

Estandarización de un método para la conservación de cepas del laboratorio de microbiología de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Standardization of a conservation method for the microbiology laboratory strains at the School of Chemistry of the Technological University of Pereira.

Juliana Naranjo Gómez^a, Santiago Ortiz Pérez^a, Liliana Bueno López^b.

a. Estudiantes; b. Docente. Escuela de Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia

Correo-e: julianang97@utp.edu.co, santiago.op@utp.edu.co

Resumen— La congelación es uno de los métodos a largo plazo más empleados para la conservación de microorganismos garantizando su estabilidad genética, viabilidad y pureza. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los resultados de la conservación de las cepas microbianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por el método de congelación durante un periodo de dos meses y así, estandarizar un método para la conservación de cepas microbianas para el laboratorio de microbiología de la Escuela de Química. Para el crecimiento de las cepas se utilizó el medio de cultivo caldo de BHI y como sustancias crioprotectoras aceite mineral y glicerol. Las cepas estudiadas conservaron sus características propias con un elevado grado de pureza durante el tiempo evaluado. Tanto el aceite mineral como el glicerol resultaron ser buenas sustancias crioprotectoras. La conservación por congelación es un método de gran utilidad que garantiza la viabilidad y disponibilidad de las cepas para diversos estudios.

Palabras clave— Microorganismo, congelación, viabilidad, sustancia crioprotectora, estandarización.

Abstract— Freezing is one of the most used long-term methods for the conservation of microorganisms, guaranteeing their genetic stability, viability and purity. The aim of the present work was to evaluate the results of the conservation of the microbial strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by the freezing method during a period of two months and to standardize a method for the conservation of microbial strains for the laboratory of microbiology at the School of Chemistry. The BHI broth culture medium was used for the growth of the strains and mineral oil and glycerol were used as cryoprotective substances. The studied strains preserved their own characteristics with a high degree of purity during the time evaluated. Both mineral oil and glycerol proved to be good cryoprotective substances.

Key Word— Microorganism, freezing, viability, cryoprotective substance, standardization.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos representan un papel esencial para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología¹ y a escala de laboratorio es fundamental tener procesos de conservación de estos, por la importancia antes mencionada; dicha conservación debe garantizar que los microorganismos se mantengan sin alteración en sus características típicas (genéticas) y sean viables durante largos periodos de tiempo; además, los métodos de conservación permiten frenar el metabolismo de los microorganismos lo que permite que sean empleados en futuras investigaciones².

Los cultivos de microorganismos empleados en el desarrollo de los procesos académicos como los laboratorios de enseñanza en microbiología resultan ser cruciales en el momento de obtener resultados confiables; lo cual requiere que estos sean viables durante su estudio; por tal motivo, se deben conservar de forma adecuada para garantizar su disponibilidad.

El laboratorio de microbiología, para docencia, de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira emplea el método de transferencia periódica para la conservación de cepas; en un periodo menor a dos meses, los microorganismos agotan los recursos que el medio les proporciona, razón por la cual surge la necesidad de implementar un método de conservación a largo plazo que se ajuste a los recursos (equipos, reactivos y materiales) disponibles en el laboratorio³.

La problemática consiste en que en el periodo de dos meses (receso estudiantil), se detiene el proceso de transferencia periódica, debido a la ausencia de personal capacitado para la realización de este, lo que conlleva a que los microorganismos no dispongan de los nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción ocasionando su muerte y dificultando su reactivación⁴.

Con el fin de tener disponibilidad de cepas para los diversos ensayos microbiológicos y no depender de la transferencia periódica de los microorganismos de importancia para las prácticas, se plantea la posibilidad de determinar el método de conservación por congelación más adecuado, con el cual se logre garantizar la viabilidad de los microorganismos para el desarrollo de los procesos académicos mayor a los dos meses que se tienen con el método actual.

II. METODOLOGÍA

1. Obtención de cepas.

Las cepas de interés fueron *Escherichia-coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus-aureus* (*S. aureus*) las cuales fueron suministradas por el Laboratorio de Microbiología y Actividad Biológica del grupo de investigación Polifenoles ubicado en la Universidad Tecnológica de Pereira.

