

Diseño de un medio de cultivo a base de peptonas vegetales para el cultivo de *Clostridium chauvoei*

Design of a medium based on vegetable peptones for the culture of *Clostridium chauvoei*

Janeth Arias-Palacios,^I Astrid Isaza-Pérez,^I Daniel Martínez-Acosta,^{II}

^IFacultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

^{II}Empresa de Productos Veterinarios, VECOL S. A. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Objetivo: se diseñó un medio de cultivo a base de peptonas vegetales para la producción de biomasa de *Clostridium chauvoei*.

Métodos: se seleccionaron nueve peptonas vegetales y dos caldos con peptona vegetal para sustituir la peptona de origen animal en el medio *Clostridium* modificado. Se desarrolló una fermentación relacionada con la producción de masa celular, verificando la absorbancia y el porcentaje de transmitancia (%T), la segunda etapa involucró los ensayos de patogenicidad, determinando el título de DL₅₀.

Resultados. Las peptonas vegetales 1-B, 8-M, 10-M, 11-M fueron seleccionadas por presentar un % T cercano al del medio *Clostridium* modificado. Luego se realizó una prueba de letalidad (DL₅₀) en cobayos. Los cultivos con estas peptonas vegetales presentaron DL₅₀ entre diluciones 10⁻⁸ y 10⁻⁹, en contraste con los cultivos realizados con el medio control que fue de 10^{6.5}.

Conclusiones: las peptonas vegetales 1-B, 8-M, 10-M y 11-M favorecieron la producción de biomasa de *Clostridium chauvoei* a pH 8,2. Las peptonas vegetales probadas mostraron una letalidad mayor comparada con la del medio base.

Palabras clave: biomasa, *Clostridium chauvoei*, medio de cultivo, peptonas vegetales.

ABSTRACT

Objective: a culture medium based on vegetable peptones was designed for the production of *Clostridium chauvoei* biomass.

Methods: nine vegetable peptones and two vegetable peptone broths were selected to substitute animal peptone in the modified *Clostridium* medium. A fermentation process was developed which was related to the production of cell mass, and absorbance and transmittance percentage (%T) were verified. The second stage included pathogenicity assays to determine LD₅₀ titers.

Results: vegetable peptones 1-B, 8-M, 10-M, 11-M were selected, for their % T was close to that of the modified *Clostridium* medium. A lethality test (LD₅₀) was then performed on guinea pigs. Cultures with these vegetable peptones presented LD₅₀ between 10⁻⁸ and 10⁻⁹ dilutions, in contrast to the 10^{6.5} obtained in cultures with the control medium.

Conclusions: vegetable peptones 1-B, 8-M, 10-M and 11-M stimulated the production of *Clostridium chauvoei* biomass at pH 8.2. The vegetable peptones tested showed greater lethality than the base medium.

Key words: biomass, *Clostridium chauvoei*, culture medium, vegetable peptones.

INTRODUCCIÓN

Clostridium chauvoei es un bacilo grampositivo anoxigénico que forma endosporas y produce 4 toxinas; alfa (á), beta (â), gamma (ã) y delta (ä), un factor edema y una neuraminidasa. Esta especie es el agente causal del carbunco sintomático o gangrena enfisematosa, la cual consiste en una miositis enfisematosa necrosante, que afecta por lo general a bovinos y ovinos, y, en ocasiones, a cabras y búfalos. Se caracteriza por producir ácido acético, butírico y fórmico; butanol, CO₂ y H₂, y crecer en medios de cultivo líquidos y sólidos, que le proveen una fuente de carbono y de nitrógeno que satisfacen los requerimientos nutricionales y ambientales del microorganismo.¹

En el presente trabajo de investigación se diseñó un medio de cultivo a base de peptonas vegetales para la producción de *Clostridium chauvoei*, utilizable en producción de vacunas, con la finalidad de reemplazar las peptonas de origen animal; dada la incidencia de la partícula priónica, agente causal de la encefalopatía esponjiforme bovina (enfermedad de las «vacas locas», en las materias primas derivadas de la carne. Para eliminar tal riesgo, la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, VECOL S.A. ha investigado materias primas de origen vegetal para la elaboración de medios de cultivo que garanticen la obtención de productos biológicos de alta calidad, que no sean considerados un riesgo para la salud humana y animal.

MÉTODOS

Cepa bacteriana

Se empleó la cepa de *Clostridium chauvoei*, la cual se obtuvo del cepario de microorganismos existentes en la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, VECOL S.A. Las cepas se conservaron en una solución criopreservante v/v a 70 °C en medio reforzado modificado, en una solución de glicerol (solución fisiológica estéril 50:50, en cantidades de 1 mL de semilla) 1 mL de solución criopreservante, en viales.

