

RECUPERACION DE AGAR-AGAR A PARTIR DE MEDIOS DE CULTIVO USADOS

Ivette Peña*, Jimmy Avendaño*, Dennis León*
Juan J. Alvarado* y Teresa Acuña*

Key Word Index: Agar recuperation, used culture media

RESUMEN

En el presente trabajo se describen métodos para la recuperación de agar a partir de medios de cultivo usados. Los métodos fueron valorados a través de los siguientes parámetros: fuerza de gelificación, temperatura de fusión, temperatura de gelificación y porcentaje de recuperación. Se encontró muy poca variación en cuanto a la temperatura de fusión y de gelificación del agar antes de ser utilizado y posterior a los tratamientos de recuperación. Los rendimientos de los métodos fueron de un 92. 8por ciento de recuperación para el agar nutritivo, 89 por ciento para el Manitolal, 80 por ciento para Mac Conkey, 65 por ciento para agar sangre y un 78 por ciento de recuperación para el agar eosina-azul de metileno (Levine). Los métodos son sencillos y económicos y su alto rendimiento justifica el proceso de recuperación. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984; 5(1): 44 - 51].

INTRODUCCION

El agar-agar es un polisacárido que se extrae de algas de la clase Rhodophyceae, mejor conocidas como algas rojas (8).

A pesar de que la purificación del agar fue descubierta en el siglo XVII, no fue sino hasta en 1882 que su uso se extendió al campo de la bacteriología, cuando Robert Koch encontró que este producto presentaba ventajas sobre la gelatina al usarla en medios de cultivo (4).

Antes de la Segunda Guerra Mundial, Japón tenía el monopolio de producción de agar, debido a que poseía abundantes reservas de algas y una industria bien organizada. Con el surgimiento del conflicto bélico, se cortó el abastecimiento de agar a Estados Unidos, como medida en su contra (4) y surge entonces, como solución inmediata, la recuperación del agar de medios de cultivo usados. Se publicaron varios métodos con tal propósito (1, 2, 3, 7, 9).

Posterior a la II Guerra Mundial, se abandonaron los intentos de recuperar agar debido a que se abocó todo intento a la producción del mismo, esto justifica el hecho de que no haya bibliografía reciente al respecto.

Actualmente el agar-agar ha alcanzado un precio sumamente alto en el mercado mundial, lo cual, unido a la crisis económica por la que atraviesa nuestro país y todos los países en vías de desarrollo, ha limitado su uso en algunos campos, tales como el alimenticio.

El objetivo del presente trabajo es describir métodos adecuados de recuperación de agar a partir de los medios de cultivo usados. Estos métodos deben ser económicos, no deben alterar las características físicas del gel y deben poseer un alto rendimiento, de manera que se justifique el proceso.

* Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

MATERIALES

En vista de que los métodos descritos en la literatura resultan tediosos y poco económicos se procedió a evaluar nuevos métodos. Los métodos aquí descritos constituyen la fusión de algunos principios básicos descritos en la literatura (3,8) y principalmente de aportes originales de los autores.

Para valorar la efectividad de éstos se utilizaron los siguientes parámetros:

temperatura de fusión, temperatura de gelificación, fuerza del gel y porcentaje de recuperación de agar.

A cada uno de los medios de cultivo empleados se les aplicó por triplicado estos parámetros, antes de iniciar el proceso de recuperación y posterior a éste.

Determinación de la temperatura de fusión y de gelificación

Se utilizó un baño maría con un recirculador de agua incorporado; ajustándose el termostato del baño de manera que se produjera un aumento o una disminución gradual de la temperatura.

Se colocaron 3 ml de medio de cultivo con 1.5 por ciento de agar en tubos de 10 x 75 mm, con una perla de vidrio de 0.5 g al fondo y se cubrió el tubo con un tapón de corcho. Se tomó como punto de fusión del agar, la temperatura a la cual al ser invertido el tubo se observaba una clara movilidad de la perla de vidrio, y a su vez, se consideró como temperatura de gelificación aquella a la cual no había movilidad de la perla de vidrio al invertirlo.

Determinación de la fuerza del gel

Para hacer esta determinación se preparó cada medio con una concentración de agar al 1.5 por ciento y se yació en un tubo de 24 mm de diámetro interno y 250 mm de largo, dejándose luego gelificar en posición vertical. A las 24 horas se sacó cuidadosamente el cilindro formado y se cortaron porciones de 1.5 cm de grosor por medio de un sistema de cuchillas paralelas. A la sección cortada, se le midió la fuerza del gel utilizando para ello una balanza adaptada para tal propósito (5).

