

UTILIZACION DE UN NUEVO MEDIO DE CULTIVO PARA
EL DESARROLLO DEL *Clostridium chauvoei*

JUAN ALBERTO GUTIÉRREZ SARMIENTO *
LUIS BOJÓRQUEZ NARVÁEZ ¹

Resumen

El objetivo primordial por el cual se elaboró el presente trabajo, es utilizar desechos de origen agropecuario, tales como la melaza y agua residual de rastros de bovinos y equinos, como materia prima para elaborar medios de cultivo utilizados en la producción de bacterinas de uso veterinario. En este trabajo se utilizó la bacteria *Clostridium chauvoei*, cepa NCTC 8070, la cual requiere de medios de cultivo enriquecidos para su desarrollo. Esta bacteria causa la pierna negra en los bovinos y ocasiona grandes pérdidas a la ganadería del país.

Se probaron 3 medios de cultivo: en dos de ellos se usó la melaza como fuente de energía, y un testigo utilizó como fuente de energía la glucosa. En los medios en los que se suplió la melaza, se usó como fuente de nitrógeno agua residual de rastro de equinos, en uno de ellos y en el otro agua residual de rastro de bovinos. En el testigo se utilizaron peptona y extracto de levadura comerciales.

En el medio en que se utilizó agua residual de rastro de bovinos, se observó un desarrollo muy pobre de la bacteria y presentó una turbidez equivalente al tubo N° 4 del nefelómetro de Mc Farland. El contenido proteínico de este medio fue de 1.59 gr/100 ml. En el medio que se utilizó agua residual de rastro de equinos, el contenido proteínico fue de 16.9 gr/100 ml y el desarrollo microbiano excelente, pues presentó una turbidez mayor al tubo N° 10 del nefelómetro de Mc Farland. En el medio testigo, el desarrollo bacteriano fue bueno, equiva-

lente al tubo N° 10 del nefelómetro de Mc Farland. También se determinó el tiempo de generación del *Clostridium chauvoei*, cepa NCTC 8070, pero sólo en el medio testigo y en medio con agua residual de agua de equinos, encontrándose un tiempo de generación en el primero de 37 minutos, y de 26 minutos en el segundo. El medio con agua residual de rastro de bovinos fue descartado debido al pobre desarrollo bacteriano anteriormente citado.

Estos resultados iniciales sugieren la posibilidad de utilizar estos y otros desechos de origen agropecuario para formular medios de cultivo empleados en el desarrollo microbiano, y así poder sustituir la importación de materia prima y medios de cultivo de elevado costo y que muchas veces no están disponibles en el mercado nacional, por materia prima de buena calidad, de fácil obtención y, por lo tanto, de bajo costo.

Introducción

En 1980, las pérdidas por clostridiasis fueron de alrededor de cien millones de pesos (Bojórquez, 1981), razón por la cual cobra importancia la elaboración de inmunógenos para poder así disminuir al máximo estas pérdidas.

En lo concerniente a la antigenicidad del *Cl. chauvoei*, existen principalmente dos criterios: uno, en el cual se considera al toxoide más inmunogénico que las células bacterianas, y el otro (del que se ha informado en la literatura de los últimos años), que señala que los antígenos celulares flagelar y termolábil en pared celular juegan un papel definitivo en la protección de los animales contra el *Clostridium chauvoei*. Así pues, se ha afirmado que la protección contra esta enfermedad radica en un 70% en

* Trabajo presentado como tesis para obtener la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1983. Dirección actual: C.E.P. "La Unión". Apdo. Postal N° 720. Acapulco, Gro. C.P. 39300.

¹ Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, Depto. Bacteriológicos. Zaragoza N° 75, Lomas Altas. C.P. 11000, México, D.F.

los antígenos celulares y en un 30% en el toxoide (Brown and Stewart, 1976, Smith and Holeman, 1978; Tizard, 1979; Bojórquez, 1980a, 1980b y 1981).

En la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) se elaboran bacterinas contra estas enfermedades, empleando cepas aisladas a partir de brotes ocurridos en el país, y utilizando un elevado porcentaje de masa celular para la producción de estos biológicos. Los resultados han sido positivos, ya que dichos inmunógenos han aprobado satisfactoriamente las pruebas de control de calidad, basados en requerimientos nacionales necesarios para garantizar su efectividad y seguridad (Bojórquez, 1979; Manual de requerimientos para bacterinas y vacunas 1982).

En el presente trabajo, se expone la forma en que se pueden aplicar los desechos de origen agropecuario a la bacteriología veterinaria, dentro de su campo de producción de inmunógenos, utilizando la melaza (MM), y los desechos de la matanza de rastros de equinos (MR-E) y de bovinos (MR-B), como ponentes de un medio de cultivo de bajo costo, y que mantenga o mejore la calidad del producto.