Elaboración del semillero de trabajo

Las semillas matrices de *Clostridium chauvoei* fueron reactivadas previamente a 37 °C por 5 minutos. Se preparó 1L de medio *Clostridium* modificado a pH 7,3, (g/L: proteosa peptona, 20; extracto de levadura, 5; sulfato de magnesio heptahidratado, 1,5; fosfato dipotásico, 5; glucosa, 5; l-cistina, 0,75; pH 7,3), los cuales se dividieron de la manera siguiente: se adicionó 32 mL de medio a ocho tubos plántulas estériles, 9 mL a tres tubos tapa rosca estériles y 400 mL del mismo medio en fermentador estéril. A cada tubo plántula se le adicionó 8 mL de cepa para completar un volumen final de 40 mL, a cada tubo tapa rosca se le adicionó 1 mL de cepa para completar un volumen de 10 mL y al fermentador se le adicionaron 100 mL de cepa para completar un volumen de 500 mL.

Los cultivos en tubos plántulas y en el fermentador se trabajaron a una concentración del 20% (v/v) de semilla, y los cultivos en tubo se trabajaron a una concentración del 10 % (v/v) de semilla. Los cultivos realizados en tubos plántulas y tapa rosca se depositaron en campana de anaerobiosis con sistema anaeróbico; por el contrario, al fermentador se le realizó una inyección de gases, que contenía 5,0 % (v/v) de CO₂, 10,1 % (v/v), de H₂ y 8,5 % (v/v) de N₂, para proporcionar condiciones anaerobias. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 48 h.

Verificación de la pureza de la cepa de Clostridium chauvoei y determinación de la concentración de semilla de trabajo

Se verificó la pureza y las características fenotípicas de la cepa de *Clostridium chauvoei*, mediante el cultivo en Agar sangre, las cajas se incubaron a 37 °C durante 48 h, en ambientes de anaerobiosis y aerobiosis. A las colonias obtenidas en anaerobiosis, se les caracterizó macroscópicamente y microscópicamente (tinción de Gram y esporos).

Para verificar las características bioquímicas de la cepa se empleó el API 20A (BioMérieux). Finalmente, se realizó una prueba de inmunofluorescencia directa con anticuerpos conjugados con fluoresceína (αAntisuero policlonal anti-*Clostridium chauvoei* conjugado con isotiocianato de fluoresceína de origen bovino, VMRD, Inc.) a extendidos procedentes del banco de trabajo.²

Selección de peptonas vegetales y diseño de medios de cultivo

Para la selección de las peptonas vegetales se realizó una revisión de literatura,³ para verificar los requisitos y especificaciones nutricionales. Así, nueve peptonas vegetales se seleccionaron y se diseñaron los medios teniendo como base el medio *Clostridium* modificado (g/L: proteosa peptona, 20; extracto de levadura, 5; sulfato de magnesio heptahidratado, 1,5; fosfato dipotásico, 5; glucosa, 5; l-cistina, 0,75; pH 7,3) reemplazando la peptona animal (proteosa peptona) de este medio por las respectivas peptonas vegetales. Asimismo se ensayaron dos caldos ya formulados, el

vegetable peptone broth (pH 7,1) y el *vegetable peptone phosphate broth* (pH 7,3), a estos se les adicionó 0,75 g/L de L- cistina, para reducir el oxígeno presente en el mismo.⁴

Para obtener el dato de la cantidad de peptona vegetal (g/L) necesaria para el crecimiento del microorganismo en los medios de cultivo diseñados, se decidió investigar los siguientes parámetros; el porcentaje de nitrógeno total y pH. Para la peptona animal, proteosa peptona, utilizada en el medio *Clostridium* modificado se tuvieron en cuenta estos parámetros como referencia para las demás peptonas, conociendo previamente la cantidad en gramos en el medio base, se denominó *peptona de referencia* (PR) y las peptonas vegetales, fueron denominadas como *peptonas evaluadas* (PE). Por lo tanto, se relacionaron los datos de porcentaje de nitrógeno total y cantidad en gramos de la peptona animal con el porcentaje de nitrógeno total de la proteína vegetal en la ecuación siguiente:

$$(m. TN_2\%)_{PE} = (m. TN_2\%)_{PR}$$

donde:

m = masa de la peptona (g); *TN₂ %* = porcentaje total de nitrógeno.

Por otro lado, los valores de pH (6,5-7,2 +/- 2) fueron tenidos en cuenta al momento de adaptar las peptonas al medio base como parámetro de referencia para la estabilidad de estas en solución, así como parámetro importante en la selección del valor de pH final de los medios diseñado. De acuerdo con este valor de pH, al valor de pH óptimo de crecimiento de los clostridios y al valor de pH del medio modificado con peptona animal, se eligieron tres datos de pH: pH 7,0, pH 7,3 y pH 8,2.

Las cantidades de los demás componentes del medio base (carbohidratos, sales minerales y agente reductor) no fueron modificadas.

Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de los nueve medios de cultivo, inicialmente se dispuso de 100 mL de cada uno de los medios para realizar los cultivos en tubos tapa rosca y finalmente se prepararon 200 mL de cada medio para realizar los cultivos en fermentador. Los componentes se disolvieron en agua milliQ (0,182 MWcm) con agitación constante excepto la l-cistina, la cual se disolvió en NaOH (1 N). Se ajustó el pH de los medios (7,3, 7,0 y 8,2) y se esterilizaron mediante filtración (0,22 mm). Se realizó control de esterilidad dejando los medios de cultivo a 37 °C por 24 h.

