

Efecto de la resiembra continua en las características bioquímicas de una colección bacteriana

Luz Adriana Ramírez Sánchez (1), Claudia Leticia Mendoza Macías (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [adry3ors@gmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [cl.mendoza@ugto.mx]

Resumen

En la actualidad es muy importante para el área de la investigación así como docencia y biotecnología conservar apropiadamente las colecciones bacterianas y mantener con el tiempo sus características fenotípicas y genotípicas para asegurar resultados reproducibles. El método más simple y sencillo para conservación, es la resiembra periódica en placas de agar, sin embargo puede presentar inconvenientes como contaminación. Se evaluó el efecto del cultivo continuo sobre características bioquímicas y morfológicas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Salmonella sp.*, empleando 16 pases continuos en agar nutritivo. Esta técnica de conservación no alteró las características bioquímicas de los microorganismos estudiados y solo *P. aeruginosa* mostró alteración morfológica atribuible al efecto del cultivo continuo. Se corroboró el inconveniente de esta técnica como método único de conservación al contaminarse uno de los cultivos de *Salmonella sp.* Aunque el método de conservación bacteriana mantiene las características bioquímicas de los microorganismos evaluados, no se recomienda como único método de conservación dada la posibilidad de contaminación y/o alteraciones en la morfología celular. Es necesario determinar el efecto de la resiembra continua para los microorganismos que se deseen conservar con este método y utilizar un método alternativo y/o implementar uno que sea accesible y de bajo costo.

Abstract

Today it is very important for research, teaching and biotechnology areas properly preserve and maintain over time the phenotypic and genotypic characteristics of bacterial collections in order to ensure reproducible results. The simplest and easiest method of conservation is periodic replanting on agar plates, however drawbacks such as pollution often occurs. The effect of continuous culture on biochemical and morphological characteristics of *S. aureus*, *Salmonella sp* and *P. aeruginosa* was evaluated with 16 continual passage in nutrient agar. This preservation technique did not alter the biochemical characteristics of the microorganisms studied and only *P. aeruginosa* showed morphological changes attributable to the effect of continuous culture. The drawback of this technique as the sole method of conservation through contamination of the cultures of *Salmonella sp* was confirmed. Although the bacterial method of conservation keeps the biochemical characteristics of the microorganisms tested, it is not recommended as the only method of conservation due to the risk of contamination and / or cell morphology alterations. In order to employ this methodology, is mandatory to evaluate the effect of continuous replanting for the preserved microorganisms and select an alternative method and / or implement one that is accessible and inexpensive.

Palabras Clave

Conservación bacteriana, pureza, subcultivos, morfología bacteriana, contaminación.

INTRODUCCIÓN

Las colecciones bacterianas son de gran utilidad en el ámbito tanto de investigación como de docencia y biotecnología, por tanto, es importante contar con bacterias cuyas características fenotípicas y genotípicas no se modifiquen con el tiempo y de esta manera garantizar resultados reproducibles.

Existen disponibles diferentes métodos para la conservación de estas colecciones, entre los que se encuentran, la resiembra periódica en medios sólidos y/o líquidos, los discos de gelatina, la liofilización y la congelación a -70°C [1-5]. El método más simple y más sencillo de implementar, es la resiembra periódica en placas de agar. [2]

En el Programa de Químico Farmacéutico Biólogo de la DCNE de la Universidad de Guanajuato, a través del Taller de Bacteriología y Micología Médica, el estudiante desarrolla la capacidad de aplicar los conocimientos en materia. Por lo anterior, es importante para fines de docencia contar con una colección de microorganismos que sean conservados de manera que preserven las características fenotípicas, genotípicas y de viabilidad, para ser utilizados en el Taller.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto sobre características bioquímicas de la resiembra continua en agares sólidos de tres microorganismos de una colección con fines de docencia, estableciendo el plazo máximo de conservación de los microorganismos con esta metodología y de ésta manera diseñar un protocolo para la optimización de la técnica de conservación [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Se llevó a cabo un estudio experimental en tres microorganismos de una colección bacteriana utilizada en el Taller de Bacteriología y Micología Médica: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*, conservados a -70°C en medio Luria Bertani con glicerol al 10% (stocks).

Medios de cultivo

Se utilizó agar nutritivo (Beckton Dickinson) para las resiembras periódicas de los microorganismos; agar nutritivo adicionado con sangre para la determinación de la prueba de sensibilidad a bacitracina; medios selectivos como agar MacConkey para *Salmonella sp.* y *P. aeruginosa* (Beckton Dickinson) y Sal y Manitol para *S. aureus* (Beckton Dickinson) para evaluación de morfología colonial y características bioquímicas de los microorganismos.

Técnica de cultivo continuo

Las resiembras se realizaron en placas de agar nutritivo, incubadas a 37°C por 18-24 horas a partir de $15\mu\text{l}$ del stock en glicerol, considerándose este cultivo el tiempo cero de referencia para la comparación de las resiembras subsecuentes. Se llevó a cabo la resiembra periódica cada 2 días a partir del cultivo a tiempo cero para evaluar las características bioquímicas de las bacterias a diferentes periodos de tiempo de subcultivo, a cada resiembra se le denominó pase, obteniéndose para cada microorganismo 1, 2, 4, 8, 12 y 16 pases.