2. Reconocimiento de cepas.

La siembra se realizó en los medios específicos para cada especie; para *E.coli* el medio empleado fue Agar Eosine Methylene Blue (EMB) y el medio para *S.aureus* corresponde a Baird Parker, esto con el fin de verificar la pureza de las cepas; ambas cepas se incubaron durante 48 h a 37 °C.

3. Método de conservación.

La conservación de las cepas se realizó por el método de congelación⁵ y se emplearon como agentes crioprotectores glicerol⁶ y aceite mineral⁷ con el propósito de determinar cuál de estos dos mostraba mejores resultados en el proceso de conservación. Adicionalmente se utilizó el caldo Brain Heart Infusion (BHI) como medio nutritivo debido a que actualmente es recomendado como medio base dado que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos⁸.

En primer lugar, el inóculo se llevó a un tubo que contenía 15 mL de caldo BHI y se incubó durante un periodo de 48 h a 37 °C. Se depositó la cantidad necesaria de esta solución en un tubo con 15 mL de BHI hasta obtener una absorbancia en el rango de 0,14 a 0,17 y la lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 625 nm (La densidad celular recomendada para la conservación de cepas microbianas es de 3×10^8 células/mL en la escala de Mc Farland⁹. Con una absorbancia entre 0.14 a 0.17 se asegura esta concentración¹⁰. Se prepararon patrones de diferentes concentraciones del inóculo en BHI tomando 0.3, 0.5 y 0.7 mL del microorganismo,

depositando cada uno de los volúmenes en viales hasta completar un volumen de 1 mL con los agentes crioprotectores, y de esta manera cubrir un mayor rango y evaluar cuál es la más apropiada para la conservación de cepas. Este procedimiento se realizó por triplicado en BHI y se almacenaron a temperaturas de -4 y -12 °C.

Se realizaron dos ensayos con el fin de observar la repetibilidad del método. El almacenamiento de los viales se realizó por un periodo de dos meses.

Una vez transcurridos los dos meses correspondientes con los meses de Diciembre a Febrero (primer ensayo) y de Febrero a Abril (segundo ensayo) se procedió a la activación de las cepas a través de la siembra en caja Petri utilizando los medios específicos para cada una de las cepas de interés y de esta manera lograr evidenciar la viabilidad del método y mediante tinción de Gram se observó la morfología de los microorganismos.

Con el propósito de realizar un análisis estadístico de los datos y obtener un número de colonias (UFC) para cada una de las cepas, se realizaron una serie de diluciones sucesivas. De cada una de las concentraciones contenidas en los viales se tomó 0.1 mL y se depositó en un tubo de ensayo con 10 mL de BHI; posteriormente cada tubo preparado fue llevado a incubación por un periodo de 48 h a 37 °C. De cada uno de los tubos incubados se tomó 1 mL de la solución y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Las diluciones se realizaron con los viales luego de haber pasado un periodo de almacenamiento de 4 meses (Febrero a Junio).

El recuento de microorganismos se realizó usando agar nutritivo¹¹ mediante siembra masiva. Las diluciones utilizadas para el conteo fueron 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . El tiempo de incubación fue de 24 h.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primera instancia fue posible llevar a cabo el reconocimiento de las cepas suministradas mediante la siembra en caja Petri utilizando los medios específicos para cada especie. Los resultados pueden apreciarse en las figuras 1 y 2.



Fig. 1. Siembra masiva de *E. coli* en caja Petri.

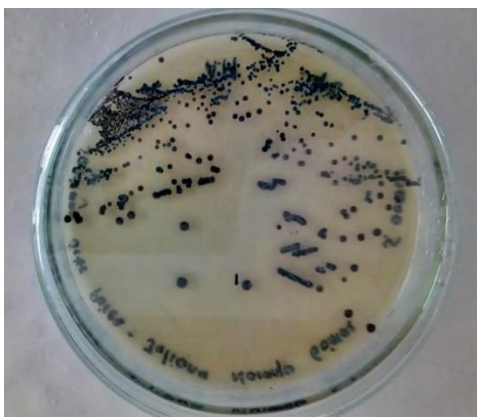


Fig. 2. Siembra masiva de *S. aureus* en caja Petri.