Se prepararon además, los caldos ya formulados con peptona vegetal *vegetable peptone broth* y *vegetable peptone phosphate broth* para ser probados con *Clostridium chauvoei*, a estos se les adicionó l-cistina a la misma cantidad y se le realizó el ajuste a los valores de pH correspondientes. Se esterilizaron mediante calor húmedo (autoclave).

Prueba de estabilidad y determinación del pH de trabajo

Los medios diseñados con las nueve peptonas vegetales, así como los caldos formulados se sometieron a una temperatura de 37 °C por 5 días, con el objeto de determinar la estabilidad de las materias primas, mediante observación, verificando la integridad del aspecto del medio.

Los medios que no evidenciaron ningún cambio o irregularidad en la estabilidad de sus materias primas, fueron inoculados con *Clostridium chauvoei* y de acuerdo con la mayor cantidad de biomasa generada, se seleccionó el mejor valor de pH para los subsecuentes cultivos.

Selección de medios de cultivo y determinación de la producción de biomasa

Para determinar el mejor medio de cultivo a base de peptonas vegetales; se realizó la siembra de *Clostridium chauvoei* en cada uno de los medios con las nueve peptonas vegetales, en los caldos a base de peptonas y en el medio *Clostridium* modificado (medio base).

Se trabajó un volumen de 50 mL por cada medio suplementado con la adición de las peptonas, los cultivos fueron incubados en anaerobiosis a 37 °C por 48 h. Se trabajó un volumen de 200 mL en fermentador de los medios que produjeron la mayor cantidad de biomasa; a estos se les adicionó la mezcla de gases para dar condiciones de anaerobiosis y se incubaron a 37 °C por 48 h. Las siembras se realizaron por triplicado. Todos los cultivos se manejaron a una concentración de semilla de trabajo del 10% (v/v) y sin agitación.

Cumplido el período de incubación, se tomó una muestra de 10 mL de cada cultivo para realizar las pruebas de esterilidad y determinar la producción de biomasa. La producción de biomasa se evaluó mediante densidad óptica, estableciéndose el valor de absorbancia y el porcentaje de transmitancia, de los diferentes medios de cultivos optimizados a una longitud de onda de 540 nm (UNICAM UV/VIS 8625 Spectrometer USA).⁵

Prueba de letalidad en cobayos

Para verificar la capacidad patogénica de los cultivos seleccionados en este estudio, se realizó la prueba en cobayos exocriados, de 350 450 g de peso (grupos de cuatro cobayos por dilución), a los cuales se les inoculó 0,5 mL por vía intramuscular de cada una de las diluciones en base 10 (10^{-3} a 10^{-9}) preparadas a partir de 1 mL del cultivo de *Clostridium chauvoei* en los medios optimizados y 9 mL de CaCl₂ 5% estéril a 4 °C. La prueba se realizó por triplicado. Los cobayos se observaron durante 72 h y se registró a diario la mortalidad o supervivencia para determinar la DL₅₀. Los cálculos se realizaron por el método estadístico Reed-Muench.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de tres réplicas de ensayos independientes, se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y el *test* de Tukey con ayuda del programa estadístico SAS Versión 6,02.

RESULTADOS

Identificación de Clostridium chauvoei y determinación de la concentración de semilla de trabajo

Las cepas de *Clostridium chauvoei* se observaron bacilos grampositivos pleomórficos, algunos esporulados, las células son completamente variables en apariencia, algunas de ellas son definitivamente hinchadas, muchas de ellas muestran desigual coloración.

Sus colonias en agar sangre se observaron pequeñas, planas y transparentes u opacas, de bordes irregulares con actividad b hemolítica.

En las pruebas bioquímicas se reveló principalmente la hidrólisis de la gelatina, fermentación de la glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Lo anterior permitió confirmar que estos microorganismos pertenecen al género *Clostridium* especie *chauvoei*.

Con respecto a la determinación de la cantidad semilla, la cantidad de biomasa determinada por el porcentaje de transmitancia, que fue de 1,4 % y 1,6 %, no fue significativo entre los cultivos, en ambos el microorganismo dispuso de los nutrientes adecuados para su crecimiento y metabolismo, sin embargo al 10% (v/v) de semilla se reducía la cantidad de medio y de la misma; por lo tanto los cultivos siguientes se trabajaron a esta concentración de semilla.

Diseño de medios de cultivo

Las nueve peptonas vegetales (PE) seleccionadas, y sus concentraciones de nitrógeno total fueron relacionados con el valor en % (P/V) de nitrógeno total y gramos de la peptona animal (PR) para establecer las cantidades en gramos de las peptonas evaluadas, de acuerdo con la ecuación (1), los resultados son observables en la tabla.

