

## **Viabilidad y características culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas de una colección bacteriana**

### **Assessing feasibility and cultural characteristics, staining, morphological and biochemical bacterial collection**

**Dra. Martha J. Alfonso González, MSc. Nivaldo González Sosa, Tec. Nancy López Banasco**

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. La Habana, Cuba.

---

#### **RESUMEN**

Se estudió un grupo de réplicas de cepas bacterianas tipos que son conservadas en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (Enterobacterias: 10, Acinetobacter: 1, Pseudomonas: 1). El objetivo del trabajo fue evaluar la viabilidad (supervivencia) y las características originales: culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas de un grupo de microorganismos después de 5 años de conservación en una mezcla estéril de leche descremada y glicerol, a una concentración final de 10 y 20 % respectivamente, contenidas en ampulas de crioconservación y a una temperatura de -25 °C. Todas las cepas estudiadas y sus réplicas, crecieron en los medios de siembra utilizados a la temperatura, atmósfera y tiempo de incubación requeridos, por lo que se determinó un 100 % de viabilidad. Se comprobó que mantenían sus características morfológicas microscópicas y tintoriales, y las mismas características culturales en los medios sólidos y sus propiedades bioquímicas del momento de la conservación. Los resultados obtenidos con el uso de esta forma de conservación proporcionan garantía y seguridad para la utilización de las cepas en correspondencia con sus funciones en la colección de materiales biológicos; promueven la continuidad de estudios similares, como una manera de comprobar los objetivos principales de la conservación de cultivos microbianos.

**Palabras clave:** colección, cepas, conservación, mantenimiento.

## ABSTRACT

A group of replicas types of bacterial strains preserved at the Bacteriology Laboratory of Research Center of Civil Defense (Enterobacterias: 10, Acinetobacter: 1, Pseudomonas: 1) was studied. The objective was to assess the viability (survival) and original features (cultural, staining, morphological and biochemical features) of a group of microorganisms after 5 years of storage in a sterile mixture of skim milk and glycerol to a final concentration of 10 % and 20 % respectively, contained in vials and cryopreservation at -25 0 °C. All strains studied and their replicas grew in the planting media used to temperature, atmosphere and incubation time required, so 100 % viability was determined. It was found that they maintained their microscopic staining and morphological characteristics, and the same cultural characteristics on solid media and biochemical properties of the moment of conservation. The goods results obtained from the use of this form of conservation provide guaranty and safety to the use of strains in accordance with their functions in biological materials collection; as the continuity of similar studies as a means of testing the major objectives of conservation of microbial cultures, keeping unpolluted alive microorganism in conditions as nearest as possible to the isolation or original characterization.

**Keywords:** collection, strains, conservation, maintenance.

---

## INTRODUCCIÓN

La utilización de los microorganismos ha sido la clave en la preservación de la biodiversidad del planeta, en el desarrollo de los procesos biotecnológicos y en la solución y enfrentamiento a graves problemas de la humanidad. Esto ha permitido el reconocimiento a nivel mundial de la importancia que tiene la conservación eficiente de los cultivos microbianos, que acredite la reproducción de resultados.<sup>1-4</sup> Para ello se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original.<sup>5</sup> En la actualidad, para la conservación de los cultivos por largos períodos de tiempo se emplean la liofilización y la criopreservación<sup>6,7</sup> como métodos de elección que aseguran la viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas.

El uso de microorganismos correctamente caracterizados es referencia para procesos de investigación, producción y servicios, y ha sido una premisa para el trabajo de la colección de cultivos microbianos del laboratorio de bacteriología del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC). Este centro se encarga del mantenimiento y la conservación de réplicas de cepas tipo de colecciones reconocidas (ATCC, *American Type Culture Collection*), de otras colecciones, así como aislados de muestras clínicas.

El objetivo de este trabajo es evaluar la viabilidad y las características originales: culturales, tintoriales, morfológicas y bioquímicas, de un grupo de microorganismos conservados.

Para iniciar estos estudios se seleccionaron 12 microorganismos de la colección: Enterobacterias 10, Acinetobacter 1, Pseudomonas 1 (tabla 1), conservados en una mezcla estéril de leche descremada y glicerol, a una concentración final de 10 y 20 % respectivamente, contenidas en ampulas de crioconservación de 1,5 mL a razón de 1 mL por ampula y a una temperatura de -25 °C.<sup>8,9</sup>

Se utilizaron como documentos de referencia los procedimientos para el manejo de la colección y de otros materiales biológicos, y el instructivo de la casa comercial Difco, que incluye las pruebas y los resultados para la identificación de cada uno de los microorganismos. De cada cepa seleccionada se incluyeron dos réplicas. El tiempo transcurrido desde la conservación hasta este estudio fue de 5 años.

