

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente

UTILIZACIÓN DE FORMALDEHÍDO Y TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA INACTIVACIÓN DE CULTIVOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Lic. Yamila Lebeque Pérez, Lic. Guillermo Cobas Pupo, Lic. Humberto J. Morris Quevedo, Lic. Juan F. Almenares Verdecia y Lic. Miladis I. Camacho Pozo

RESUMEN

Se evaluó la inactivación de cultivos en caldo nutriente de *Pseudomonas aeruginosa* (serotipo O11), con el empleo de formaldehído en concentraciones de 0,1, 0,3, 0,6, 1 y 3 %, y la inactivación mediante tratamiento térmico utilizando el baño de María (100 °C). La efectividad de ambos métodos, se determinó evaluando visualmente el crecimiento del cultivo una vez inactivado, en placas con agar triptona soya. Los mejores resultados, en cuanto a la concentración de formaldehído necesaria para lograr la inactivación total de los cultivos en un período de 24 h, se obtuvieron en las variantes donde se aplicó formaldehído 1 y 3 %. Se demostró la conveniencia del uso del tratamiento térmico, para los casos en que se persiga el aislamiento y la purificación de componentes celulares termoestables, porque resulta del todo efectivo y permite optimizar el tiempo del proceso de inactivación.

DeCS: PSEUDOMONAS AERUGINOSA/aislamiento & purificación; FORMALDEHIDO; RESISTENCIA MICROBIANA A LAS DROGAS; TRATAMIENTO TÉRMICO.

Pseudomonas aeruginosa constituye uno de los agentes patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos, por lo que es reconocida como un gran problema de salud al nivel mundial. En Cuba, esta bacteria se ha mantenido entre los 3 primeros microorganismos de alto riesgo, causante de sepsis en los diferentes servicios hospitalarios.^{1, 2}

La elevada resistencia que manifiesta este microorganismo a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica, es el resultado de las pro-

teínas presentes en la membrana celular externa que limitan la penetración del fármaco al sitio de acción.^{2,3} La variedad de proteínas de membrana es amplia y actúan como elementos fundamentales en la estabilidad e integridad de la membrana.²

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que puede considerarse un complejo antigénico, en el que la mayoría de sus estructuras celulares presentan propiedades antigénicas. Dentro de estos antígenos, el lipopolisacárido (LPS) es el que se encuentra en mayor cantidad en la

pared celular y resulta altamente inmunogénico por la variedad de efectos que produce.⁴

Estos componentes celulares, una vez lograda su purificación y caracterización, constituyen un punto de partida para la obtención de biopreparados más complejos como sueros policlonales, anticuerpos monoclonales y preparados vacunales de gran importancia económica y social.⁵

El método de inactivación, más comúnmente usado para los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* destinados a procesos de aislamiento y purificación de componentes celulares, es la aplicación de formaldehído 0,3 % con un período de reposo de 24 h, aunque en la mayoría de los casos no se refieren los resultados de las pruebas de esterilidad.⁴

El propósito de este trabajo fue seleccionar la concentración adecuada de formaldehído a utilizar en la inactivación de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, así como, evaluar el uso del tratamiento térmico como método de inactivación.

MÉTODOS

Se utilizó una cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* (serotipo 011) conservada en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). A partir de la cepa se obtuvieron 11 cultivos en medio caldo triptona soya (1 000 mL), incubados a 37 °C por 24 h, e iniciados a partir de preinóculos de 5 mL crecidos en iguales condiciones.

Los cultivos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron usados en un primer experimento de inactivación y una vez transcurrido el tiempo de incubación, fueron inactivados con formaldehído en concentraciones de 0,1, 0,3, 0,6, 1 y 3 % respectivamente. Otros 5 cultivos denominados 6, 7, 8, 9 y 10 fueron usados como réplicas en un segundo experi-

mento de inactivación con formaldehído, aplicando las mismas concentraciones y siguiendo el mismo orden del experimento anterior. El cultivo restante denominado 11, fue inactivado con tratamiento térmico (baño de María a 100 °C) durante 2 h.

