

COMUNICACIONES BREVES

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, EPIDEMIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA

Evaluación de medio semisólido para la conservación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae

Lic. Zulia Weng Alemán,¹ Dra. Raquel de los Ángeles Junco Díaz² y Téc. Olvido Esther Díaz Rosa³

RESUMEN

Se estudiaron 26 cepas bacterianas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, con el objetivo de evaluar el mantenimiento de las propiedades culturales, tintoriales y bioquímicas de microorganismos originalmente preservados en el medio semisólido de conservación, desde finales de la década de los años 80; de las cuales 22 se encontraban viables, lo que demuestra supervivencia por más de 10 años. Los microorganismos han sido mantenidos en este medio desde su introducción al Laboratorio de Colección de Cultivos Microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba; los cuales son utilizados como cepas tipo en el control interno de la calidad de los reactivos y medios de cultivo que se producen en este centro, para su posterior empleo en la evaluación microbiológica de muestras ambientales. Este medio brinda buenos resultados para la conservación de cepas de Enterobacteriaceae y puede ser utilizado en laboratorios con limitados recursos.

DeCS: ENTEROBACTERIACEAE/aislamiento & purificación; MEDIOS DE CULTIVO.

La adecuada utilización de microorganismos debidamente caracterizados para el control de la calidad de los reactivos, los medios de cultivos y el desarrollo de las investigaciones en el Departamento de Microbiología Sanitaria del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba (INHEM), ha sido la razón de existir del Laboratorio de Colección de Cultivos Microbianos de ese centro (CCINHEM). Desde su creación, este laboratorio ha tenido a su cargo el mantenimiento y la conservación de réplicas de cepas tipo, procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y del Instituto de Higiene de Praga, República Checa (IHE); así como, de cepas aisladas en los Laboratorios de Microbiología de Aguas, Suelos, Lodos y Sedimentos, entre otros. Para su preservación en

el nivel primario o base, ha sido utilizado el medio semisólido de conservación, modificado al emplear el caldo corazón 2,5 % como sustituto del extracto de levadura, peptona y cloruro de sodio en la fórmula propuesta por *Solomon* en el *Bacteriological Analytical Manual*,¹ como método simple de preservación a largo plazo y la liofilización;² mientras que en el nivel secundario o de trabajo, han sido empleadas las técnicas de subcultivo en parafina y cuñas de agar inclinado.² El propósito de este trabajo consistió en evaluar el mantenimiento de las características culturales, microscópicas y bioquímicas de microorganismos preservados en este medio semisólido de conservación.

Se seleccionaron 26 cepas de enterobacterias (tabla 1) de la conservación más antigua existente

¹ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigadora.

² Máster en Salud Ambiental. Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología. Profesora e Investigadora Auxiliar.

³ Técnica A de Laboratorio Sanitario.

en la CCINHEM, mantenidas por más de 10 años en el medio semisólido de conservación (MSC), contenido en tubos de 90 × 10 mm (bacilo) con tapón de goma, y que forman parte del banco primario de trabajo. Para su estudio, una porción del MSC de cada una de las réplicas disponibles de las cepas se inoculó en caldo cerebro corazón, incubándose entre 37 °C durante 18 a 24 h. A partir del caldo con crecimiento se realizaron las pruebas de viabilidad y pureza, utilizando medios agarizados recomendados^{3,4} (en los que se realizó la siembra en placa por agotamiento) y tinción de Gram; así como, el chequeo del comportamiento bioquímico de los cultivos por el método convencional de los tubos de ensayo, según lo que se reporta en la literatura de consulta⁴⁻⁷ y las disponibilidades de los medios de cultivo del laboratorio.

Los resultados obtenidos en el estudio inicial correspondiente a la fecha de conservación de los microorganismos fueron comparados con los datos obtenidos en el estudio actual.