Tabla. Cantidad de nitrógeno total presente, pH y determinación de los g/L de cada una de las peptonas vegetales evaluadas

| Peptona vegetal (PE) | Nitrógeno total (%) P/V | pH | g (peptona) /L |
|-----------------------|-------------------------|-----------|----------------|
| 1, 1-B | 9,2 | 7 | 31 |
| 2, 2-B | 9,4 | 7 | 30 |
| 3, 3-B | 10,5 | 6,9 | 27 |
| 4, 4-O | 12 | 7,2+/-2 | 24 |
| 5, 5-O | 8,75 | 7,0+/-0,5 | 33 |
| 6, 8-M | 12,7 | 7 | 22 |
| 7, 9-M | 12 | 6,9 | 24 |
| 8,10-M | 9,6 | 6,5 | 30 |
| 9, 11-M | 11,6 | 6,7 | 25 |
| Peptona animal | | | |
| Proteosa peptona (PR) | 14,3 | 6,6-7,6 | 20 |

Prueba de estabilidad y determinación del pH de trabajo

En la prueba de estabilidad a 37° C todos los medios de cultivo a pH 7,3+/-0,2, presentaron un precipitado a las 48 h. Por lo tanto, se escogieron otras opciones de pH, que para el caso fue 7,0 y 8,2. Se rediseñaron los medios retirando la sal mineral de menor cantidad: sulfato de magnesio heptahidratado. Los medios diseñados, a estos pH se sometieron nuevamente a 37 °C, donde la mayoría presentó un color café tenue, libre de precipitados que impidieran o limitaran el crecimiento y proliferación del microorganismo.⁶

La precipitación presentada, se atribuye a que ciertos medios poseen sales insolubles de calcio y magnesio que podrían precipitarse en presencia de peptonas y de extractos de carne¹, por lo tanto todo material insoluble presente en el medio de cultivo va tener una determinada capacidad de unión a elementos metálicos disminuyendo su concentración efectiva.⁷

La temperatura trabajada (37 °C), fue seleccionada de acuerdo con la temperatura óptima de crecimiento de los clostridios (30 °C y 37 °C)⁸ y a la temperatura de solubilidad de las proteínas (10 °C a 45 °C, alcanzando un nivel máximo alrededor de los 35 °C), por tanto cuando se exceden estos límites los polímeros tienden a la desnaturalización y en ocasiones, a la precipitación.⁹

Por otro lado, los resultados de la determinación del pH de trabajo mediante la cantidad de biomasa generada, muestran diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de transmitancia de los medios diseñados con peptonas vegetales ($p < 0,05$) a pH 7,0 y pH 8,2 para *Clostridium chauvoei*. Los medios de cultivo *vegetable peptone broth* y *vegetable peptone phosphate broth* produjeron altos porcentajes de transmitancia a ambos pH (Fig. 1); sin embargo los cultivos a pH 8,2 mostraron entre sí menor variabilidad y mayor producción de biomasa que en los resultados obtenidos a pH 7,0 (Fig. 2), a excepción del medio *vegetable peptone phosphate broth*.

Choman,¹⁰ determinó, que las especies de *Clostridium* spp. son capaces de reproducirse bajo condiciones alcalinas, disminuyendo el pH entre 5,1-6,1, lo que indica un activo crecimiento. Por otro lado *Qari et al.*⁴ al desarrollar un medio anaerobio modificado a un pH de 8,4 informaron la reducción del pH de 1,48 y un % T de 2,20 en un tiempo de cultivo de 48 h, respectivamente.

Estos datos comparados con otros reportes de medios para *Clostridium* spp., permiten inferir que bajo estas condiciones se asegura un profuso crecimiento del microorganismo. Sin embargo, para un microorganismo dado, el pH óptimo de crecimiento varía de sustrato a sustrato; por ejemplo *Clostridium acetivum* solo crece autotróficamente entre pH 8,1 y 8,5, mientras crece con carbohidratos requeridos a pH alrededor de 7,0.¹¹

Los medios de cultivo *vegetable peptone broth* y *vegetable peptone phosphate broth*, no favorecieron una buena producción de biomasa, debido posiblemente a la formulación de los medios, los cuales no suministraron los componentes necesarios o las cantidades adecuadas de los mismos para promover una buena producción de biomasa de *Clostridium chauvoei*.

