

Preparación de peptonas

por G. Ruff

Las peptonas tienen fundamental importancia para la bacteriología como fuente de nitrógeno: La experiencia nos dice que los microorganismos necesitan para su crecimiento y, más aun, para la producción de cantidades medibles de toxinas, proteínas más o menos desintegradas (1). El fracaso en la obtención de toxinas se atribuía, antiguamente, a deficiencias propias de la cepa. Pero, en su mayoría, las causas de tal fracaso deben buscarse en la insuficiente o defectuosa composición del medio nutritivo. Fueron Park y Williams, los primeros que insistieron en que, el medio nutritivo empleado para la obtención de toxinas diftéricas, debe contener determinadas cantidades de peptona. Puede ser considerado como cierto que la presencia de peptona y de las albumosas correspondientes en el medio nutritivo, es indispensable para la obtención de una fuerte cantidad de toxina. Pueden seguirse dos caminos: 1º Agregar al agua de carne la cantidad necesaria de peptona comercial. El valor de estas peptonas comerciales como favorecedores de la producción de toxina es sumamente variable. 2º Agregar al agua de carne, la cantidad necesaria de peptona preparada "ad hoc", que se obtiene al tratar carne y otras proteínas con fermentos proteolíticos bajo condiciones apropiadas. El procedimiento más antiguo en uso con este fin es el de Martín, quien emplea estómagos de cerdo que somete a su propia digestión (2). La desintegración de las proteínas puede obtenerse también con ayuda de la tripsina. Al emplear este procedimiento debe cuidarse que el proceso enzimático no pase cierto límite (3). Por la acción de álcalis y de ácidos fuertes se llega también a la desintegración proteica, dándose origen a la formación de aminoácidos de estructura más sencilla. Con la acción de la pepsina jamás se consigue la formación de aminoácidos de estructura sencilla; los productos finales que así se obtienen son proteosas y peptonas. Las proteosas y las peptonas son sustancias derivadas de las proteínas, consideradas como productos de la desintegración proteica incompleta; su molécula es, por lo tanto, aún

grande, son sustancias intermedias entre las proteínas y los amino-ácidos. Estos últimos son los productos finales de la desintegración de las proteínas. Las albumosas vienen a representar los primeros productos de tal desintegración. Son de estructura más compleja que la peptona; dan reacción de Biuret, como las proteínas, pero no precipitan en caliente. Las peptonas tampoco precipitan en caliente y dan reacción de Biuret; se diferencian de las albumosas por el hecho de no precipitar al saturar sus soluciones con sulfato de amonio.

El medio nutritivo fundamental mayormente empleado está constituido por una dilución de peptona en agua de carne. Las proporciones de concentración de estas sustancias son de importancia para la producción de toxina y estas proporciones son variables según las calidades de la peptona usada. La composición de los elementos nutritivos nitrogenados del medio juega importante papel, tanto para el crecimiento de los microorganismos como para la génesis de la toxina correspondiente. La calidad de la peptona empleada es un factor decisivo (4). Las peptonas comerciales se obtienen generalmente por la desintegración enzimática de proteínas. Como esta desintegración con seguridad no llega al mismo grado, resulta que las cantidades proporcionales de los productos de mayor o menor desintegración son muy variables. Conforme a las recientes investigaciones, el crecimiento de los microorganismos es favorecido por la presencia de productos de mayor desintegración proteica, mientras que la formación de toxinas es favorecida por la presencia de productos de menor desintegración proteica, es decir, albumosas y peptonas (5). Sobre el papel que ha de desempeñar la relación *Nitrógeno total: Nitrógeno amínico* no hay conclusiones definitivas (x). Tanto un exceso como una falta de nitrógeno-amínico resulta igualmente perjudicial para la génesis de la toxina (6). Según nuestra experiencia los mejores resultados se obtienen con peptonas que contienen un 20-25 % del nitrógeno total en forma de nitrógeno-amínico. Más detalles se ven en el cuadro N° 1.

La relación entre N. amínico y N. total es condicionada ampliamente por 3 factores.

- 1° pH con el cual se efectúa la digestión.
- 2° La temperatura con la cual se digiere.
- 3° La duración de la digestión.

Al parecer es de menor importancia la cantidad de mucosa gástrica empleada, como lo atestiguan nuestras experiencias. Jamás hemos obtenido una peptona utilizable para la obtención de toxinas diftéricas, cuando procedimos a digerir a un pH 1,5-2 y a una temperatura de 50°. Pero peptonas así obtenidas son muy aptas para la preparación de toxina tetánica. En estas peptonas hasta el 20 % de nitrógeno total estaba representada por nitrógeno-amínico. Di-

(x) Todos los dosajes del nitrógeno amínico han sido practicados por el método de Sørensen. Ver Abderhalden Abt. I, parte 7, pág. 245.

geriendo con distintas cantidades de mucosa y variando el tiempo de digestión era indiferente el empleo de los siguientes ácidos: clorhídrico, sulfúrico, oxálico. Los resultados fueron siempre los mismos, como se ve en el cuadro N^o 2.