Los medios de cultivos utilizados para el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos fueron: caldo triptona soya (CTS), base agar sangre (AS), agar triptona soya (ATS), agar nutriente (AN) y agar MacConkey (AMC), de la casa comercial Oxoid. Otros de los sistemas y medios que se utilizaron para la identificación de los cultivos fueron: sistema de identificación API 20 E, de BioMérieux y otros reactivos disponibles en los laboratorios de medios de cultivo y Bacteriología (medio Kligler, medio de oxidación/fermentación, entre otros).

**Tabla 1.** Microorganismos estudiados y réplicas conservadas hasta el momento del estudio

Microorganismos	No. de réplicas disponibles
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	4
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13383	4
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	2
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	4
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	4
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	4
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	4
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	4

## DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PUREZA

Para determinar la viabilidad de las cepas, un volumen de 100 µL de las réplicas seleccionadas, se inoculó en CTS y se incubaron entre 35 y 37 °C de 18 a 24 h. Del caldo crecido se realizó siembra por agotamiento en placas con AS al 7 % y ATS en iguales condiciones de incubación. Pasado el tiempo se realizó la observación a simple vista y bajo microscopio estereoscopio de las placas para determinar la viabilidad a partir de la visualización del crecimiento de colonias en las estrías del medio, con una primera descripción de las características de los cultivos, a los que se les realizó coloración de Gram para determinar y describir la morfología y comportamiento de la tinción por observación microscópica. Se evaluó también el estado de pureza, si no se observaba ninguna otra forma bacteriana diferente a la esperada.<sup>10,11</sup>

## DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Una vez evaluado el crecimiento inicial, desde los cultivos de AS (de las dos réplicas), se realizó el segundo pase a AN y en agar MacConkey, en iguales condiciones y tiempo de incubación. Del crecimiento obtenido en los medios AS y AN se realizó nuevamente la observación macroscópica y descripción del cultivo, tinción de Gram para observar sus características morfológicas y tintoriales y el estado de pureza. La identificación bioquímica se realizó por métodos convencionales y el sistema comercial de identificación API 20E a partir del cultivo en AN.

Todas las cepas estudiadas y sus réplicas, crecieron en los medios de siembra utilizados a temperatura, atmósfera y tiempo de incubación requeridos, por lo que se determinó un 100 % de viabilidad después de 5 años desde su conservación.

En los medios sólidos, el crecimiento correspondió con sus características morfológicas, fue adecuado y abundante, hasta las últimas estrías de la siembra inicial. Aunque no se pudieron precisar los datos de viabilidad (referida a la concentración inicial conservada) porque no existe la referencia del momento de la conservación, al considerar la viabilidad obtenida y el tiempo de sobrevivencia de las cepas, se puede sugerir que su conservación se efectuó a partir de cultivos en óptimas condiciones de crecimiento, es decir, fase exponencial.<sup>12,13</sup>

Al observar los resultados de la coloración de Gram desde los medios crecidos (a partir del CTS y los sólidos), se comprobó que mantenían sus características morfológicas microscópicas y tintoriales, además permanecían puras. Aunque algunas mostraron la morfología algo variable, fundamentalmente en la primera siembra, por la existencia de bacilos cortos gram-negativos, lo que se explica por el tiempo de conservación en congelación que tuvieron las cepas (que afecta la actividad biológica bacteriana), durante el cual permanecieron inactivas y sometidas a condiciones de estrés; es decir, han estado en un periodo que se ha denominado de latencia, en el cual la actividad enzimática disminuye notablemente e incluso podría decirse que se detiene, situación que condiciona cambios de adaptación en la bacteria a las condiciones cercanas a su hábitat natural. Este estado puede ser transitorio y finaliza cuando las condiciones de estrés se eliminan. Uno de los mayores problemas que puede ocasionar es generar cambios que pueden ser transitorios o permanentes en su actividad enzimática, capacidad antigénica, viabilidad o velocidad de crecimiento.<sup>14,15</sup>

El 100 % de las cepas y las réplicas estudiadas mostraron sus características culturales en los medios sólidos y sus respuestas bioquímicas para todas las pruebas evaluadas similares con las del momento de la conservación, que son además las originales (tabla 2), por lo que no hubo duda de su correcta identificación.