Material y métodos

I. *Material biológico*: Semillas de *Clostridium chauvoei* cepa NCTC 8070.

II. *Métodos de obtención de los desechos de origen agropecuario*: La melaza se compra directamente en los ingenios azucareros, y las muestras del agua residual de rastro de bovinos y equinos son recolectadas en los rastros correspondientes, al finalizar la matanza.

III. *Métodos de conservación y esterilización*: La conservación de las muestras se efectúa en refrigeración a 4°C y las muestras de melaza se esterilizan en autoclave (121°C; 15 min; 15 lb): las muestras de agua residual de rastro de equinos y bovinos son esterilizadas por filtración utilizando el siguiente orden:

Filtro de fibra de vidrio, papel prefiltro, membranas millipore de 1.8 micras; 1.2 micras; 1.3 micras; .8 micras, .45 micras y .22 micras.

IV. *Métodos utilizados para la preparación de medios de cultivo, pruebas de esterilidad, preparación de la semilla e inoculación e incubación de dichos medios*.

a) En la preparación de los medios de cultivo a base de desechos de origen agropecuario para el desarrollo del *Clostridium chauvoei*, se utilizaron los siguientes ensayos: *el medio de cultivo 1* (medio de producción utilizado en PRONABIVE y utilizado como testigo) contiene 10% de peptona, 20% de extracto de levadura, 0.5% de cloruro de sodio, 5% de almidón soluble, 20% de dextrosa, 0.4% de fosfato de sodio dibásico, 0.2% de fosfato de potasio monobásico y agua destilada C.B.P. 100 ml. *El medio de cultivo 2* contiene 2% de melaza, 10% de la muestra del agua residual del rastro de equinos (MR-E), 0.4% de fosfato de sodio dibásico, 0.2% de fosfato de potasio monobásico y agua destilada C.B.P. 100 ml. Finalmente, *el medio de cultivo 3* se elaboró con 2% de melaza, 10% de la muestra de agua residual del rastro de bovinos (MR-B), 0.4% de fosfato de sodio dibásico, 0.2% de fosfato de potasio monobásico y agua destilada C.B.P. 100 ml.

b) *Inoculación e incubación*: los 3 ensayos de medios de cultivo fueron inoculados con 1.25 ml de semilla de *Clostridium chauvoei* y fueron incubados a 37°C durante 24 hs. Se determinó mediante la turbidez de equivalencia del nefelómetro de McFarland, que los medios de cultivo 1 y 2 presentaron un buen desarrollo bacteriano, no ocurriendo así en el medio N° 3, por lo que se descartó su utilización.

V. *Curvas de crecimiento del Clostridium chauvoei*, en los medios de cultivo 1 y 2:

a) Se prepararon dos matraces de 10 l cada uno, de los cuales uno tenía medio de cultivo 1 y el otro con el medio 2, y se inocularon con 125 ml cada uno con semilla de *Clostridium chauvoei* cepa NCTC 8070, luego se incubaron a 37°C durante 18 hs procediéndose a efectuar la toma de una muestra de 15 ml cada hora (con un total de 18 muestras), a las que se les efectúa un frotis e inmediatamente se les inactiva con 1.5. ml de formalina para evitar un de-

sarrollo ulterior de las bacterias que se cultivan.

b) La lectura del pH se hizo por medio de un potenciómetro (pH controller; New Brunswick Cientific Co.), cuyo electrodo se introdujo en ambos medios de cultivo, obteniéndose de esta manera los cambios de pH ocurridos en los dos medios durante el desarrollo bacteriano, de una manera ininterrumpida durante todo el proceso. Los valores del pH se graficaron contra el tiempo, para determinar la curva final de pH.

c) Las muestras del medio 2 se centrifugaron primeramente a 300 G durante 5 minutos, y se eliminó el sedimento (restos de glóbulos rojos, melaza y otros no identificados conservándose el sobrenadante, cuyo volumen final fue de 10 ml; se encontraba en él la masa bacteriana, que para su lavado, fue sometida a otra centrifugación a 2,150 G durante 30 minutos, obteniéndose en el sedimento la masa celular, que se reconstituyó a su volumen original utilizándose 10 ml de P.B.S. estéril).

d) Una vez lavadas las células bacterianas de las 18 muestras, se midió la densidad óptica de cada una de ellas en un espectrofotómetro (Spectronic 20; Bausch and Lomb), a 560 nm, y se anotaron los resultados, los cuales se grafican en densidad óptica contra tiempo en papel semilogarístico; como blanco se usó un tubo con 10 ml de P.B.S. estéril.