Pero si a los medios nutritivos preparados con peptonas así obtenidas, se agrega, además, hidrolizado de caseína y mejoradores (7), se consigue una apreciable producción de toxina diftérica, independiente de la clase de proteína empleada para la preparación de la peptona (plasma, fibrina, carne de ternera y carnes hervidas). Como nuestro objeto primordial fué preparar una peptona apta para la obtención de toxina diftérica sin que fuera necesario agregar al medio nutritivo hidrolizado de caseína y mejoradores, hemos realizado investigaciones sistemáticas respecto a esta cuestión. A igual temperatura (41-42°) se efectuaron ensayos a pH entre 2-4 y con cantidades de mucosa gástrica que representaban el 15-30-50 % de la cantidad total de proteínas empleadas. El período de digestión oscilaba entre 24-48-72 horas. Se empleó ácido clorhídrico simplemente por razones económicas. Como resultado de estos ensayos, que insumieron considerable tiempo, podemos apuntar lo siguiente:

Los glúcidos fermentables de la carne, al incorporarse al medio nutritivo, dan lugar a la formación de ácidos durante el desarrollo de los microorganismos. Como esos ácidos perjudican la génesis de toxina, deben ser eliminados previamente los glúcidos, lo que se consigue conservando en cámara fría ($\pm 3^\circ$) durante 4-5 días la carne cortada en pequeños fragmentos. La acción perjudicial de estos glúcidos para el desarrollo de toxina fué comprobada por medio del siguiente ensayo: con peptona obtenida de carne de caballo fresca, se preparó un medio nutritivo que favoreció claramente el desarrollo de los gérmenes, pero que no dió lugar a la formación de toxina. Una parte de la misma carne de caballo fué conservada durante 6 días en cámara fría; la peptona preparada a continuación con esta carne sirvió para elaborar un medio nutritivo en el cual hubo buen desarrollo de gérmenes y de toxina.

Se prefirió el empleo de mucosa gástrica de cerdo para la digestión, pues contiene menos cantidad de grasas que el estómago total. Para 1 kg. de carne son necesarios 300 grs. de mucosa gástrica.

A continuación describiremos la técnica que se emplea en nuestro Instituto desde hace un año para la preparación de cierta cantidad (180 lt.) de peptona.

La carne de ternera, aproximadamente 60 kgs., se conserva durante 5-6 días en cámara fría. La mucosa gástrica sufre un proceso de predigestión: 8.600 grs. de mucosa molida se cubren con 9.240 c.c. de agua destilada a la cual se agrega 560 c.c. de ácido clorhídrico de una densidad 1,12 (a 15°). Se mezcla bien y se deja durante 24 hs. a temperatura ambiente.

A 2,5 kgs. de carne molida se agrega 5 ls. de agua destilada a 50° que contienen 115 c.c. de ácido clorhídrico ($D=1,12$ a 15°). Se mezcla bien y se agrega 800 grs. de la preparación de mucosa arriba mencionada. Se coloca en frasco de vidrio de 10 ls. de capacidad.

En total se acondicionan así 23 frascos. La digestión se efectúa en baño maría a 41°-42°. Durante las primeras 5 horas se agita el contenido de cada frasco con una espátula de madera, cada 3/4 de hora. A las 2 horas de digestión comprobamos un pH de 2,9-3,00, a las 24 hs. un pH de 3,4-3,5. En este momento es decir a las 24 horas de iniciada la digestión se agrega a cada frasco 800 grs. de la preparación de mucosa (preparada el día anterior) y 40 c.c. de ácido clorhídrico; se mezcla bien, cada 3/4 de hora durante 5 horas. La digestión se prosigue 24 hs. más, es decir la digestión se efectúa durante 48 hs. Después de ese tiempo el pH oscila entre 3,1-3,2. Sin agitar el contenido de los frascos, la temperatura del baño-maría es llevada rápidamente a 80°; una vez que la temperatura del interior de los frascos ha llegado a los 70° estos permanecen aún durante 10 minutos a una temperatura entre 70-75°. Esto basta para interrumpir la digestión. A continuación se enfría rápidamente con agua corriente hasta que la temperatura del interior de los frascos sea igual a la temperatura del agua que sirve para enfriar. Los frascos se conservan en cámara fría ($\pm 3^\circ$) durante 4 días. Durante estos días el líquido sobrenadante se clarifica totalmente, la grasa sobrenada en la superficie en película o se adhiere a las paredes de los frascos. Su remoción es fácil, y debe realizarse con prolijidad, pues peptonas con grasa no son aptas. (8) El contenido de los frascos se decanta teniendo cuidado de que no pase grasa. El líquido decantado se cuela a través de trapo de queso de malla fina, operación que lleva breve tiempo; el sedimento también se cuela en la misma forma pero en cámara fría, operación que se realiza más o menos durante 2-3 días. Los líquidos colados se llevan a pH 7,2-7,4, empleándose para ello solución de NaOH al 50 %, se calienta (90°) y sin filtrar se traspasan a frascos de vidrio. Se esterilizan durante 1/2 hora a 1/2 atmósfera. La peptona así preparada está lista para su uso.