TABLA 1. Cepas microbianas en estudio

Cepas microbianas	Año de conservación	Réplicas disponibles
<i>Budvicia aquatica</i> IHE 27426	1989	2
<i>Citrobacter freundii</i> INHEM	1988	2
<i>Citrobacter</i> sp. INHEM	1986	1
<i>Edwardsiella tarda</i> IHE 27456	1989	1
<i>Enterobacter</i> sp. INHEM	1987	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> INHEM	1988	2
<i>Enterobacter sakazakii</i> IHE 28132	1989	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1988	1
<i>Escherichia coli</i> 44° INHEM	1988	2
<i>Escherichia vulneris</i> IHE 28599	1989	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1990	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> INHEM	1988	2
<i>Proteus mirabilis</i> INHEM	1988	2
<i>Providencia</i> sp. INHEM	1988	1
<i>Salmonella anatum</i> INHEM	1988	2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1987	1
<i>Salmonella typhimurium</i> INHEM	1987	1
<i>Serratia fonticola</i> IHE 28013	1989	3
<i>Serratia fonticola</i> IHE 28501	1989	2
<i>Serratia liquefaciens</i> IHE 28107	1989	4
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	1990	1
<i>Serratia marcescens</i> IHE 27938	1989	1
<i>Serratia marcescens</i> INHEM	1988	1
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	1988	1
<i>Shigella flexneri</i> INHEM	1988	2
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1990	1

ATCC: American Type Culture Collection; IHE: Instituto de Higiene de Praga, República Checa; INHEM: Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba.

Todas las cepas en estudio pertenecen a la familia Enterobacteriaceae,⁸ que es la familia de mayor representatividad en la colección del laboratorio de la institución. De estas, 85 % (22 cepas) mostró supervivencia por más de 10 años, mientras que 15 % (4 cepas: *Budvicia aquatica* IHE 27426,⁹ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Enterobacter* sp. INHEM³) no se halló viable. Esto pudiera deberse a que el cultivo fuera inoculado originalmente con una baja viabilidad (< 10⁵) o a la influencia de factores externos, como temperatura, luz y condiciones de almacenamiento; los cuales propiciarán que los microorganismos no fuesen capaces de sobrevivir en el medio de cultivo por este período de tiempo.

Al comprobar la pureza y la morfología microscópica por tinción de Gram de las cepas, se obtuvo que 77,3 % de los cultivos viables permaneció puro y conservó su respuesta frente a esta prueba, apreciándose la existencia de bacilos cortos gramnegativos en la mayoría de las muestras. Las conservaciones restantes (5 para 22,7 %) resultaron contaminadas y se reaislaron a partir de una colonia presuntiva, sin la obtención de resultados satisfactorios. El uso del tapón de goma en los tubos bacilo, las condiciones de esterilidad necesarias para la distribución del medio semisólido y la limpieza de los tubos son las posibles causas atribuibles de la contaminación.

En general se obtuvo una buena recuperación de los cultivos (50-82 %), ilustrada por el crecimiento hasta las últimas estrías en los medios ensayados y considerando que no se disponen de los datos iniciales de viabilidad de los cultivos ni la edad en el momento de su conservación, por lo que no se puede aseverar que originalmente estos estaban en óptimas condiciones.

En la tabla 2 se muestra que 90 % de las respuestas bioquímicas obtenidas en los 2 estudios (estudio inicial y estudio actual) fueron coincidentes, para las 24 pruebas evaluadas de forma común en ambos estudios. Esto corrobora que ambas caracterizaciones son válidas, no existiendo errores en la identificación de los microorganismos.

De este trabajo se concluye que, el medio semisólido de conservación resultó adecuado para la preservación de cepas de Enterobacteriaceae, al comprobarse que 85 % de las cepas estudiadas

mostró supervivencia por más de 10 años y, se obtuvo 90 % de coincidencia en las respuestas bioquímicas de los microorganismos, evaluadas para ambos estudios realizados.