En la figura 1 se observa crecimiento positivo para *E. coli*, la cual se caracteriza por la presencia de un brillo metálico en el medio específico para Gram negativas, EMB¹². Las colonias observadas en la figura 2, indican la existencia de *S. aureus*, lo cual es posible utilizando el medio de cultivo Baird Parker debido a que los estafilococos reducen el telurito a telurito originando colonias de color grisáceo-negro¹³.

Las absorbancias obtenidas para las cepas de interés en los dos ensayos están consignadas en la tabla 1; estas se encuentran dentro del rango sugerido en la bibliografía, lo cual asegura una concentración de 3×10^8 células/mL¹⁴.

Ensayo	Cepa	Absorbancia
1	<i>E. coli</i>	0,152
	<i>S. aureus</i>	0,156
2	<i>E. coli</i>	0,152
	<i>S. aureus</i>	0,150

Tabla 1. Absorbancia obtenida experimentalmente para cada una de las cepas en los dos ensayos.

Las temperaturas utilizadas para los ensayos realizados fueron establecidas partiendo de la disponibilidad que se tiene en la Escuela de Química y en este sentido se cuenta con una nevera que permite mantener a -4°C (Laboratorio de Microbiología) y otra a -12°C (Sala de reactivos).

Al realizar la reactivación de las cepas, transcurridos los dos meses, se observó un crecimiento masivo tanto para *E. coli* como para *S. aureus* indicando un número incontable de bacterias, lo cual evidencia que el método de congelación con los dos agentes crioprotectores funciona y permite la conservación de las dos cepas de interés en las dos temperaturas empleadas.

El primer ensayo consistió en determinar cualitativamente si el método que se utilizó garantiza la estabilidad genética de los microorganismos y conserva buena parte de la población bacteriana.

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo presentaron la misma tendencia que el primero, es decir un número incontable de bacterias, lo que comprueba la repetibilidad del método.

Con el objetivo de cuantificar el número de bacterias, después de un periodo de 4 meses, se realizaron diluciones de cada una de las concentraciones debido a que el crecimiento obtenido fue masivo. Se realizó la siembra masiva de las diluciones correspondiente a 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en agar nutritivo.

En las tablas 2 y 3 es posible apreciar el promedio de los resultados obtenidos con respecto a UFC.

Cepa	Concentración (mL/mL)	Dilución n	Agente crioprotector	
			Glicerol	A.M
			UFC/mL	UFC/mL
<i>E. coli</i>	0.3	10^{-3}	INC	INC
		10^{-4}	2544×10^4	2952×10^4
		10^{-5}	1180×10^5	1588×10^5
	0.5	10^{-3}	INC	INC
		10^{-4}	2408×10^4	2816×10^4
		10^{-5}	2032×10^5	2440×10^5
	0.7	10^{-3}	INC	INC
		10^{-4}	2066×10^4	2380×10^4
		10^{-5}	1632×10^5	1946×10^5
<i>S. aureus</i>	0.3	10^{-3}	INC	INC
		10^{-4}	1306×10^4	1714×10^4
		10^{-5}	1203×10^5	1611×10^5
	0.5	10^{-3}	INC	INC
		10^{-4}	1744×10^4	2152×10^4
		10^{-5}	1356×10^5	1764×10^5
	0.7	10^{-3}	INC	INC
		10^{-4}	1402×10^4	1716×10^4
		10^{-5}	9560×10^5	1270×10^5

Tabla 2. UFC para las cepas microbianas *E. coli* y *S. aureus* a diferentes concentraciones a una temperatura de -4°C .

Cepa	Concentración (mL/mL)	Dilución	Agente crioprotector	
			Glicerol	A.M
			UFC/mL	UFC/mL
<i>E. coli</i>	0.3	10 ⁻³	INC	INC
		10 ⁻⁴	2216 x10 ⁴	2624 x10 ⁴
		10 ⁻⁵	8520 x10 ⁵	1260 x10 ⁵
	0.5	10 ⁻³	INC	INC
		10 ⁻⁴	2080 x10 ⁴	2488 x10 ⁴
		10 ⁻⁵	1704 x10 ⁵	2112 x10 ⁵
	0.7	10 ⁻³	INC	INC
		10 ⁻⁴	1738 x10 ⁴	2052 x10 ⁴
		10 ⁻⁵	1256 x10 ⁵	1570 x10 ⁵
<i>S. aureus</i>	0.3	10 ⁻³	INC	INC
		10 ⁻⁴	9780 x10 ⁴	1386 x10 ⁴
		10 ⁻⁵	8750 x10 ⁵	1283 x10 ⁵
	0.5	10 ⁻³	INC	INC
		10 ⁻⁴	1416 x10 ⁴	1824 x10 ⁴
		10 ⁻⁵	1028 x10 ⁵	1436 x10 ⁵
	0.7	10 ⁻³	INC	INC
		10 ⁻⁴	1074 x10 ⁴	1388 x10 ⁴
		10 ⁻⁵	5800 x10 ⁵	8940 x10 ⁵