Métodos de recuperación de agar

Los medios de cultivo usados fueron: eosina-azul de metileno (EMB), Mac Conkey, agar nutritivo, agar sangre y manitol-sal, preparados con agar manufacturado (Difco. Laboratories Inc. Detroit, Michigan 48201 USA). En el caso del agar sangre, se usó base de la casa Gibco (Hyco Diagnostics, Madison Wisconsin 53713 USA), al 1.0 por ciento y se llevó a una concentración final de 1.5 por ciento de agar con el producto Difco (Laboratories Inc).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los medios de cultivo se dividieron en varios grupos de acuerdo a la naturaleza de sus componentes. Estos grupos son:

a. Medios simples sin colorantes: En este grupo están incluidos el agar nutritivo, Sabouraud, Mycosel y otros.

El método óptimo encontrado es el siguiente:

1. Autoclavar a 15 libras de presión 15 minutos, para esterilizar los medios.
2. Congelar a -15°C.
3. Colocar el medio en bolsas de tela de algodón.

4. Lavar en forma alterna con chorros de agua fría y caliente de 15 a 20 veces. El agua debe estar entre 60°C - 70°C y no se debe dejar bajo el chorro de agua caliente por más de 15 segundos porque se empiezan a fundir pequeñas cantidades de agar, disminuyendo el rendimiento del proceso.
5. Fundir y filtrar con papel Whatmann N° 4 un embudo Büchner y succión.

NOTA: Debido a la viscosidad y naturaleza coloidal del agar, es necesario mantener caliente la solución durante la filtración y calentar previamente el Büchner con agua caliente.

6. Dejar gelificar y congelar.
7. Repetir los pasos Nos. 3 y 4.
8. Exprimir la bolsa para eliminar el exceso de agua y colocar las hojuelas resultantes en alcohol al 95 por ciento por dos horas, para deshidratar.
9. Eliminar el exceso de alcohol.
10. Secar a 37°C.
11. Moler las hojuelas una vez secas.

b. Medios selectivos con colorantes: Se dividieron en dos grupos:

- b.1 Con colorantes de fácil extracción: en este grupo se incluyen medios como el agar manitol-sal. Se procede de igual forma que con los medios simples sin colorantes dando énfasis a las lavadas alternas con agua fría y caliente.
- b.2 Con colorantes de difícil extracción: se incluyen medios como el de Eosina-azul de metileno (EMS), Mac Conkey y otros de este tipo.

El método óptimo es el siguiente:

1. Autoclavar los medios a 15 libras de presión, 15 minutos.
2. Congelar a -15°C.
3. Colocar el medio en bolsas de tela de algodón.
4. Lavar en forma alterna con chorros de agua fría y caliente (60°C-70°C) de 15 a 20 veces.
5. Fundir y congelar.
6. Descongelar y lavar igual que en paso N°4.
7. Fundir y agregar un gramo de carbón activado por cada litro de medio de cultivo.
8. Filtrar a través de papel de filtro Whatmann N° 4 y una precapa de tierra diatomácea, la cual se prepara suspendiendo 4 g de la misma en 250 ml de agua. Se vacía sobre el papel de filtro y se aplican 10 libras de succión.
9. Dejar gelificar y congelar.
10. Descongelar y lavar con agua fría, eliminando luego el agua al máximo.
11. Colocar las hojuelas resultantes en alcohol al 95 por ciento por dos horas para deshidratar.
12. Eliminar el alcohol al máximo.
13. Secar a 37°C.
14. Moler las hojuelas secas.

c. Medios que contienen sangre: Incluye el agar sangre y el agar chocolate.

Método óptimo:

1. Autoclavar a 15 libras de presión durante 15 minutos.
2. Diluir al doble con agua destilada y homogenizar.

3. Vaciar en un recipiente que sea más angosto en la parte inferior que en la parte superior.
4. Dejar gelificar
5. Eliminar el sedimento que contiene materia particulada y recoger la parte superior.
6. Congelar a -15°C.
7. Descongelar, colocar en una bolsa de tela de algodón y lavar con chorros de agua fría y caliente en forma alterna. Se repite de 15-20 veces.
8. Fundir y congelar de nuevo.
9. Descongelar y lavar igual que en el paso N°7.
10. Fundir y congelar.
11. Fundir y filtrar a través de una capa de pulpa de papel de aproximadamente 0.5. cm de grosor utilizando un embudo Büchner con succión.
12. Dejar gelificar y congelar.
13. Descongelar y eliminar el agua al máximo exprimiendo la bolsa de tela,
14. Colocar las hojuelas de agar en alcohol al 95 por ciento por dos horas, para deshidratar.
15. Secar a 37°C.
16. Molerlas hojuelas secas.