CUADRO 1

Análisis fisicoquímico del contenido de proteínas* y carbohidratos de las muestras ensayadas para el desarrollo del *Cl. chauvoei***

Muestra	% Proteínas	% Carbohidratos
Melaza	—	40%
MR-E	16.2	0.125 %
MR-B	1.59	0.62 %

* Métodos de Biuret.

** Spencer-Meade (1976).

CUADRO 2

Turbidez producida por el crecimiento del *Cl. chauvoei* a las 18 horas de incubación en los medios probados usando la escala del nefelómetro de McFarland

Medio de cultivo	Turbidez equivalente	Interpretación del crecimiento
Medio 1	= 10	Bueno
Medio 2	+ 10	Excelente
Medio 3	4	Débil

Sirvió como testigo la turbidez presentada por los 3 medios de cultivo antes de ser inoculados.

CUADRO 3

Esporulación del *Clostridium chauvoei* durante el proceso de fermentación en el medio de cultivo 1

Horas	No. de esporas en 10 campos observados
0 — 15	0
14	2
15	10
16	9
17	90
18	91

CUADRO 4

Esporulación del *Clostridium chauvoei* durante el proceso de fermentación en el medio de cultivo 2

Horas	No. de esporas en 10 campos observados
0 — 11	0
12	4
13	4
14	6
15	11
16	64
17	98
18	113

CUADRO 5

Velocidad de crecimiento y tiempo de generación del *Clostridium chauvoei* en los medios de cultivo probados

Medio de cultivo	Velocidad de crecimiento (n^{-1})	Tiempo de generación (min)
Medio de Cultivo 1	0.57 h^{-1} (34.2 min^{-1})	37 min.
Medio de Cultivo 2	0.70 h^{-1} (42 min^{-1})	26 min.

* Bojórquez, 1982.

Discusión

1) De acuerdo con los resultados contenidos a partir del análisis físico-químico de las muestras tomadas (Cuadro 1) se puede observar que el contenido proteínico de la muestra tomada en el rastro de equinos, es superior a la tomada en el rastro de bovinos; esto se debe, sin duda alguna, a los diferentes métodos y técnicas con las cuales se efectúa la matanza en ambos rastros.

2) El crecimiento del *Clostridium Chauvoei* en el medio de cultivo 2, presentó una turbidez mayor que la producida en el medio de cultivo 1 (Cuadro 2).

3) En la curva de crecimiento del *Clostridium chauvoei* en el medio de cultivo 1 (Figura 1), se puede apreciar que el período de adaptación de la bacteria es de 4 hs; el crecimiento bacteriano fue de tipo logarítmico y ocurrió entre las 4-13 hs. El *Clostridium chauvoei* esporuló a las 14 hs (Cuadro 3) pasando así a un período final de fase estacionaria, en el cual el crecimiento bacteriano es mínimo debido a que casi todos los nutrientes disponibles han sido consumidos por la bacteria.

En la curva de pH correspondiente (Figura 2) se puede apreciar que el pH del medio de cultivo se acidifica a medida que la bacteria se desarrolla, debido a los ácidos orgánicos que se producen como resultado del metabolismo bacteriano.

4) En la curva de crecimiento del *Clostridium chauvoei* en el medio de cultivo 2 (Figura 1), se puede observar que el período de adaptación de la bacteria fue de sólo 2 hs; el crecimiento logarítmico bacteriano se efectuó de las 2-8 hs (siendo mayor que el observado en el medio 1).

El *Clostridium chauvoei* esporuló en este medio a las 12 hs de incubación (Cuadro 4), pasando así al último período de fase estacionaria.

En la curva de pH del mismo medio (Figura 2) se aprecia una acidificación del medio a medida que se desarrolla la bacteria, por las mismas causas ya mencionadas con anterioridad.

5) Como se puede observar en el Cuadro 5, el *Clostridium chauvoei* se desarrolla con mayor rapidez en el medio de cultivo 2, siendo el tiempo de generación de la bacteria 11 minutos más rápido que el observado en el medio de cultivo 1 (Bojórquez N. Luis, 1982).

Conclusiones

1. Algunos desechos de origen agropecuario (en este caso agua residual de rastro de equinos y melaza), pueden ser utilizados en la elaboración de medios de cultivo, lo cual abarata los precios de los inmunógenos de uso veterinario. Al comparar los costos de producción en el presente trabajo, se observó que existe una disminución del 80% en la elaboración de la bacteria contra *Clostridium chauvoei*, al utilizar el medio a base de desechos de origen agropecuario.