Pureza de los microorganismos y Tinción de Gram

Se evaluó la pureza de los microorganismos a partir de su crecimiento en agar nutritivo para corroborar su homogeneidad. La morfología se evaluó a partir del crecimiento en agar nutritivo en cada pase y se realizó una tinción de Gram de las colonias aisladas para determinar la compatibilidad con la morfología esperada para cada microorganismo.

Pruebas bioquímicas

Todas las pruebas bioquímicas se realizaron a partir de los diferentes pases a 18-24h de cultivo en agar nutritivo a 37°C .

Técnicas automatizadas (Galería API RapiD20E y API Staph)

Se emplearon galerías de los sistemas API Staph (Biomerieux) para las pruebas bioquímicas en *S. aureus* y API RapiD20E (Biomerieux) para *Salmonella sp.* y *P. aeruginosa* siguiendo los procedimientos establecidos por el fabricante. Se realizó la lectura e interpretación de las galerías para obtener los perfiles numéricos (código de 7 dígitos) correspondientes a las determinaciones

bioquímicas que incluye la galería para cada microorganismo.

Pruebas bioquímicas manuales

- *Prueba de oxidasa*

Se realizó con discos comerciales impregnados con reactivo Diclorhidrato de N-N'-N'-N'- Tetrametil-p-fenilendiamina (BIO-RAD) a partir de una asada del cultivo correspondiente de acuerdo al protocolo establecido por la casa comercial.

- *Prueba de movilidad, fermentación de glucosa, producción de H₂S, gas y ácido, rojo de metilo.*

Se llevó a cabo la determinación de éstas pruebas en medios de cultivo en tubo inoculando ya sea por picadura vertical o agitando suavemente en el medio, los resultados se interpretaron 18-24h después de su incubación a 37°C.

- *Prueba de catalasa*

Se realizó la exposición de una asada de las colonias a evaluar de *S. aureus* con una gota de solución de H₂O₂ al 3% (Jaloma), comprobando la formación de burbujas. Se utilizaron colonias de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* como controles negativo y positivo, respectivamente.

- *Prueba de coagulasa*

Se empleó para evaluar la presencia de coagulasa ligada en *S. aureus*. Una suspensión de los microorganismos en solución de NaCl 0.8% se mezcló con plasma citratado en portaobjetos y se evaluó la formación de una aglutinación. Se utilizaron colonias de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* como controles negativo y positivo, respectivamente.

- *Prueba de sensibilidad a bacitracina*

Se aplicó un disco de bacitracina (TipiBact A, BIO-RAD) sobre un área de 4cm² de inóculo de *S. aureus* en agar sangre y se incubó en microaerofilia a 37°C por 18-24 horas. Se evaluó la sensibilidad del microorganismo en términos de la aparición de un halo alrededor del disco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología colonial y pureza

Después de realizados los cultivos continuos, no se observaron diferencias en la morfología colonial en agar nutritivo para todos los pases de *S. aureus* y *P. aeruginosa* así mismo las colonias observadas fueron homogéneas lo que demostró la pureza de estos, independientemente del número de pases. Como se observa en la IMAGEN 1, las colonias de *S. aureus* son color amarillo oro, redondas, con bordes definidos, convexas y aspecto cremoso, superficies lisas, y opacas; las colonias de *P. aeruginosa* son color blanco, pequeñas, redondas, con bordes definidos y lisos, aspecto mucoso, brillosas y traslúcidas. Para *Salmonella sp.*, las colonias son colonias color crema, redondas, con bordes definidos y lisos, convexas y aspecto húmedo y translúcidas (IMAGEN 1, B), en todos los pases excepto el 12, cuya morfología sugiere una posible contaminación (IMAGEN 1, B-12). Lo anterior da evidencia de la importancia de contar con un método alternativo para la conservación de microorganismos debido al inconveniente de la contaminación descrito para el método de resiembra continua [1,2].

Morfología microscópica

Los resultados para tinción de Gram señalan que en los diferentes pases *S. aureus* y *Salmonella sp.* conservaron la misma morfología, cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, respectivamente (IMAGEN 2); en los pases 12 y 16 para *P. aeruginosa* se observaron bacilos Gram negativos con un acortamiento gradual comparados con los pases previos (IMAGEN 2, C-12, C-16). Esto muestra que *P. aeruginosa* presentó una modificación en el tamaño de sus bacilos que pudiera deberse al tiempo en cultivo ya que se ha reportado para otros microorganismos alteraciones en la morfología bacteriana producto de la exposición a condiciones que generan estrés [1,4].

Pruebas bioquímicas

Los resultados obtenidos tanto a partir de los sistemas automatizados como manuales y el crecimiento en agares selectivos mostraron que no

existió modificación en los microorganismos atribuible a los subcultivos y que hay un porcentaje de correlación entre pases del 100% con respecto al tiempo cero o el primer pase de los stocks (Tabla 1); a excepción del pase 12 para *Salmonella sp.* que confirmó una contaminación. De esta manera, se corroboró que las características bioquímicas de los microorganismos estudiados no se alteran con el cultivo continuo en el tiempo evaluado y que no se presentaron cambios transitorios a nivel bioquímico.