Para preparar la pulpa de papel se puede utilizar servilletas de papel o toallas de mano. Se humedece, se introduce en una licuadora y se pone ésta a funcionar a baja velocidad por cinco minutos.

El agar recuperado se utiliza en la misma forma que el agar bacteriológico purificado.

Las características físicas del agar recuperado se compararon con las obtenidas de los mismos medios de cultivo, antes del tratamiento de recuperación. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Como se puede observar en el Cuadro 1, se presentan pequeñas variaciones en la temperatura de fusión, la cual no mantiene un comportamiento constante.

En cuanto a la temperatura de gelificación, ésta tiende a aumentar (Cuadro 2). En ambos casos las variaciones son pequeñas.

La fuerza de gelificación (Cuadro 3) se ve afectada por el tratamiento, observándose una disminución de la misma en un 19 por ciento para todos los medios de cultivo empleados a excepción, del agar manitol sal, que sufrió una pérdida considerable de su poder gelificante en un 30 por ciento.

En rendimiento de los métodos descritos (Cuadro 4) es altamente satisfactorio, sobre todo en el caso del agar nutritivo y el agar manitol sal, en los que hay una recuperación casi total del agar. El agar sangre da un porcentaje de endimiento menor (65.6 por ciento) debido a la dificultad para eliminar la proteína coagulada.

Los métodos de recuperación de agar encontrados como óptimos, presentan algunas ventajas sobre otros métodos citados en la literatura. Son económicos debido a que no adicionan sustancias proteicas a los medios (3), no se necesitan grandes cantidades de alcohol como en otros métodos (2). Por otro lado, el porcentaje de recuperación de agar es muy alto, lo cual justifica el proceso en todos los casos.

Los métodos se basan fundamentalmente en congelación-descongelación, lavadas alternas con agua fría y caliente y filtración.

El proceso de congelación-descongelación tiene dos funciones principales:

- a. Remover las impurezas solubles en agua.

b. Separar del 70 por ciento al 90 por ciento del agua de hidratación.

El objetivo de lavar con chorros de agua fría y caliente en forma alterna, es eliminar sustancias solubles tales como colorantes y otras, que no se eliminan por completo mediante el proceso de congelación-descongelación. Por otra parte, la filtración ayuda a eliminar las sustancias insolubles y proteínas coaguladas.

El agar recuperado por medio de los métodos aquí planteados tiene muy buenas características óptimas, ya que presenta mayor transparencia que el agar bacteriológico comercial.

Las propiedades físicas de éste varían, probablemente debido a que el agar es sometido a temperaturas extremas (congelación y fundición). Se cree que ocurren alteraciones moleculares en el agar, posiblemente a nivel de los enlaces de hidrógeno, de los que van a depender las características físicas del polisacárido (6).

Las variaciones que se observan en las propiedades físicas del agar, no impiden de ninguna manera la elaboración de medios de cultivo adecuados, siempre y cuando el medio de cultivo original, a partir del cual se recuperó el agar, fuera de buena calidad.

Cuando el agar recuperado tiene poca fuerza de gelificación, la cantidad que se añade al preparar el medio debe ser mayor, lo cual hace que se disminuya el rendimiento del proceso en términos relativos. Este inconveniente se presentará si el agar recuperado proviene de un medio de cultivo con agar de mala calidad, con poca fuerza de gelificación.

El agar recuperado puede reutilizarse en la elaboración de medios de cultivo, y también como refuerzo en los medios de cultivo cuando fuese necesario.

Es importante señalar aquí, que no se realizaron pruebas para determinar si en el agar proveniente de medios de cultivo selectivos y diferenciales quedan después de todo el proceso de recuperación, restos de sustancias y/o colorantes que puedan en alguna forma inhibir el crecimiento bacteriano. El agar recuperado de medios de cultivo de este tipo, puede utilizarse para reforzar o elaborar medios de cultivo enriquecidos, tales como agar sangre y agar chocolate, obviando de esta manera el peligro de inhibición del crecimiento bacteriano, y también puede utilizarse en la preparación de medios de cultivo iguales a los que sirvieron como fuente del agar recuperado.