Tabla 3. UFC para las cepas microbianas *E. coli* y *S. aureus* a diferentes concentraciones a una temperatura de -12 °C.

Con base en los resultados obtenidos experimentalmente se construyeron los gráficos de las concentraciones vs las unidades formadoras de colonia (UFC) para las cepas de interés con el fin de determinar cuál concentración y temperatura garantiza una mejor conservación. Los gráficos se muestran a continuación:

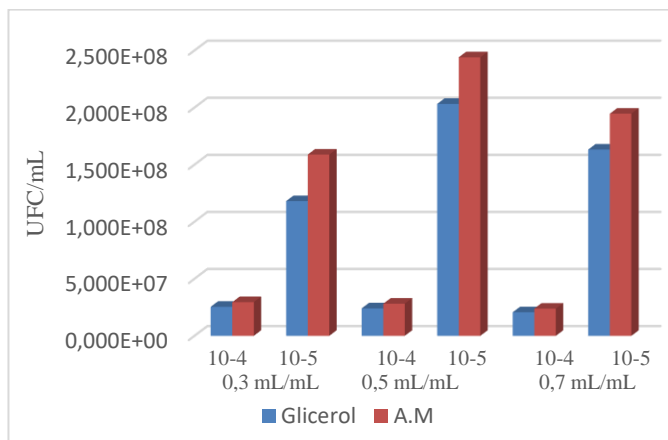


Fig.2.1. Gráfico concentración vs UFC para *E. coli* a -4 °C.

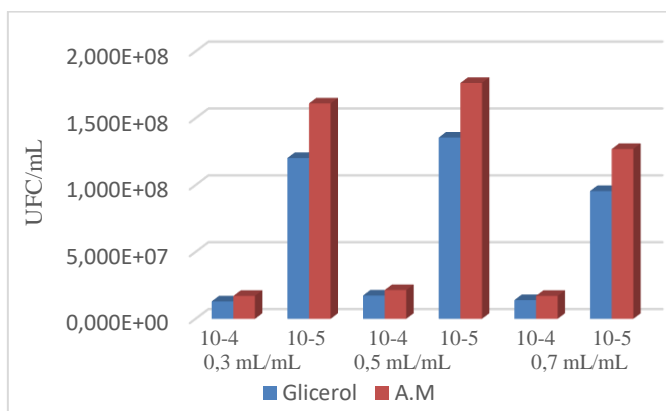


Fig. 2.2. Gráfico concentración vs UFC para *S. aureus* a -4 °C.

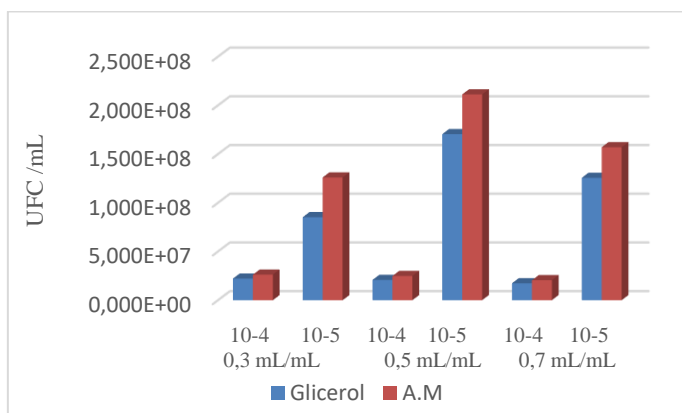


Fig. 3.1. Gráfico concentración vs UFC para *E. coli* a -12 °C.