TABLA 2. Resultados de las pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas	Respuestas coincidentes (% de positividad)	Respuestas no coincidentes (% de positividad)
Oxidasa	100	Ø
Reducción de nitratos	100	Ø
Indol	95	5
Urea	100	Ø
Citrato	100	Ø
Rojo de metilo	82	18
Voges proskauer	100	Ø
Movilidad	100	Ø
Producción de H ₂ S	100	Ø
Fenilalanina desaminasa	95	5
Gelatinasa	95	5
Reacción en medio de Kligler		
Glucosa	100	Ø
Lactosa	95	5
Gas	100	Ø
H ₂ S	100	Ø
Decarboxilación en medio de Moeller		
Control	100	Ø
Lisina	91	9
Arginina	77	23
Ornitina	91	9
Fermentación de carbohidratos		
Glucosa (ácido y gas)	100	Ø
Lactosa	95	5
Salicina	91	9
Adonitol	91	9
Dulcitol	86	14
Sorbitol	86	14
Inositol	100	Ø
Manitol	90	10

Ø: respuesta negativa

SUMMARY

26 bacterial strains from the *Enterobacteriaceae* family were studied to evaluate the maintenance of the cultural, tinctorial and biochemical properties of the microorganisms originally

preserved in the semisolid medium of conservation since the end of the 1980's. 22 of them were viable, showing their survival for more than 10 years. The microorganisms have been maintained in this medium since their introduction into the Laboratory of Collection of Microbial Cultures of the National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology of Cuba. They have been used as pattern strains in the internal control of the quality of reagents and culture media produced in this center for their further use in the microbiological evaluation of environmental samples. This medium gives good results for the conservation of strains of *Enterobacteriaceae* and may be used in laboratories with scarce resources.

Subject headings: ENTEROBACTERIACEAE/ isolation & purification; CULTURE MEDIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Solomon HM. Media and reagents. En: Jackson GL., eds. 8ed. Bacteriological Analytical Manual. App. 3. Washington: US Food And Drug Administration; 1995; p.32.
- Smith D, Green P, Day G. Management and maintenance of culture collections. England: UKFCC; 2000:45.
- Merck E. Microbiology Manual 2000. Darmstadt: Merck KgaA; 2000:14-41.
- Weissfeld AS, McNamara AM, Tesh VL, Howard BJ. *Enterobacteriaceae*. En: Howard BJ, Keifer JF, Weissfeld AS, Smith TF, Tilton RC, eds. 2ed. Clinical and Pathogenic Microbiology. St. Louis: Mosby Year Book; 1994. p.299-336.
- Bridson E. Bacteriología. En: Oxoid, eds. The Oxoid Vademecum of Microbiology. England: Oxoid; 1993. p. 5-75.
- Farmer JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. En: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. 5. ed. Manual of Clinical Microbiology; Washington: American Society of Microbiology; 1999. p.360-83.
- Lugo de la Fuente G, Cauich PI. Enterobacterias. En: Lugo de la Fuente G, ed, 2 ed. Bacteriología médica. México DF: Ediciones Cuellar; 2000. p.71-161.
- Garrity GM, Winters M, Searles DB. Taxonomic outline of the Procaryotic genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. ed. New York: Springer Verlag; 2001. p.13-4.
- Aldová E, Hausner O, Gabrhelova M. *Budvicia* - a new genus of *Enterobacteriaceae*. Data of phenotypic characters. J Hyg Epidemiol Microbiol Immuno 1984;28(2):234-7.

Recibido: 4 de enero de 2002. Aprobado: 12 de mayo de 2003.
Lic. *Zulia Weng Alemán*. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Infanta No. 1158 e/ Llinás y Clavel, municipio Centro Habana, Ciudad de La Habana. CP 10300. Cuba

Teléfonos:705531 al 34 ext.254. Fax: 53 7 – 662404. Correo electrónico: saludamb@inhem.sld.cu