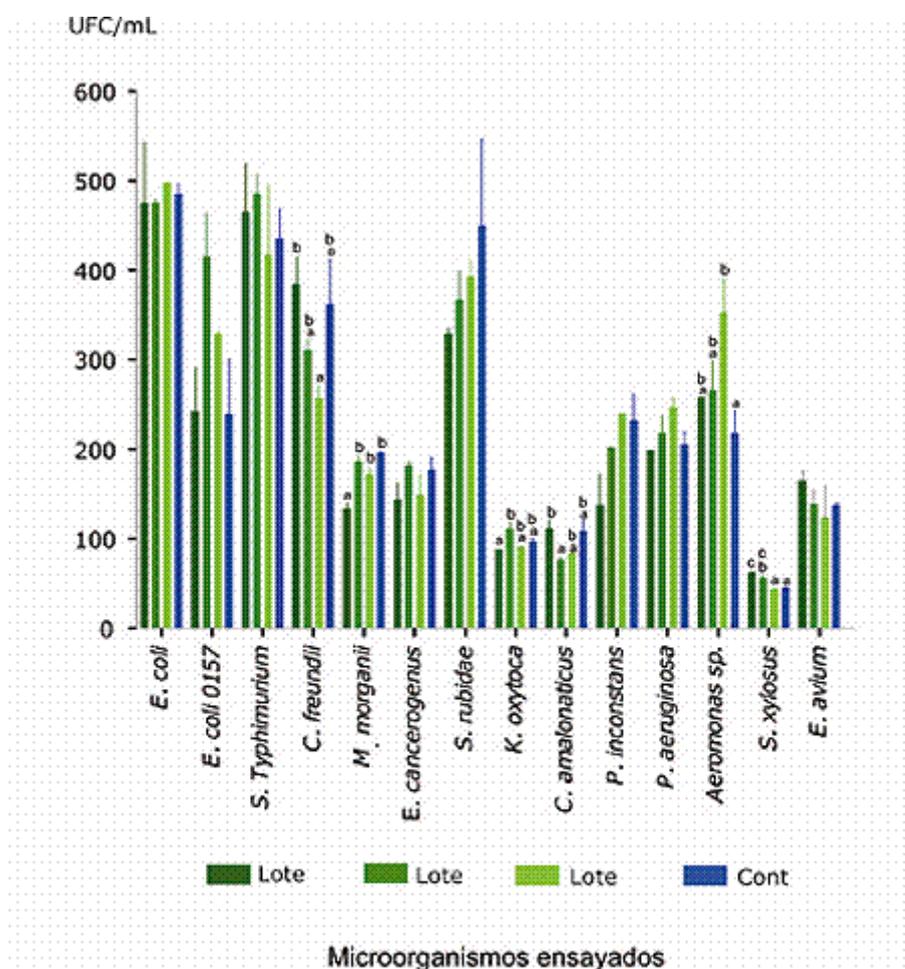


Fig. 1. Crecimiento de cepas de referencia en los lotes del medio de cultivo agar azul bromotimol lactosa (BioCen y Merck).  
a, b, c - rangos en la prueba Duncan de rangos múltiples (grupos homogéneos).

Algunas cepas certificadas mostraron diferencias significativas (\*) ( $p < 0,05$ ) al realizar el análisis estadístico. Tal es el caso de *Aeromonas* sp. (lote 3-control\*); *C. amalonaticus* ATCC 25405 (lote 1-lote 2\*); *M. morganii* ATCC 25830 (lote 1-

control\*, lote 1-lote 2\*, lote 1- lote 3\*); *K. oxytoca* ATCC 43863 (lote 1-lote 2\*); *C. freundii* ATCC 8090 (lote 1-lote 3\*); *S. xyloso* ATCC 14028 (lote 1-control\*, lote 1- lote 3\*, lote 2- lote 3\*).

Se deben añadir los resultados observados en la Fig. 2, donde se puede distinguir que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al evaluar los promedios de los tres lotes del producto de BioCen con su similar de Merck, teniendo en cuenta el recuento de las colonias.