Las pruebas de esterilidad para los cultivos inactivados con formaldehído se realizaron a las 6, 12 y 24 h después de la inactivación y para el cultivo 11 inactivado con calor, estas se realizaron a las 2, 4 y 6 posteriores. Las pruebas fueron realizadas sembrando asadas de los cultivos en placas con medio agar triptona soya, que luego fueron incubadas a 37 °C por 24 h, para evaluar visualmente la existencia de crecimiento bacteriano. Fueron sembradas 10 placas por cultivo, en cada una de las pruebas realizadas. Las pruebas para los cultivos 1, 2, 3, 4 y 5 se realizaron agitando el cultivo antes de la siembra y permaneciendo en reposo entre una prueba y otra, mientras que las réplicas, solo fueron agitadas a las 24 h, permaneciendo en reposo el resto del tiempo. El cultivo 11 fue debidamente agitado, siempre antes de las siembras.

RESULTADOS

El crecimiento bacteriano de las cepas en el medio de producción fue adecuado, en función de la presencia del pigmento verde azulado, típico de esta bacteria y la formación de una nata bacteriana.

La tabla 1 presenta los resultados del primer experimento de inactivación. En los cultivos 1, 2 y 3 se observó crecimiento bacteriano hasta las 24 h después de tratados con formaldehído, mientras que, en los cultivos 4 y 5 solo se observó crecimiento hasta las 12 h después de la inactivación y se mostraron inactivos a partir de las 24 h.

En la tabla 2 se muestran los resultados de la inactivación con formaldehído de los cultivos 6, 7, 8, 9 y 10, los cuales fueron

mantenidos en reposo hasta realizar las pruebas de esterilidad a las 24 h. El cultivo 6 mostró crecimiento bacteriano en las siembras realizadas a las 6 y 24 h, los cultivos 7 y 8 solo mostraron crecimiento a las 24 h de inactivados, mientras que, los cultivos 9 y 10 no presentaron crecimiento en ninguna de las pruebas.

Las siembras realizadas a partir del cultivo 11, que fue sometido a tratamiento térmico, no evidenciaron crecimiento bacteriano alguno.

DISCUSIÓN

Estos resultados indican que las bajas concentraciones de formaldehído empleadas (0,1, 0,3 y 0,6 %), unidas a la oxigena-

ción de los cultivos mediante la agitación, resultan ineficaces para lograr la inactivación en un período de 24 h. Este comportamiento alude a lo planteado por algunos autores, cuando refieren que *Pseudomonas aeruginosa* resulta más resistente a los antisépticos usuales que otros bacilos gramnegativos⁶ y que se trata de un microorganismo aerobio, aunque puede utilizar nitrato como aceptor de electrones y crecer en forma anaerobia.⁷

Sin embargo, la aplicación de estas mismas concentraciones unidas a un período de reposo de 24 h puede proporcionar un falso resultado de inactivación en la prueba de esterilidad, como ocurrió en el segundo experimento. Esto tal vez explica su uso en otros trabajos⁴ y sugiere la necesidad de

Tabla 1. Pruebas de esterilidad de los cultivos 1, 2, 3, 4 y 5

Cultivos	Concentración de formaldehído	Placas sembradas			Total	Placas con crecimiento						Total	% *pc
		6 h	12 h	24 h		6 h	%	12 h	%	24 h	%		
1	0,1 %	10	10	10	30	10	100	10	100	10	100	30	100
2	0,3 %	10	10	10	30	10	100	10	100	10	100	30	100
3	0,6 %	10	10	10	30	10	100	10	100	10	100	30	100
4	1 %	10	10	10	30	10	100	10	100	0	0	20	66,6
5	3 %	10	10	10	30	10	100	10	100	0	0	20	66,6
Total	-	50	50	50	150	50	-	50	-	30	-	130	86,6

*pc: placas con crecimiento.

Tabla 2. Pruebas de esterilidad de los cultivos 6, 7, 8, 9 y 10

Cultivos	Concentración de formaldehído	Placas sembradas			Total	Placas con crecimiento						Total	% *pc
		6 h	12 h	24 h		6 h	%	12 h	%	24 h	%		
6	0,1 %	10	10	10	30	6	60	0	0	10	100	16	53,3
7	0,3 %	10	10	10	30	0	0	0	0	10	100	10	33,3
8	0,6 %	10	10	10	30	0	0	0	0	10	100	10	33,3
9	1 %	10	10	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0
10	3 %	10	10	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	-	50	50	50	150	6	-	0	-	30	-	36	24

*pc: placas con crecimiento.

homogeneizar el cultivo ya inactivado, antes de realizar las pruebas de esterilidad. Por otro lado, la presencia de crecimiento en el cultivo 6 a las 6 h, es atribuible probablemente, al poco tiempo transcurrido después de la adición del formaldehído.

