

Rev Biomed 1999; 10:103-106.

Un método sencillo para generar anaerobiosis en tubos de cultivo.

Comunicación Breve

Evelyn Rodríguez-Cavallini, Enrique de la Cruz.

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, Centro América.

RESUMEN.

Introducción. El cultivo de bacterias anaerobias requiere una atmósfera libre de oxígeno, por lo cual, a pesar de la gran importancia clínica de los anaerobios, el diagnóstico usualmente es sólo microscópico. En este estudio se propone y evalúa un método para preparar tubos de medio de cultivo libres de oxígeno, sencillo, económico y al alcance de cualquier laboratorio.

Material y Métodos. La atmósfera anaerobia se logra durante el proceso de autoclavado y descompresión rápida de los tubos a los que se le ha incorporado un tapón de hule, tapa de rosca y una aguja a través de la cual se elimina la atmósfera aerobia. Para evaluar la efectividad de estos medios se crecieron 45 especies de *Clostridium* y 12 especies de los géneros *Bifidobacterium*, *acteroides*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Actinomyces*, (hasta completar 80 cepas), en tubos anaeróbicos prerreducidos antes de esterilizar (PRAS) y en tubos preparados de acuerdo con el método propuesto.

Resultados. Las 80 cepas de bacterias anaerobias crecieron en los tubos prerreducidos y sin

prerreducir, no hubo diferencias en los grados de turbiedad.

Discusión. El método propuesto para generar anaerobiosis en los tubos de cultivo es una posibilidad al alcance a cualquier laboratorio de bacteriología, para mejorar el diagnóstico, mediante cultivo, de infecciones por bacterias anaerobias. (*Rev Biomed 1999; 10:103-106*)

Palabras clave: Cultivo anaeróbico, anaerobios.

SUMMARY.

A simple method to achieve anaerobiosis in culture media tubes.

Anaerobic bacterial cultures requires an oxygen-free atmosphere. This is why many hospital clinical laboratories only make microscopic diagnosis; in spite of the clinical importance of the anaerobes. This project proposes and evaluates a simple and economic method to prepare anaerobic culture media tubes.

Material and methods. The anaerobic atmosphere within the tubes was achieved by the autoclaving

Solicitud de sobretiros: Dra. Evelyn Rodríguez-Cavallini, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", Costa Rica, América Central.

Recibido el 3/Julio/1998. Aceptado para publicación el 25/Sep./1998.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991025.html>

E Rodríguez-Cavallini, E de la Cruz.

and the rapid decompression of the tubes (using rubber stoppers, needles, and screw caps). 45 species of *Clostridium* and 12 species of the genera *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* and *Actinomyces* (80 strains) were inoculated in the tubes prepared with the proposed method as well as in sterilised pre-reduced tubes, to evaluate growth.

Results. The 80 strains that were tested, grew equally well in both pre-reduced and non pre-reduced media tubes, showing no difference in the degrees of turbidity.

Discussion. The proposed method to achieve anaerobios could be a cheap and easy way to improve the culture and diagnosis of infectious anaerobic bacteria. (*Rev Biomed 1999; 10:103-106*)

Key words: anaerobic culture, anaerobes.

INTRODUCCIÓN.

El cultivo de bacterias anaerobias requiere de una atmósfera libre de oxígeno, que puede lograrse mediante remoción o consumo de este gas y sustitución de la atmósfera con gases libres de oxígeno como bióxido de carbono, nitrógeno o una mezcla de ambos (1). Para ello es necesario contar con equipo de laboratorio que no es de uso común, tal como cilindros de gases (poco prácticos), jarras y sobres de anaerobiosis tipo Gas Pak (que en nuestro medio son costosos) o una cámara anaeróbica (de muy alto valor y uso muy restringido). Es por estas razones que a pesar de la gran importancia clínica de los anaerobios (2) en la gran mayoría de los casos en los que se requiere un cultivo por anaerobios, el diagnóstico se limita a un frotis directo de la muestra a examinar. En el presente estudio se propone y se evalúa un método para preparar tubos de medio de cultivo libres de oxígeno, sencillo, económico y al alcance de cualquier laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se prepararon tubos de caldo infusión cerebro y corazón (BHI) y tubos de BHI a los que se les incorporó un trozo de carne de res de 0.5 cm² de carne cocida desgrasada (BHI-carne), prerreducidos, de acuerdo con las recomendaciones de Holdeman, Cato y Moore (3) para garantizar una atmósfera completamente anaerobia. Ambos lotes de tubos serán el patrón de comparación de crecimiento frente al método propuesto.