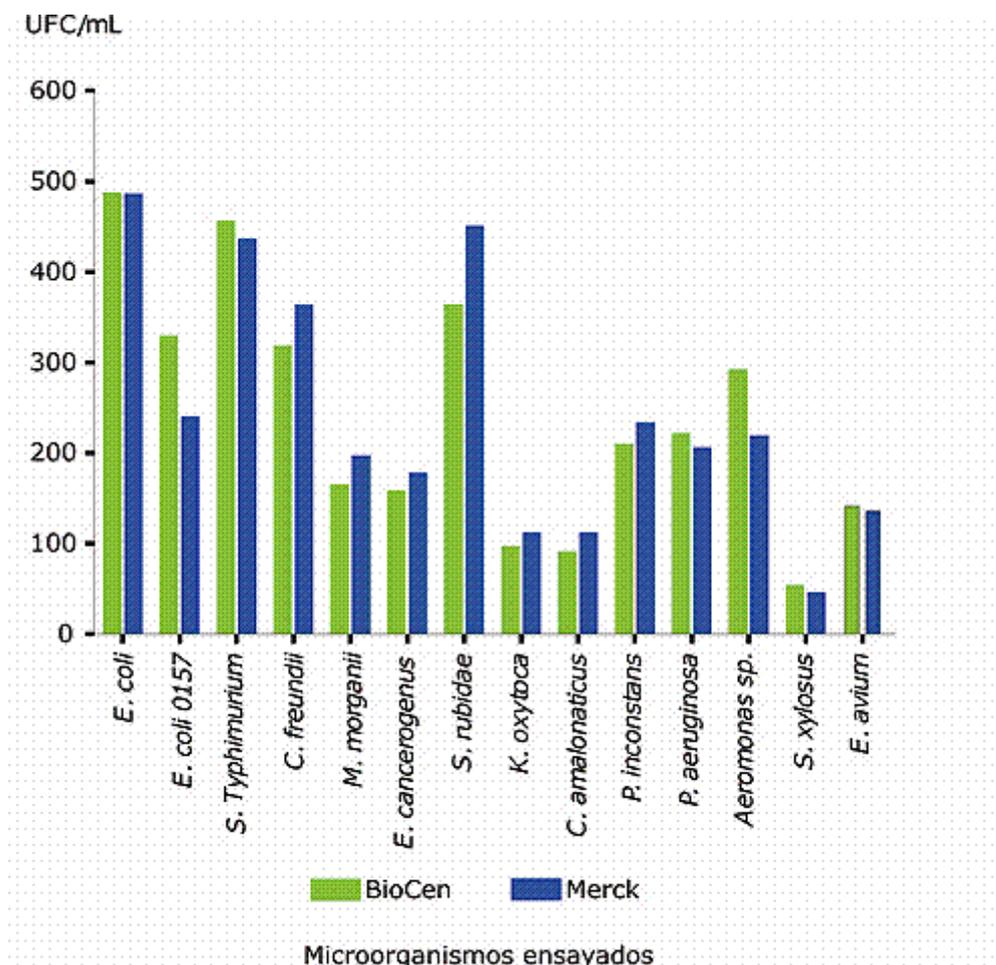


Fig. 2. Promedio del crecimiento de cepas de referencia en los medios de cultivo agar azul bromotimol lactosa (BioCen y Merck).

La determinación del IRC arrojó resultados aceptables, teniendo en cuenta el comportamiento reflejado en la Fig. 3. Donde la mayoría de los microorganismos involucrados en este parámetro (*Aeromonas sp.* aislada, *C. freundii* ATCC 8090, *E. avium* ATCC14025, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157: H7 ATCC 35150, *K. oxytoca* ATCC 43863, *P. inconstans* ATCC 9886, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. xyloso* ATCC 29970) sobrepasaron el 90 % de IRC, representaron el 71,4 % del total. Para el resto de los microorganismos (28,6 %) *M. morganii* ATCC 25830, *E. cancerogenus* ATCC 33241, *C. amalonaticus* ATCC 25405 y *S. rubidaea* ATCC 27593, los valores de este indicador resultaron inferiores al 90%.