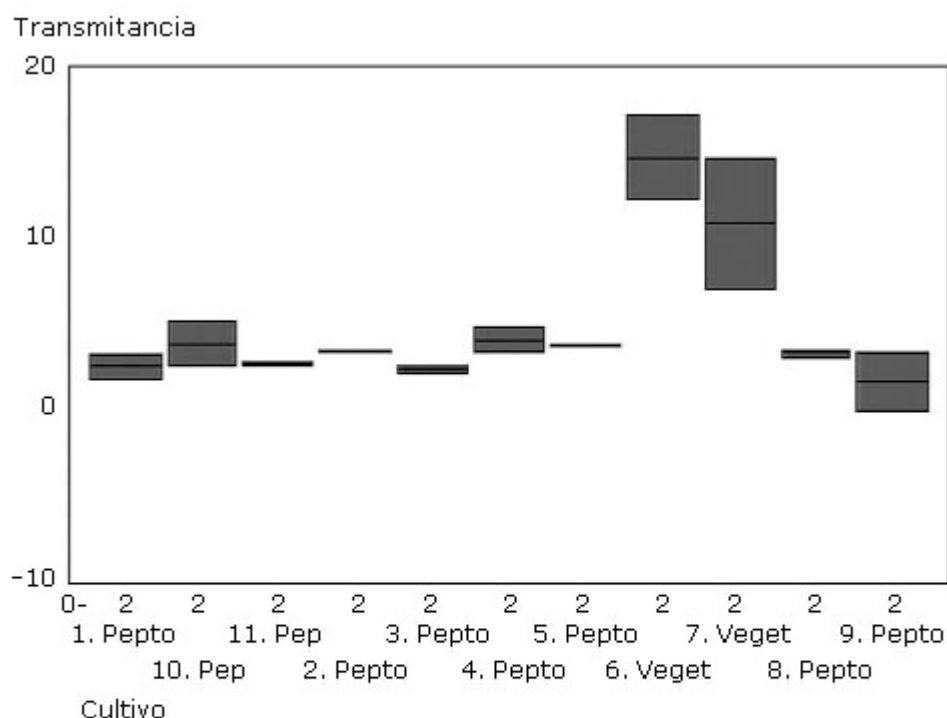


Fig. 1. Comparación de los porcentajes de transmitancia entre los diferentes cultivos con peptonas vegetales a pH 7,0 y 8,2 para la cepa de *Clostridium chauvoei*. 1: peptona veg. 1-B, 10: peptona veg. 10-M, 11: peptona veg. 11-M, 2: peptona veg. 2-B, 3: peptona veg. 3-B, 4: peptona veg. 4-O, 5: peptona veg. 5-O, 6: *vegetable peptone broth*, 7: *vegetable peptone phosphate broth*, 8: peptona veg. 8-M, 9: peptona veg. 9-M.

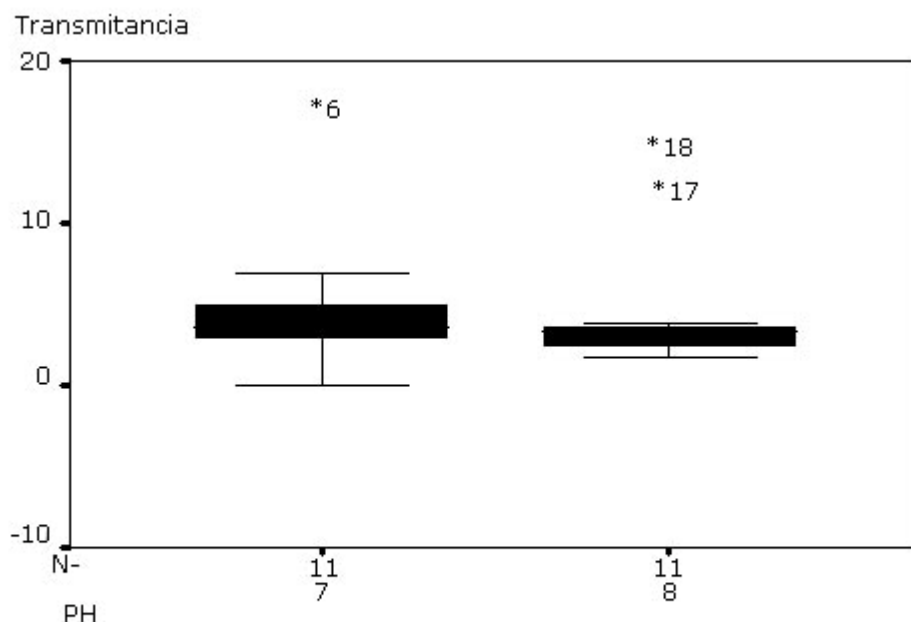


Fig. 2. Comparación de los porcentajes de transmitancia entre pH 7,0 y 8,2. Los cultivos con peptona vegetal a pH 7,0 y 8,2 poseen porcentajes de transmitancia muy cercanos, sin embargo a pH 8,2 se observa menos variabilidad de estos.

Selección de medios de cultivo y determinación de la producción de biomasa

Se realizaron tres réplicas de los ensayos en tubos tapa rosca a un volumen final de 50 mL, para evaluar la producción de biomasa en los 11 medios de cultivo con peptona vegetal, lo cual se determinó a través del % T, de cada ensayo comparando los datos entre si para definir los mejores cultivos a base de peptonas vegetales.

Con respecto a los resultados en la figura 3 existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de transmitancia de los medios diseñados con peptonas vegetales ($p < 0,05$) para la cepa de *Clostridium chauvoei*; sin embargo, los cultivos con peptona veg. 1-B, peptona veg. 11-M favorecieron una producción de biomasa muy cercana a la del medio base (proteosa peptona, medio *Clostridium* modificado, pH 7,3); seguido por los cultivos con peptona veg. 8-M, peptona veg. 10-M. En los cultivos restantes se observó una producción de biomasa en % T entre 3,2- 10,8%.