Las cifras de los valores para el Nitrógeno total, Nitrógeno amínico y para la relación de estos dos, así como para el cloruro de sodio, los encontrará el lector en el cuadro N° 3.

El cuadro demuestra que las peptonas así preparadas contienen cloruro de sodio equivalente a 1 gr. X 100 c.c.. Una parte de este cloruro de sodio puede ser eliminado fácilmente por diálisis. Con una diálisis de 15' pudo comprobarse que el 55 % del cloruro de sodio había pasado al líquido exterior. La reacción de Biuret permaneció negativa durante este tiempo. Si se prolonga el tiempo de diálisis se consigue eliminar la mayor parte del cloruro de sodio, pero también se comprueba una apreciable pérdida de materia nitrogenada, pues a los 30 minutos de diálisis la reacción de Biuret es positiva en el líquido exterior.

Estas peptonas fueron comparadas con una peptona Standard en una serie de ensayos importantes. Con medios nutritivos carentes de hidrolizado de caseína y de mejoradores, pero que tenían en solución peptona en cantidad equivalente al 25 % de volumen se obtuvieron, por lo menos, cantidades de toxina diftérica equivalente a las cantidades obtenidas con medios nutritivos, preparados con la

peptona Standard. (En ambos medios las cantidades de Nitrógeno Total fueron aproximadamente iguales).

En numerosos ensayos los resultados fueron mejores con nuestra peptona. Estos ensayos tienen mucha mayor importancia que los resultados obtenidos con medios a los cuales se agregó hidrolizado de caseína y mejoradores, suplementos que compensan deficiencias de la peptona y permiten la obtención de cantidades razonables de toxina.

Con medios nutritivos enriquecidos con hidrolizado de caseína y mejoradores, nuestra peptona nos ha permitido obtener con frecuencia mejores resultados que con otras.

Hemos empleado también nuestra peptona para la elaboración de toxina tetánica. Los resultados de estos ensayos muestran que las peptonas preparadas a un pH elevado entre 2,5-4,00 eran inferiores a las peptonas elaboradas a un pH bajo, es decir 1,5-2,00.

En las condiciones arriba mencionadas hemos preparado peptonas con las siguientes materias primas: carne de ternera, carne de caballo, carne de pescado y carne de ternera y caballo hervidas. Medios nutritivos preparados con estas peptonas sin necesidad de hidrolizado de caseína ni mejoradores permitieron la obtención de cantidades satisfactorias de toxina diftérica.

Únicamente las peptonas preparadas con plasma coagulado fueron inaptas para la obtención de toxina diftérica, salvo que al medio nutritivo se agregara, además, hidrolizado de caseína y mejoradores. En este último caso los valores de toxina diftérica eran tan buenos como aquellos obtenidos con las peptonas primeramente mencionadas.

RESUMEN

Para obtener peptonas aptas es imprescindible eliminar los glúcidos, lo que se consigue conservando la carne durante 5 ó 6 días en la cámara fría.

Las peptonas preparadas a un pH bajo (1,50-2,00) y a alta temperatura (50°) no son aptas para la producción de toxina diftérica; es indiferente la clase de proteína empleada.

Las peptonas así preparadas, en cambio, son útiles para la producción de toxina tetánica.

La relación entre Nitrógeno total y Nitrógeno-amínico tiene al parecer cierta importancia. Los mejores resultados se obtienen con peptonas en las cuales el Nitrógeno-amínico representó el 20-25 % del nitrógeno total.

Si la cantidad de Nitrógeno amínico es inferior al 20 % del nitrógeno total, las peptonas no son aptas. Se describe el procedimiento para la preparación de peptona que se presta para la producción de toxina diftérica.