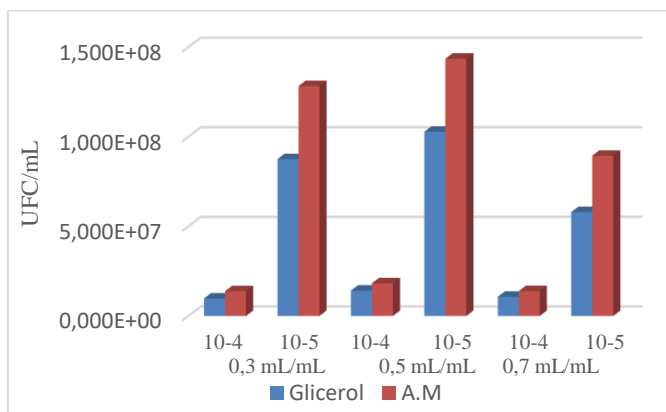


Fig. 3.2. Gráfico concentración vs UFC para *S. aureus* a -12 °C.

En la figura 2.1 se observa que el aceite mineral conserva una mayor población de bacterias en comparación con el glicerol. Al comparar la figura 2.1 con la figura 3.1 se observa que a una temperatura de -4 °C la conservación de las cepas microbianas muestra mejores resultados, la población es mayor debido a que se encuentra sometida a una temperatura mayor y, por lo tanto, su reactivación y crecimiento puede darse con mayor facilidad a -4 °C que a la temperatura de -12 °C.

En la figura 2.2 y 3.2 se observa la misma tendencia, al emplear aceite mineral como agente crioprotector, a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, las cepas muestran una mejor conservación.

De acuerdo con las concentraciones evaluadas, se observa que la concentración de 0.5 mL/mL ofrece mejores resultados en relación con la población microbiana; sin embargo, cualquiera de las concentraciones empleadas favorece la conservación y la reactivación de las cepas de interés.

Con base en los resultados obtenidos experimentalmente el método de congelación propuesto cumple con los objetivos y requisitos necesarios para la conservación de las dos cepas. El bajo costo y facilidad del método permite que su implementación sea ideal para el laboratorio de microbiología de la Escuela de Química.

Tener un cepario es necesario debido a que ofrece disponibilidad para los diversos tipos de estudio que se llevan a cabo, ya sean con fines docentes o investigativos. El método de conservación debe garantizar viabilidad y estabilidad genética.

IV. CONCLUSIONES

- Al emplear la congelación como método de conservación a largo plazo se determinó que las características propias de cada una de las especies evaluadas se mantuvieron inalterables. Las sustancias crioprotectoras ensayadas durante el periodo de dos meses resultaron ser buenas para la conservación. Según los recursos con los que cuenta la Escuela de Química se puede elegir entre ambas sustancias, el glicerol o el aceite mineral.
- Las dos temperaturas establecidas permiten la conservación de las cepas durante un periodo de dos meses. El crecimiento de los microorganismos en cada una de las concentraciones y temperaturas fue elevado lo que confirma la capacidad que presenta el método en la conservación de las dos cepas.

REFERENCIAS

[1] y [2]. Barragán, D. S., Lesmes, A. (2009). Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas: elección del mejor método. Pontificia Universidad Javeriana Sitio web: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

[3], [4], [5] y [6]. Arencibia, D. F., Rosario, L. A., Gómez, R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. Finlay Ediciones Sitio web: https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos].

[7]. Gutiérrez, S. J. (2006). Viabilidad y preservación de microorganismos. En Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología (40-41). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

[8]. Brown, J.M, and M.M. McNeil. 2003. Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces and other aerobic actinomycetes. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

[9] y [14]. Garzón, A., Gómez, J. A. (2007). Evaluación de la cinética de crecimiento para *Escherichia coli* ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos. Pontificia Universidad Javeriana Sitio web: <https://repository.javeriana.edu.co:8443/bitstream/handle/10554/8466/tesis133.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

[10]. Hardy Diagnostics. (2012). MCFARLAND LATEX STANDARDS. [online] Available at: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/McFarlandStds.htm.

[11]. Downes and Itp (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4 th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

[12]. MacFaddin. 2003. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, volumen 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

[13]. European Pharmacopoeia 6.0, volumen 1. 2007. Microbiological Examination of Non sterile products: Test for Specified Microorganisms.

Nota: El protocolo que se sugiere para la conservación de cepas se adjuntará para el laboratorio de microbiología.