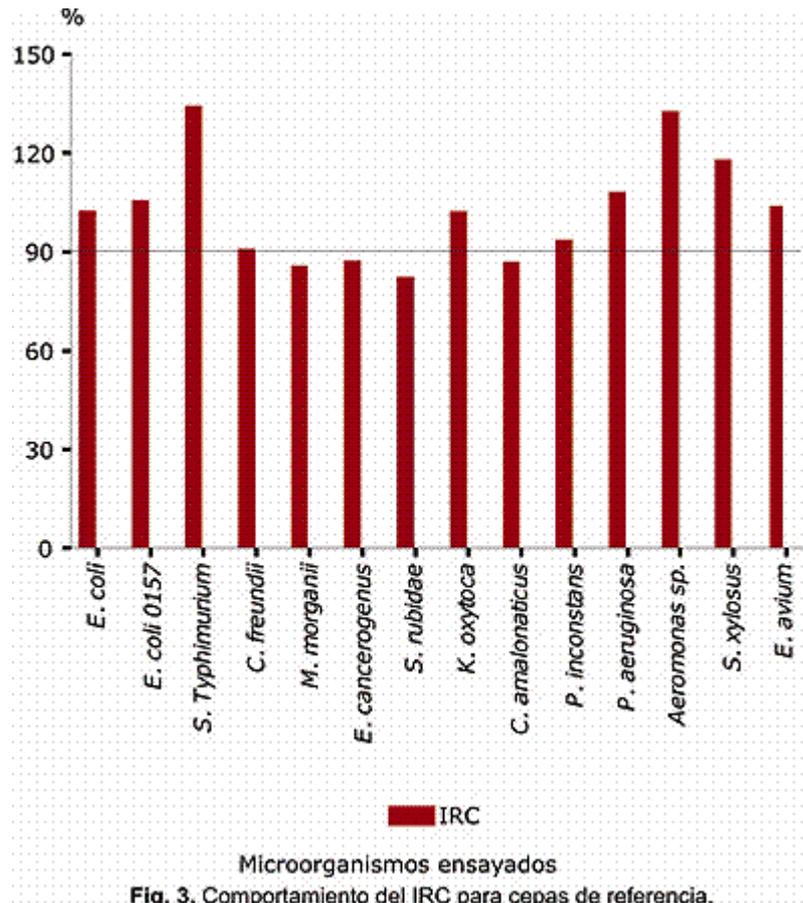


Fig. 3. Comportamiento del IRC para cepas de referencia.

En la [Tabla 1](#) se presentan los resultados de la derminación del IRC para todas las cepas ensayadas en el trabajo.

Tabla 1. Resultados del IRC para las cepas de referencia ensayadas

Cepas de referencia	IRC (%)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	102
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	105
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	133,7
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	90,3
<i>Morganella morganii</i> ATCC 9886	85,2
<i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 33241	86,7
<i>Serratia rubidae</i> ATCC 27593	81,9
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43863	101,8
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 25405	86,4
<i>Proteus inconstans</i> ATCC 9886	93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	107,7
<i>Aeromonas sp.</i> (aislada)	132,1
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29970	117,4
<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025	104,1