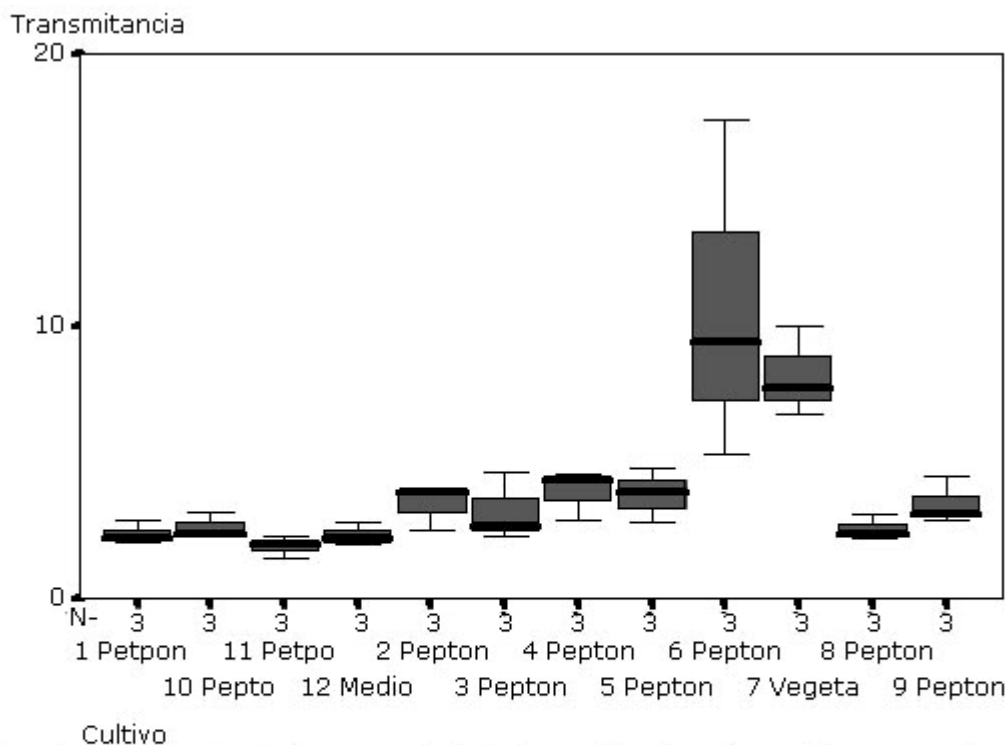


Fig. 3. Comparación de los porcentaje de transmitancia de los cultivos con peptona vegetal y el medio *Clostridium* modificado a pH 8,2 en tubos tapa rosca (50 mL) para *Clostridium chauvoei*. 1: peptona veg. 1-B, 10: peptona veg. 10-M, 11: peptona veg. 11-M, 12: medio *Clostridium* modificado (medio base), 2: peptona veg. 2-B, 3: peptona veg. 3-B, 4: peptona veg. 4-O, 5: peptona veg. 5-O, 6: *vegetable peptone broth*, 7: *Vegetable peptone phosphate broth*, 8: peptona veg. 8-M, 9: peptona veg. 9-M.

De acuerdo con estos resultados, los cultivos con las peptonas vegetales 1-b, 8-m, 10-m y 11-m fueron seleccionados y se llevó a cabo el experimento a mayor escala en fermentador con (200 mL); con el objetivo de evaluar la producción de biomasa a un volumen mayor y en un mejor sistema de cultivo, para poder definir los mejores cultivos con alguna de estas peptonas vegetales.

Es por esto que en los resultados observados en la figura 4, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de transmitancia de los cuatro

cultivos a base de peptona vegetal ($p > 0,05$) y en el medio *Clostridium* modificado para la cepa de *Clostridium chauvoei* a pH 8,2. De acuerdo con el test de Tukey, estos últimos cultivos con peptona vegetal presentan un % T muy cercano, por lo cual se estima que estas peptonas pueden ser aptas para reemplazar a la peptona animal en el medio *Clostridium* modificado.