CONCLUSIONES

Después de llevar a cabo el cultivo periódico hasta 16 pases de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Salmonella sp.*, las características bioquímicas estos microorganismos no se modificaron. Por tanto, el método de conservación bacteriana por resiembra continua es adecuado hasta 16 pases. Sin embargo, ante la posibilidad de tener alguna contaminación es necesario contar con un método alternativo para su conservación y/o implementar uno que sea accesible y de bajo costo. Los resultados en morfología bacteriana para *P. aeruginosa* indican que es necesario determinar el efecto de la resiembra continua para los microorganismos que se deseen conservar con este método por que pudieran alterarse en función al microorganismo conservado, ya que para *S. aureus* y *Salmonella sp.*, no se observaron cambios.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado de la Universidad de Guanajuato a través

del programa “Veranos de Investigación Científica UG 2015” por la beca otorgada para la realización de este proyecto. A Ma. de los Ángeles Rodríguez Salazar y Gregorio Murrieta Milán por la colaboración en el proceso experimental de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

1. Sánchez Leal, L. C., Corrales Ramírez, L. C., (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. NOVA- Publicación científica, 3(4).
2. Weng, Alemán, Z., Junco Díaz, R.A., Díaz Rosas, O. E., Álvarez Molina, I., Beltrán Díaz, J. R., Rodríguez Salazar, M.C., (2005). Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa variable. Revista Cubana Higiene y Epid. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. 43(2).
3. Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. & Higton G. (2001). Industrial Microbiology, an Introduction. Blackwell Science. 288pp.
4. Young, K. D., (2007). Bacterial morphology: Why have different shapes. NIH-PA Curr Opin Microbiol. 10(6), 596-600.
5. Sánchez Leal, L. C., Corrales Ramírez, L. C., (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. NOVA- Publicación científica, 3(3).
6. Jawetz, Melenick & Adelberg's (2005). Estafilococcus. Bacilos entéricos gramnegativos. Pseudomonas. En Editorial El Manual Moderno S.A de C.V. (18° Ed.), Microbiología médica (pp. 219-264). México D.F.

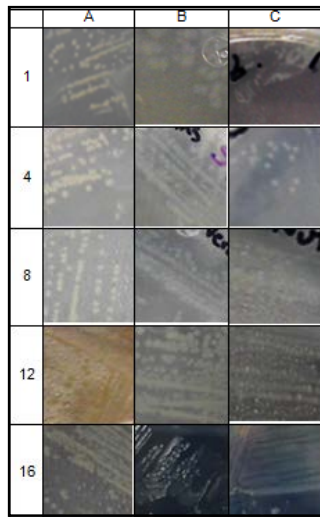


IMAGEN 1. Morfología colonial para: A) *S.aureus.* , B) *Salmonella sp.*, C) *P. aeruginosa.* A diferentes pases de cultivo en agar nutritivo.

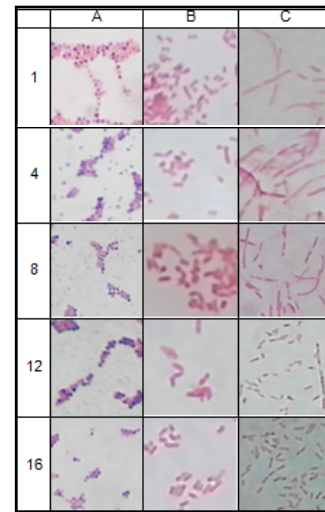


IMAGEN 2. Tinción de Gram para: A) *S.aureus.* , B) *Salmonella sp.* , C) *P. aeruginosa.* A diferentes pases en agar nutritivo.

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas para *S. aureus*, *P.aeruginosa* y *Salmonella sp.*

Prueba bioquímica	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>Salmonella sp.*</i>	
	Pase 1.	Correlación con los demás pases (%).	Pase 1.	Correlación con los demás pases (%).	Pase 1.	Correlación con los demás pases (%).
Galería API RapiD 20E	NA	NA	0250000	100	6245251	100
Galería API Staph	673611	100	NA	NA	NA	NA
Catalasa	+	100	NA	NA	NA	NA
Coagulasa	+	100	NA	NA	NA	NA
Sensibilidad a bacitracina	R	100	NA	NA	NA	NA
Movilidad	NA	NA	+	100	+	100
Rojo de Metilo	NA	NA	-	100	+	100
Producción de gas	NA	NA	-	100	-	100
Formación de H ₂ S	NA	NA	-	100	+	100
Alcalinización del medio	NA	NA	+	100	-	100
Crecimiento agar Sal y Manitol	Colonias amarillas fermentadoras de manitol	100	NA	NA	NA	NA
Crecimiento agar MacConkey	NA	NA	Colonias no fermentadoras de lactosa	100	Colonias no fermentadoras de lactosa	100

NA: No aplica; R: Resistente; *No se incluyó el pase 12 en la correlación ya que se demostró una contaminación por otro microorganismo