## DISCUSIÓN

Las características cromógenas que desarrollaron *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157:H7 ATCC 35150, *C. amalonaticus* ATCC 25405, *C. freundii* ATCC 8090, *E. avium* ATCC14025, *K. oxytoca* ATCC 43863, *S. rubidaea* ATCC 27593 y *S. xylosus* ATCC 29970 demuestran la utilización de la lactosa presente en ambos medios con el consecuente viraje del indicador azul de bromotimol, incorporado igualmente en la formulación, hacia el color amarillo. Mientras que el resultado obtenido con el resto de las cepas controles, responde a la incapacidad de escindir el enlace glucosídico presente en el disacárido para formar productos ácidos, por lo que el microorganismo metabolizó las bases nutritivas existentes en el medio, provocando el viraje del indicador hacia el color azul. Estos resultados coinciden con las especificaciones microbiológicas del agar azul bromotimol lactosa (Merck) así como con sus características cromógenas, donde se reporta color amarillo para cepas lactosa positivas y color azul en el caso de cepas lactosa negativas<sup>3</sup>. El medio C.L.E.D recomendado para la separación, enumeración e identificación de patógenos urinarios sobre la base de la fermentación de lactosa, con formulación muy similar al agar azul bromotimol lactosa, permite el desarrollo de color amarillo en colonias que fermentan lactosa y color azul en colonias que carecen de este metabolismo.<sup>3,5</sup>

El hecho de que *Aeromonas* sp (aislada), *M. morganii* ATCC 8090 y *S. xylosus* ATCC 29970 mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre al menos un lote de BioCen y el control Merck, al comparar ambos productos, teniendo en cuenta el recuento de colonias pudiera tener su base en la baja precisión de las técnicas microbiológicas que son sujetas a una variedad de fuentes de error que incluyen los errores de muestreo, de dilución, de siembra, de distribución del inóculo y del cálculo.<sup>6</sup> Sin embargo estas cepas representan el 42 % del total de cepas ensayadas y solo 3 microorganismos mostraron diferencias entre un lote y el control. Es la primera vez que en nuestro Centro se realiza una comparación con cepas certificadas utilizando diferentes firmas de fabricación del agar azul bromotimol lactosa, los resultados alcanzados no presentan antecedentes y pudieran ser preliminares para la utilización de este medio de cultivo en análisis de urocultivos en laboratorios clínicos de salud pública, teniendo la ausencia de inhibidores en el diagnosticador.

Los resultados analizados mostraron la semejanza de los medios considerando las características culturales, y el número de colonias desarrolladas, estableciéndose el buen funcionamiento del medio agar azul bromotimol lactosa obtenido en BioCen frente a las cepas de colección.

Los resultados alcanzados en la determinación del IRC demuestran la buena calidad del medio producido en BioCen frente a cepas de referencia, tomando como criterio el hecho de que todos los microorganismos ensayados mostraron valores del IRC superiores al valor recomendado (70 %),<sup>7</sup> y las características culturales desarrolladas respondían a las reportadas. Además se realizó la comparación con una firma que goza de gran prestigio internacional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eisenstein BI. Enterobacteriaceae. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. Principles and Practice of Infections Diseases. 3th ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.
2. Eisenstein BI. Diseases caused by Gram-negative enteric bacilli. In: Isselbacher KJ, Braubwald E, Wilson JD, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AJ, et al, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 13<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill; 1994. p. 661-9.
3. Merck Microbiology Manual. 12<sup>th</sup> ed. Alemania: 2005;79-209.
4. ISO 4833. INTERNATIONAL STANDARD. Microbiology-General guidance for the enumeration of microorganism - Colony Technique at 30 °C. 1991. p. 5-7.
5. Health Protection Agency. Identification of Enterobacteriaceae. National Standard Method BSOP ID 16 Issue 2. 2007; 9. Disponible en: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/>
6. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. Culture Media for Microbiology. Vol 34. Netherlands: Elsevier; 1995. p. 1-23.
7. Culture Media Special Interest Group Australian Society for Microbiology. Guidelines for Assuring Quallity of Food and Water Microbiological Culture Media. Australia, 2004.

Recibido: 17 de febrero de 2008.

Aprobado: 2 de octubre de 2008.

Lic. *Maikel Fausto Villegas Blanco*. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen)  
Apartado 6048. Tel: (53-47)-682201. Ext.1208 y 1215. Fax: (5347)-682850.  
Habana 6, Cuba. E -mail: [villegas@biocen.cu](mailto:villegas@biocen.cu)