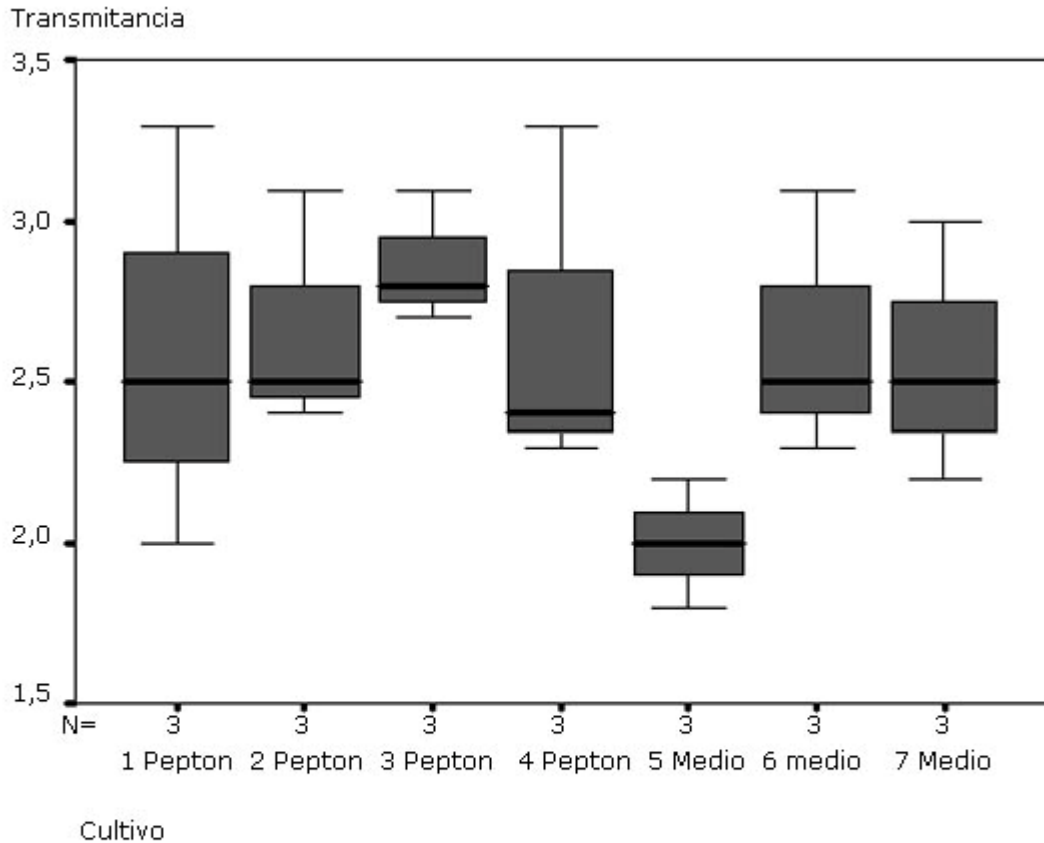


Fig. 4. Comparación de los porcentaje de transmitancia de los 4 cultivos con peptona vegetal seleccionados y el medio *Clostridium* modificado en fermentador (200 mL) para *Clostridium chauvoei* a pH 8,2. 1: peptona veg. 1-B, 2: peptona veg. 8-M, 3: peptona veg. 10-M, 4: peptona veg. 11-M, 5: medio *Clostridium* modificado pH 7,3 (medio base), 6: medio *Clostridium* modificado pH 8,2 sin $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 7: medio *Clostridium* modificado pH 7,3 sin $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Por otro lado, en el medio *Clostridium* modificado a pH 7,3 (medio base) se evidenció una mayor producción de biomasa (%T: 2,0) comparado con los medios *Clostridium* modificado sin sulfato de magnesio a pH 8,2 y a pH 7,3, los cuales obtuvieron una biomasa de *Clostridium chauvoei* con % T entre 2,6 y 2,5, respectivamente.

Los medios diseñados con las cuatro peptonas vegetales presentaron un % T muy cercano al medio base, pero con mayor variabilidad en los resultados. Asimismo, las modificaciones del medio base (6: pH 8,2 sin sulfato de magnesio y 7: pH 7,3 sin sulfato de magnesio) presentaron %T cercano al medio *Clostridium* modificado con mayor variabilidad de los resultados. Los medios PYG (peptona-extracto de levadura-glucosa) son recomendados para cultivar especies de *Clostridium*;¹² por lo tanto el medio *Clostridium* modificado, que es un medio complejo, permite la propagación de *Clostridium chauvoei*, debido a que posee proteosa peptona, extracto de levadura, glucosa, sulfato de magnesio y fosfato dipotásico que influyen positivamente en la producción de biomasa y esporulación de los microorganismos, en comparación con los componentes de otros medios.

El reemplazo de la peptona animal por las peptonas vegetales a la cantidad propuesta en el medio base, se destacó por estimular el crecimiento abundante de *Clostridium chauvoei*, gracias a que estas posiblemente aportaron carbono, nitrógeno (proteosas), sales inorgánicas como los fosfatos y algunos micronutrientes como Ca, Zn, Fe y Cu, componentes esenciales requeridos en un medio microbiológico para el crecimiento de los microorganismos,^{8,13} afirman que las sales, elementos trazas y solución de vitaminas deben ser empleados para preparar medios complejos, pero los requerimientos de bases purinas y pirimidinas, y aminoácidos pueden variar, de manera significativa; esto es totalmente importante, ya que son precursores para proteínas o como sustratos productores de energía. Por lo tanto, las peptonas vegetales como las peptonas animales son fuentes de nitrógeno orgánico fundamentales que poseen la capacidad de promover un profuso crecimiento en medios de cultivo complejos para microorganismos con alta demanda en requerimientos nutricionales como los *Clostridium* spp; sin embargo, la producción de biomasa para algunos cultivos fue más baja con respecto al medio base, que pudo deberse a aspectos como el número de pasaje de la semilla, el cual origina disminución de la capacidad de multiplicación; condiciones del medio, en los cuales la cantidad empleada de peptona vegetal o el pH seleccionado pudo favorecer o no la producción de biomasa.