Se prepararon tubos de BHI y BHI+ carne en todo idénticos a los anteriores, pero sin prerreducir y sin emplear gases libres de oxígeno (Bióxido de Carbono o Nitrógeno). Para crear la atmósfera anaerobia, el medio de cultivo se dispuso en volúmenes de 5 ml en tubos 16 x 100 mm con tapón de hule (nuevo) y tapa de rosca a la que se le hizo un orificio de 1 mm; a través de dicho orificio se introdujo una aguja #27. Los tubos bien cerrados se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C.

Concluido el ciclo de esterilización, se descompresión rápidamente la autoclave y con guantes protectores se precedió a sacar las agujas en cada uno de los tubos que se encontraban aún en proceso de ebullición. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron descartados todos aquellos que presentaran evidencia de oxidación, de acuerdo con el indicador de resazurina que tienen incorporado.

Se prepararon cultivos puros de bacterias anaerobias cultivadas durante 48 horas en tubos de Chopped Meat prerreducidos (3). A cada cultivo se le hizo recuento en cámara de Petroff-Hausser y las diluciones correspondientes, en medios prerreducidos y empleando técnica anaeróbica, de manera que se inocularan 10³ bacterias por tubo. La inoculación se hizo empleando aguja y jeringa en cada uno de los siguientes tubos: BHI, BHI + carne prerreducidos, BHI y BHI + carne sin prerreducir (preparados como se señaló antes). Se probaron 80 cepas de bacterias anaerobias proporcionadas por el Laboratorio de Anaerobios de la Facultad de Microbiología, Universidad de

Costa Rica, mantenidas a -70°C o en tierra estéril a temperatura ambiente en el caso de especies esporuladas; se incluyeron además cepas de *Clostridium* ATCC, mantenidas a -70°C . Se incluyeron 44 especies de *Clostridium*: *C. botulinum* tipos A, B, C, D, E, F y G (ATCC 19397, 7949, 17782, 27517, 177886, 25764 y 27322), *C. perfringens* (ATCC 13124, UCR 166-8, UCR 166-24), *C. tetani* (ATCC 19405, UCR 155-15, UCR U4, U5, U7 y U10), *C. sporogenes* (ATCC 7955 Y UCR 179-13), *C. sphenoides* (UCR 175-8), *C. cadaveris* (UCR 179-6), *C. carnis* (UCR 177-6), *C. butyricum* (UCR 174-9), *C. sticklandii* (UCR 173-10 173-4), *C. acetobutylicum* (UCR 157-10), *C. haemolyticum* (UCR 173-5), *C. bifermentans* (UCR 173-2) *C. ramosum* (UCR 181-9), *C. cochlearium* (UCR 181-15), *C. tyrobutyricum* (UCR 157-2), *C. lituseburense* (UCR 157-3), *C. putrificum* (UCR 164-12), *C. histolyticum* (UCR 163-4), *C. beijerinckii* (UCR 163-4 y M 7531 D), *C. putrefasciens* (UCR 155-19), *C. celatum* (UCR 170-3), *C. sardiniense* (UCR 170-2), *C. sartogoforme* (UCR 158-14), *C. puniceum* (UCR 165-15), *C. hastiforme-subterminale* (UCR 165-14), *C. oceanicum* (UCR 179-3), *C. spiroforme* (UCR 159-3), *C. villosum* (UCR 159-3) (UCR 159- *C. baratii* (UCR 159-6), *C. symbiosum* (UCR 159-10), *C. irregulare* (UCR 159-13), *C. novyi* B (UCR 156-19 y 210-14), *C. sordellii* (UCR 166-11), *C. limosum* (UCR 182-2), *C. absonum* (UCR 182-13), *C. clostridioforme* (UCR 183-11), *C. novyi* A (UCR 170-12) y *C. aciduricii* (UCR 153-2). Además: *Propionibacterium acnes* (UCR A-1 y A-6) y *P. granulosum* (UCR A-2 y A-7), *Eubacterium lentum* (UCR A-3), *Actinomyces viscosus* (UCR A-4) y *A. isarellii* (UCR A-5), *Bifidobacterium adolescentis* (M 159-A y 753021), *B. breve* (M 7524A) y *B. longoum* (M 7542 A), *Bacteroides* sp. (M 7527 A), *B. ovatus* (M 7533 A), *B. fragillis* (M 7522 A y M 7527), *B. capillosus* (M 7532 D) y *B. vulgatus* (M 754120). *Lactobacillus fermentum* (M 7538 B y 754213).