Diversos estudios abordan objetivos similares a este trabajo, con resultados variados en relación al método para dar respuesta sobre la utilidad del medio y método de conservación empleados para la sobrevivencia, y el mantenimiento de las características de los microorganismos, para garantizar el suministro de cultivos estables a la disposición de diferentes servicios.<sup>16-18</sup>

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas

Microorganismos	Glucosa		Lactosa	Sucrosa**	Arabinosa**	Rafinosa**	Rhamnosa**	Xilosa**	Manitol**	Dulcitol**	Salicina**	Adonitol**	Inositol**	Sorbitol**	Catalasa	Gelatina	Oxidasa	Urea	Arginina	Lisina	Ornitina	Phenilalanin	Indol	Rojo metilo	VPRKauer	Malonato	Citrato	Nitrato	H2O	KCN
	G <sup>g</sup>	Ac <sup>g</sup>																												
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	+	+	-	+		+	-	-	-	-	+			-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+		+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	+	+	+		-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+		-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	-	+	-	-	+		+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+		-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	-	-	-	-	+		-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+		-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+		-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	+	-	-	-		-	-	+	+	+	+		+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-		+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-		+	+		-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+		+	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	+	-	-	-		+	-	+	+	+	+		+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-		-	+
<i>Shigella flexneri</i>		-	-	-	+	-	-		+	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		-	-	
<i>Shigella sonnei</i>		-	+	+	+	-	+		+	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-		-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>															+	+	+	+				-	-	-		+	+	+		
<i>Acinetobacter calcoaeticus</i>			+					+	-						+	-	-	-				-	-			+	-	-		

G: gas; Ac: ácido; +: positivo; -: negativo.  
\*Kligler; \*\*oxidación/fermentación.

Los resultados obtenidos dan una medida para evaluar adecuadamente el medio y método utilizados, por la sobrevivencia lograda y la demostración de que los microorganismos mantienen, después de 5 años desde su conservación (momento de la evaluación), las mismas características culturales, fenotípicas y bioquímicas. Proporciona además información para dar garantía y seguridad en la utilización de los microorganismos en correspondencia con sus funciones en la colección de materiales biológicos. Promueven la continuidad de la evaluación del estado del resto de la colección, como una forma de comprobar los objetivos principales de la conservación de cultivos microbianos: mantener al microorganismo vivo, no contaminado, en una condición lo más cercana posible al aislamiento original.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Montes de Oca N, González RA, Riverón Y, Núñez A, Villoch A, Rodríguez N. Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA. Rev. Salud Anim 2008; 30(1): 17-24.
- del Puerto CA, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocedo MD, Carnota G, et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. Vaccimonitor. 2009; 18(1): 20-4.
- Tedeschi R, De Paoli P. Collection and Preservation of frozen microorganisms. Methods in Molecular Biology. 2011; 675: 313-26.
- Winters RD, Winn WC. A Simple, Effective Method for Bacterial Culture Storage: A Brief Technical Report. J Bacteriology Virology. 2010; 40(2): 99-101.

5. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Applied Microbiol.* 2008;54(1):9-24.
6. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. *Rev Argen Microbiol.* 2000;30(8):42-51.
7. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actual Microbiol SEM.* 2002;30(6):6-12.
8. Growth M. Maintenance and preservation of bacterial strains. En: Maniatis TS, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. p. 61-2.
9. Gherna R. Preservation. En: Gerhardt P. *Manual of Methods for General Bacteriology.* 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1981. p. 208-17.
10. Joklik WJ, Willett HP, Amos DB. *Zinsser Microbiología.* La Habana: Editorial Científico Técnica; 1983. p. 714-19.
11. Valdés-Da Pena MM. Enterobacterias. En: Llop A, Valdés-Da Pena MM, Zuazo JL. *Microbiología y Parasitología médicas.* La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2000. p. 251-80.
12. Aulet de Saab OC, de Castillo MC, de Ruiz Holgado AP, de Nader OM. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz.* 2001;96(4):583-6.
13. Belmonte A, Noguerras MG, Contigiani MB, Gandini V, Sutich EG. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Rev Bioquím Patol Clín.* 2008;2(72):15-8.
14. Weng Z, Junco RA, Díaz OE, Álvarez I, Beltrán JR, Rodríguez MC. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet].* 2005 [citado 9 Oct 2013];43(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_issuetoc&pid=1561300320050002&ln=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=1561300320050002&ln=es&nrm=iso)
15. Sánchez LC, Corrales LC. Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova.* 2005;3(003):109-13.
16. Pérez-Reytor DC, Sosa AE. Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *Vaccimonitor.* 2010;19(2):11-7.
17. Oskouei DD, Bekmen N, Ellidokuz H, Yilmaz O. Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in stock culture media. *Braz J Microbiol.* 2010;41(4):1038-46.

18. Day JG, Harding KC, Nadarajan J, Benson EE. Cryopreservation. Conservation of bioresources at ultra low temperatures. In: Walker JM, Rapley R. Molecular Biomethods Handbook. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 917-47.

Recibido: 24 de julio de 2014.

Aprobado: 24 de septiembre de 2014.

*Martha J. Alfonso González.* Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. La Habana, Cuba. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque. Correo electrónico: [cicdc@infomed.sld.cu](mailto:cicdc@infomed.sld.cu)