CUADRO N.º 1

PEPTONA	N. Total en gr./%	N. Amínico en gr./%	N. Amínico en % del N. Total	Desarrollo del Bac. de Löffler	Formación de Toxina
P. D. N.º 1	13,5	3,3	24,4	Bueno	Buena
P. D. N.º 2	14,3	2,6	18,2	Bueno	Muy mala
P. D. N.º 3	14,0	2,82	20,1	Bueno	Buena
P. D. N.º 4	14,0	3,05	21,78	Bueno	Buena
P. D. N.º 5	14,0	3,29	23,5	Bueno	Buena
P. D. N.º 6	14,0	3,05	21,78	Bueno	Buena
P. P. D.	14,0	2,23	16,0	Bueno	Regular
P. Is.	13,1	2,35	18,0	Bueno	Malá
P. Ri.	14,0	3,29	23,5	Bueno	Buena
P. Vu.	12,6	2,82	22,4	Bueno	Buena
P. Di.	14,2	4,03	28,38	Bueno	Regular
P. Sy.	14,0	5,37	38,35	Bueno	Muy mala
P. Martín 1	0,56	0,17	30,3	Bueno	Muy mala
De plasma coagu- lado	0,99	0,13	13,2	Bueno	Muy mala
De plasma coagu- lado	1,26	0,22	17,5	Bueno	Muy mala
De fibrina	1,06	0,14	13,2	Bueno	Muy mala
Carne de ternera .	1,12	0,28	25	Bueno	Muy buena
C. de ternera her- vida	1,37	0,27	19,7	Bueno	Regular
De merluza	1,08	0,29	26,8	Bueno	Buena
De corvina	1,16	0,34	29,3	Bueno	Buena
Carne de caballo .	1,19	0,31	26,3	Bueno	Buena

CUADRO N.º 2

PEPTONA	Acido usado	Digestión a pH.	Temperatura de digestión	N. Total en gr. %
Plasma coagulado	Clorhídrico y pirofosfórico	1,5	50°	0,99
Plasma coagulado	Clorhídrico y pirofosfórico	1,5	50°	1,26
Fibrina	Clorhídrico	1,5	50°	1,06
Carne de ternera hervida	Clorhídrico	1,5	50°	0,73
Carne de ternera	Clorhídrico	1,45	50°	1,20
Carne de ternera	Clorhídrico y sulfúrico	1,5	50°	1,46
Plasma coagulado	Oxálico	1,6	50°	1,22
Carne de ternera	Oxálico y pirofosfórico	1,6	50°	1,33
Carne de ternera	Oxálico	1,6	50°	1,26
Carne de ternera	Sulfúrico	1,5	50°	1,19

N. Aminico en gr. %	N. Aminico en % del N. Total	Desarrollo del Bac. de Löffler	Formación de Toxina
0,13	13,2	Bueno	Muy mala
0,22	17,5	Bueno	Muy mala
0,14	13,2	Bueno	Muy mala
0,12	16,5	Bueno	Muy mala
0,21	17,5	Bueno	Muy mala
0,29	20,0	Bueno	Regular
0,2	16,4	Bueno	Muy mala
0,23	17,6	Bueno	Mala
0,23	18,6	Bueno	Mala
0,21	17,7	Bueno	Mala

CUADRO N.º 3

PEPTONA DE CARNE	N. Total en gr. %	N. amfínico en gr. %	N. amfínico en % del N. Total	NaCl en gr. %	Desarrollo del Bac. de Löffler	Formación de toxina
N.º 1	1,12	0,28	25,0	1,1	Bueno	Muy buena
N.º 2	1,14	0,29	25,4	1,15	Bueno	Muy buena
N.º 3	1,02	0,25	24,5	1,2	Bueno	Muy buena
N.º 4	1,0	0,246	24,6	1,0	Bueno	Muy buena
N.º 5	1,0	0,235	23,5	1,04	Bueno	Muy buena
N.º 6	1,02	0,246	24,2	1,03	Bueno	Muy buena
N.º 7	1,12	0,255	22,77	1,09	Bueno	Muy buena
N.º 8	1,04	0,257	24,71	1,03	Bueno	Muy buena
N.º 9	1,0	0,235	23,5	0,99	Bueno	Muy buena

BIBLIOGRAFÍA

1. DERNBY y WALBUM. — Biochem. Zeitschrift, **137-38**, 1923, fs. 505 a 560.
2. MARTIN. — An. de l'Inst. Pasteur, **12**, 1908, fs. 26.
3. HARTLEY J. — Für Path. und Bakt. **25**, 1922.
4. DERNBY y WALBUM, loc. cit.
5. DAVIDE y DERNBY C. R. — Soc. Biol., **35**, 1921, fs. 1177.
DERNBY y SIVE. — Biochem. Zeitschrift, **132**, 1922, fs. 402.
DERNBY y WALBUM. — loc. cit.
6. DERNBY y WALBUM. — Loc. cit., fs. 523, etc.
7. SORDELLI, FERRARI, GRITZMAN, MODERN, RUFF y REPETTO. — Rev. Inst. Bact. **12**, 1, pág., 83. 1943.
8. STADLER y MEISSNER. — Zentralblatt für Bant., **134**, 1935/36, fs. 102 a 109.