Es evidente que el empleo del formaldehído en concentraciones de 1 y 3 % resulta efectivo en un período de 24 h, por lo que se sugiere su utilización al 1 % como mejor variante de este método de inactivación, porque se obtienen similares resultados con una menor cantidad de reactivo.

La aplicación del tratamiento térmico en las condiciones experimentales descritas, resulta del todo efectiva para la inactivación de los cultivos. Con el empleo de este método, el tiempo necesario para lograr el resultado se ve reducido en 91,6 %, en comparación con la aplicación del formaldehído, lo cual contribuye a la optimización del proceso en cuestión e implica un ahorro de reactivo.

La inactivación en baño de María a 100 °C es un método usado comúnmente en los laboratorios para la obtención de antígenos bacterianos.⁸ Aunque *Pseudomonas aeruginosa* muere por calentamiento a 55 °C durante 1 h,⁶ los procesos de aislamiento y purificación de componentes celulares termoestables, como el LPS, pueden verse beneficiados con el tratamiento térmico empleado, porque las altas temperaturas pueden provocar la desnaturalización de componentes celulares termolábiles como las proteínas, contribuyendo a la eliminación de estas como posibles contaminantes.

Las ventajas de los resultados obtenidos están dadas no solo por la evaluación de la efectividad de los métodos utilizados, sino porque aportan confiabilidad en los métodos de inactivación para la manipulación del microorganismo por parte del personal calificado, lo que puede ser tomado en cuenta también para su tratamiento y eliminación en diferentes áreas y condiciones de trabajo.

SUMMARY

The inactivation of culture in a nutrient broth of *Pseudomonas aeruginosa* (serotype 011) was evaluated by using formaldehyde at concentrations of 0,1, 0,3, 0,6, 1 and 3% and inactivation by heat treatment using a bain-marie at 100°C. The effectiveness of both methods was determined by visually evaluating the growth of the inactivated culture on plates with tryptone soy agar. Regarding necessary formaldehyde concentration for obtaining the total inactivation of cultures in 24hours, the best results were achieved in variants that applied formaldehyde at 1 and 3%. The study showed that it is convenient to use the heat treatment for isolation and purification of heat-stable cellular components because it is very effective and allows optimizing the inactivation process time.

Subject headings: PSEUDOMONAS AERUGINOSA/isolation & purification; FORMALDEHYDE; DRUG RESISTANCE, MICROBIAL; THERMIC TREATMENT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esnard SC. Identificación y caracterización de bacilos gramnegativos no fermentadores aislados en el medio hospitalario. Rev Cubana Hig Epidemiol 1999;35(1):30-7.
2. Cobas G, Esnard SC, Ayala J, Almenares JF, Sarmiento R, Fontaine R. Purificación de proteínas de membrana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Cubana Química 1999;11(1):86-93.
3. Nicas TJ, Hancock RE. Outer protein HI of *Pseudomonas aeruginosa*. Involvement adaptative and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate polymixin and gentamycin. J Bact 1996;143:872-8.
4. Cobas G, Sarmiento R, Martínez C, Snard SC. Aislamiento y separación del LPS de la cepa MP-275 de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Cubana Química 1997;9(1):61-5.

5. Hedmstrom RC. Antibody response of infected mice outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* . Infect Immun 1984;46(19):49-53.
6. Zinsser H. Microbiología. La Habana: Ed. Revolucionaria; 1984:370.
7. Hernández J, Dubón F. Sistemática bacteriana. 3. ed. Valencia: Copi3n S. L. Avd. Blasco Ibañez, 1992; 4.2-4.5.
8. Pico MC, Giralдино IG, Otero A. Inmunología experimental. La Habana: Ed. F3lix Varela;1997:31-2.

Recibido: 24 de enero de 2002. Aprobado: 22 de mayo de 2003.

Lic. *Yamila Lebeque P3rez*. Estrella No. 31 ¹/₂ e/ C y D, Reparto Jim3nez, Santiago de Cuba. Correo electr3nico: hmorris@cebi.uo.edu.cu