La eliminación del sulfato de magnesio en los medios diseñados con las peptonas vegetales y en el medio base a pH 7,3 y 8,2 no tuvo un efecto negativo en la producción de biomasa. De acuerdo con lo descrito² una fórmula puede no tener metales y minerales específicos. En tales casos se asume que los factores requeridos están presentes en los hidrolizados, en el tampón o en el agar. Al final de la producción de biomasa en los cultivos con peptona veg. 1-B, peptona veg 8-M, peptona veg. 10-M y peptona 11-M se les verificó la actividad letal en cobayos, encontrando títulos de $10^{-8.3}$, $10^{-7.7}$ y $10^{-8.7}$ respectivamente.

De igual forma se ratificó que los componentes del medio de cultivo empleado y que la solución salina estéril no fueron la causa de la muerte de los cobayos. Entre las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} se localiza la DL₅₀ de los cultivos con las siguientes peptonas vegetales; peptona veg. 1-B, peptona veg. 10-M y peptona 11-M, entre las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} se localiza la DL₅₀ del cultivo con la peptona veg. 8-M y finalmente, entre la dilución 10^{-6} y 10^{-7} se localiza la DL₅₀ del medio *Clostridium* modificado, respectivamente.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se logró el diseño de medios de cultivo con peptonas vegetales a pH 8,2 para la producción de biomasa de *Clostridium chauvoei*. Se definieron cuatro medios de cultivo a base de las peptonas vegetales; 1-B, 8-M, 10-M y 11-M, las cuales favorecieron la producción de biomasa de *C. chauvoei*. Los porcentajes de transmitancia de estas peptonas no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, ni con el medio de control (ver figura 3). El título del medio control fue el menor de todos los medios evaluados y se logró obtener títulos mayores al utilizar peptonas vegetales, lo que favorece las condiciones de obtención de una biomasa con mayor evidencia de toxicidad dentro del proceso de producción.

Financiación, agradecimientos y conflictos de intereses: Agradecimientos a la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios Vecol S.A, por la financiación de este trabajo y a la Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología, Grupo de Investigación de Biotecnología Ambiental e Industrial. GBAI

Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Badui SD. Química de los alimentos. México D.F: Editorial Alhambra; 1993. pp. 154-9
2. Becton Dickinson and Company Peptone Technical Manual. BD Becton Dickinson Producción Biofarmaceutica; 2003: 15-20.
3. Bergey´s Manual of systematic bacteriology. *Clostridium chauvoei*. 1984(2):1141-63.
4. Choman BR. Secuential growth of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, and *Clostridium novyi* in the same medium. Am J Veterinary Res. 1969;30(1):133-7.
5. Gaudreau H, Renard N, Champagne CP, Hrn V. The evaluation of mixtures of yeast and potato extracts in growth media for biomass production of lactic cultures. Can J. Microbiol. 2002;48(7):626-34.
6. Guzmán AM, Micalizzi B. Diagnóstico de la mancha por inmunofluorescencia directa en médula ósea de bovino. Revista Latinoamericana de Microbiología. 1992;34:87-9.
7. Kurbanoglu EB, Algur OF. A new medium ram horn hydrolysate for enumeration aerobic bacteria. Turkish Journal of Biology. 2004;28: 343-50.
8. Larkin JM. Peptonized milk as an enumeration medium soil bacteria. Applied Microbiology. 1972;23:1031-2.
9. Lee J, Hwang H, Jung E, Huh S, Hyun J, Park D. Promotion of stem cell proliferation by vegetable peptone. Cell Proliferation. 2009;48(25):595-601.
10. Micalizzi B, De Guzman AM. Use of surgar cane molasses for culture of *Clostridium chauvoei*. Clinical Infection Diseases. 1995;20(2):382-3.
11. Qari SH, Agrawal B, Sing SD. Modified anaerobic medium for *Clostridium chauvoei* and *C. septicum*. Indian J Microbiol. 1990;30(4): 459-62.
12. Shone C, Hambleton P. Toxigenic Clostridia. In: Biotechnology Handbooks. Clostridia. Minton P, Clarke, JD (Ed). New York, USA: Plenum Press; 1989. p. 27-42.
13. Tanskul S, Amornthatree K, Jaturonlak N. A new cellulose-producing bacterium, Rhodococcus SP. MI 2: Screening and optimization of culture conditions. Carbohydrate polymers. 2013;92(1):421-28.

Recibido: 27 de agosto de 2013.

Aprobado: 12 de septiembre de 2013.

Janeth del Carmen Arias Palacios. Departamento de Microbiología, Grupo Biotecnología Ambiental e Industrial GBAI, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana Carrera 7 No. 43-82, Bogotá. Correo electrónico: jdcarias@javeriana.edu.co