2. En las actuales condiciones económicas del país, este estudio resulta de gran interés, debido a que una cantidad considerable de medios de cultivo son de importación, quedando sujeta de esta manera la elaboración de inmunógenos a situaciones de orden del cambio monetario internacional, que repercuten desde el aumento en los costos de producción, hasta la imposibilidad de elaborar algunos productos biológicos en

el país, viéndose de esta forma afectada la ganadería nacional.

3. En este estudio, no sólo no se afectó al crecimiento y metabolismo del *Clostridium chauvoei* en el medio de cultivo 2, sino que incluso se obtuvo una mayor masa celular en el medio experimental.

4. Se recomienda establecer parámetros de producción con este medio, tales como:

a) Contenido de proteínas de muestras de agua residual de diferentes matanzas para poder establecer la relación entre número de animales sacrificados y contenido de proteínas en el agua residual.

b) Seguir utilizando la concentración de melaza que se recomienda en este trabajo.

c) Establecer los parámetros que requiere la bacteria, tales como: pH óptimo de crecimiento, % de proteínas necesarias para su desarrollo, así como de carbohidratos y otros metabolitos que eleven al grado óptimo el desarrollo del *Cl. chauvoei*.

5. Es necesario realizar pruebas de inmunogenicidad e hipersensibilidad de los inmunógenos elaborados a partir de desechos de origen agropecuario.

Summary

It was used livestock waste material (molasses and residual water from the cattle and horses slaughterhouses, like ingredients of a new culture broth formulation for the *Clostridium chauvoei* development, microorganism which is the cause of the black leg in cattle, so important for its economic losses.

Three culture broth were proved, one was used like control, which ingredients are imported and expensive, this one is the Pronabive's * production culture broth (medium 1). The other two culture broth were made using the molasses like energy source, and like proteic nitrogen source was used in one the horses * slaughterhouse residual water (medium 2), and the cattle's slaughterhouse residual water in the other one (medium 3). The best development of the *Clostridium chauvoei*, was observed in the medium 2, surpassing the bacterial growing observed in the control culture broth. In the medium 3 was observed a very poor bacterial development.

* Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.

Literatura citada

- BLOOD, D.C., HENDERSON, S.A., 1976, Medicina veterinaria. 3ª ed. Ed. Interamericana, D.F. Carbón sintomático. 339-342.
- BROWN, K.K., PARIZER, E.R., STEWART, C.R., 1976, Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin. *Vet. Med.*, 1717-1720.
- BOJÓRQUEZ, N. LUIS, 1977, Clostridiasis. VI Reunión de Sanidad Animal. DGSA.
- BOJÓRQUEZ, N. LUIS, 1979, Investigación de nuevos inmunizantes contra carbón sintético. *Resumen de la Reunión Area Médica del INIP*.
- BOJÓRQUEZ, N. LUIS, 1980, Titulación de cepas de *Cl. chauvoei* para selección. Depto. Bact. PRONAVIBE.
- BOJÓRQUEZ, N. LUIS, 1980, Pierna negra y edema maligno. *M.V.Z. Noticias*. Vol. IV, 6:1-6.
- BOJÓRQUEZ, N. LUIS, 1981, Inmunología del *Cl. chauvoei*. Reunión de Sanidad Animal, D.F., 1-8.
- BUXTO, 1979, *Blackwell Scientific Publications*, Ltd. Oxford, England. Immunology of *Cl. chauvoei*. II, 629.
- D.K. and MACHEAK, E.M., 1972, Characteristics and immunizing properties of culture filtrates of *Cl. chauvoei*. *Am. J. Vet. Res.* 33(5):1031-1038.
- HERBERT, W.S., 1970, *Vet. Immy. of Cl. chauvoei*. Blackwell Scientific Publ., Ltd. Oxford, England, 228.
- LABRANDEROS, 1970, *Res. Reunión Area Médica INIP*. Manual de requerimientos para vacunas y bacterinas, 1982. DGSA, SARH. México.
- SIDNEY W. BENSON, 1974, Cálculos químicos. 4ª ed. Limusa, México, D.F., 54.
- SMITH, D.L., HOLEMAN, V.L., 1978, The pathogenic anaerobic bacteria, *Cl. chauvoei*. 4th ed. Academic Press, Inc. London. LTS. 1148.
- SPENCER-MEADE, 1967, Manual del azúcar de caña. Edit. Montaner y Simón, S.A., Barcelona, España, pág. 629.
- TIZARD, IAN R., 1979, Comentarios acerca de las vacunas que se aplican a los animales. Ed. Interamericana. México, D.F. 215.
- VARGAS LEVARO, JORGE, 1977, Análisis epizootológico de las gangrenas gaseosas en México. VI Reunión de Sanidad Animal, DGSA (SARH).