Los métodos son sencillos, y el alto rendimiento que se obtiene justifica su uso como solución de emergencia en caso de escases aguda del producto, o como un sistema de economía en los laboratorios de bacteriología.

La recuperación del agar sólo representa una solución parcial al problema de su escasez. Por tal motivo, deben buscarse otras soluciones que permitan el abastecimiento del mismo a gran escala, y una de ellas es explorar la posibilidad de producir agar en nuestro país.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su más profundo agradecimiento al Dr. Edgar Salgado por las facilidades brindadas para llevar a cabo esta investigación y al Dr. Enrique de la Cruz, por la valiosa colaboración prestada en la elaboración y revisión de este trabajo.

CUADRO 1**TEMPERATURA DE FUSION EN °C DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO DE RECUPERACION**

Medio de cultivo usado	Temperatura de fusión en °C	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
E.M.B (Levine)	84	92
Agar sangre	93	91
Mac Conkey	86	86
Manitol-sal	93	89
Agar nutritivo	88	90

CUADRO 2**TEMPERATURA DE GELIFICACION EN °C DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO**

Medios de cultivo usados	Temperatura de gelificación en °C	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
E.M.B (Levine)	35	39
Agar sangre	37	41
Mac Conkey	35	36
Manitol-sal	39	41
Agar Nutritivo	35	36

CUADRO 3

FUERZA DEL GEL EN GRAMOS POR CENTIMETRO CUADRADO DE
 AGAR DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, ANTES Y
 DESPUES DEL TRATAMIENTO DE RECUPERACION

Medios de cultivo	Fuerza del gel en g/cm ²		
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	% de disminución
E.M.B. (Levine)	443.5	362.3	19
Agar sangre	408.0	333.7	19
Mac Conkey	354.4	288.0	19
Manitol-sal	405.0	282.6	30
Agar nutritivo	328.3	267.3	19

CUADRO No. 4

PORCENTAJE DE RECUPERACION DE AGAR DE LOS DIFERENTES
 MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo	Peso en gramos		
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	% recuperación
E.M.B. (Levine)	18.0	14.0	78.0
Agar sangre	18.0	11.8	65.6
Mac Conkey	18.0	14.5	80.6
Manitol - sal	18.0	16.1	89.4
Agar nutritivo	18.0	16.7	92.8

ABSTRACT

This article deals with new methods for agar-agar recuperation from used culture media. The methods evaluated are tested for the following parameters; gel strength, fusion temperature, gelification temperature and percent recovery.

We found very little variation in fusion and gelification temperatures of agar before its utilization and after recuperation procedure.

The yields of the recuperation procedure were:

92.8 % for nutritive agar

89.0 % for Manitol salt agar

80.0 % for Mc Conkey agar

65.0 % for blood agar

78.0 % for eosine metilene blue agar

The methods are simple and economical and their high yield justifies the recuperation of agar agar from used media.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, A. A. Recovery of agar from used media. *J. Bact.* 1943; 46:395-396.
2. Blundell, G. P. A simple procedure of recovery of agar. *Science* 1943; 97(2503):76.
3. Edwards, O. Frazelle. A method for the reclamation of agar. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.* 1942; 51:84.
4. Humm, H. J. Agar a pre-war. Japanese monopoly *Economic Botany* 1947; 1(3). :317-329.
5. Humm, J., L. G. Williams. A study of agar from two Brazilian Seaweeds. *Am. Jour. Bot.* 1948; 35: 287-292.
6. Percival. E. Chemistry of Agaroides, Carragenans and Furcellarans. *J. Sci. Fd. Agric.* 1972; 23:933-940.
7. Roe, A. F. Reclaiming agar for bacteriological use, *Science* 1942; 96(2479):23.
8. Santos, G. A. Quality of Carragenan and agar. IN: *Proceedings of 2nd. Symposium of useful algae* . Edited by Isabella Abbot, Michael S, Foster and Lowise F. Eklund. Published by the Ca. Sea Grant. College, Program UCA, La Jolla, Ca., US, 1980; 200.
9. Thaller, H. I. Reclamation of used agar. *Science* 1942; 96:(2479):23-24.