Los tubos así inoculados fueron incubados a

35°C y se hicieron lecturas evaluando turbiedad (por cruces de crecimiento) a las 24 y a las 48 horas.

RESULTADOS.

Preparación de los medios de cultivo: alrededor del 90% de cada lote de tubos de BHI + carne sin prerreducir no mostraron evidencia de oxidación después de que se enfriaron a temperatura ambiente; únicamente el 50% de cada lote de tubos de BHI sin carne, no presentaron evidencia de oxidación, aún cuando el lote de tubos fuera pequeño y se trabajara lo más rápidamente posible después de autoclavar. Los tubos así preparados han permanecido sin evidencia de oxidación por más de ocho meses.

Crecimiento de bacterias anaerobias: todas las cepas de bacterias anaerobias probadas crecieron en los tubos de BHI con o sin carne; no hubo diferencia de turbiedad a las 24 horas ni a las 48 horas entre los tubos prerreducidos y sin prerreducir. Se obtuvieron diferentes grados de turbiedad en los tubos dependiendo de la presencia o ausencia de carne, pero no por la utilización de medios prerreducidos o sin prerreducir.

DISCUSION.

El método que se propone para preparar tubos de medio de cultivo libres de oxígeno demostró ser exitoso aún para el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas. El principio en el que se fundamenta es sencillo, pues durante el proceso de autoclavado y a través de la aguja incorporada en cada tubo de cultivo, la atmósfera inicial (con oxígeno) es removida y sustituida por vapor de medio (sin oxígeno), por lo que los tubos quedan en condiciones anaerobias. La entrada de aire a través de la aguja se impide debido a que ésta es removida mientras los tubos de medio de cultivo permanecen muy calientes, idealmente en ebullición. Cuando los tubos se enfrían, la atmósfera de vapor se condensa y permanecen al

E Rodríguez-Cavallini, E de la Cruz.

vacío. Esta condición ofrece una ventaja adicional, pues facilita la inoculación de la muestra a cultivar cuando se emplea una jeringa con aguja que perfora el tapón de hule de los tubos así preparados.

El procedimiento mediante el cual se remueven las agujas en los tubos que salen del autoclave debe ser muy rápido, por lo que no es conveniente preparar lotes grandes unidades. La incorporación del trozo de carne (que tiene un efecto reductor) en el medio de cultivo, se hace necesaria para evitar su reoxidación. Aún así siempre hay un bajo porcentaje de tubos que se reoxidan de acuerdo con el indicador de resazurina (10%), y que deben descartarse, cosa que también sucede cuando se preparan los tubos prerreducidos en la forma usual (3).

Debido a que la inoculación de los tubos se haría a través de una nueva perforación con aguja en los tapones de hule, se hace necesario el empleo de tapones nuevos y ajustados en la preparación de los medios. El uso de tapas de rosca se hace también necesario para evitar que el tapón se suelte durante el proceso de autoclavado y contribuya a evitar la incorporación de aire en los tubos ya preparados.

Diversas cepas de clostridios muy estrictos en cuanto a la anaerobiosis que requieren, tales como *Clostridium novyi*, *C. tetani* y *C. haemolyticum* (4) no presentaron diferencias en cuanto al tiempo de crecimiento y turbiedad alcanzada, como tampoco lo hizo ninguna de las otras especies probadas.

El medio BHI + carne, así preparado, es un excelente medio de cultivo que puede permitir el aislamiento primario de gran cantidad de bacterias anaerobias. El procedimiento señalado ofrece la posibilidad de preparar de igual forma otros medios de cultivo de acuerdo con las necesidades de cada laboratorio, incluyendo la incorporación de agar.

Se ofrece así una posibilidad, al alcance de cualquier laboratorio bacteriológico, para mejorar considerablemente el diagnóstico de problemas infecciosos por bacterias anaerobias, mediante

frotis directo, aislamiento primario y algunas pruebas básicas para identificación. De esta forma sería posible manipular bacterias anaerobias en cualquier laboratorio microbiológico sin contar con equipos de alto costo.

AGRADECIMIENTO.

Agradecemos a Pablo Vargas Dengo y a William Castillo Rojas por su ayuda técnica.

REFERENCIAS.

- 1.- Sumnanen P, Bavon E Jo, Citron DM, Strong C, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual 5th ed. California: Star; 1993. p. 230.
- 2.- Baron E, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 9th ed. St. Louis: Mosby; 1994. p. 958.
- 3.- Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual 4th ed. Blacksburg: Virginia: Polytechnic Institute and State University; 1977. p. 152.
- 4.- Hatheway. CL. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3:66-98.