

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología

## Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable

Lic. Zulia Weng Alemán,<sup>1</sup> Dra. Raquel de los Ángeles Junco Díaz,<sup>2</sup> Téc. Olvido Esther Díaz Rosa,<sup>3</sup> Téc. Inalvis Álvarez Molina,<sup>4</sup> José Ramón Beltrán Díaz<sup>3</sup> y Téc. María Caridad Rodríguez Salazar<sup>3</sup>

Numerosas instituciones mantienen colecciones vivientes de microorganismos, ya sea con fines docentes, investigativos o para disponer de cepas patrones útiles en el aseguramiento de la calidad de múltiples procesos industriales, evaluación de materias primas, productos y tecnologías. En la actualidad, para la conservación de estos cultivos por largos períodos de tiempo se emplean la liofilización y la criopreservación,<sup>1,2</sup> como métodos de elección que aseguran la viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas. Cuando no existen los recursos necesarios para la utilización de éstas técnicas, la búsqueda de alternativas de preservación menos costosas es una constante.

La colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CCINHEM) ha provisto de cepas bacterianas a numerosos laboratorios microbiológicos en todo el país, en medio semisólido de conservación (MSC), el cual es de fácil preparación, manipulación, costo y buenos resultados en el mantenimiento de los cultivos a mediano plazo, convertido en el método básico de transporte y preservación de los cultivos de la colección. Después de transcurrir más de 10 años desde su introducción a la práctica y al constatarse que mantenía su apariencia, consistencia e hidratación, se decidió verificar la viabilidad y el mantenimiento de los caracteres fisiológicos de los primeros cultivos inoculados en él, empleados como microorganismos patrones en el control de la calidad de medios de cultivos y reactivos en el Departamento de Microbiología Sanitaria del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

### Métodos

Se preservaron en medio semisólido de conservación a temperatura ambiente 60 cepas bacterianas que integran el banco primario de trabajo de la colección de cultivos microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CCINHEM), desde su aislamiento y/o incorporación entre 1986 y 1990. Después de su estudio se mantuvieron en este medio hasta mediados del 2000, fecha en que se comenzó la verificación nuevamente de su viabilidad y clasificación (tabla 1).

Tabla 1. Relación de microorganismos en estudio. INHEM 2000-2002

Cepas microbianas	Año conservación	Réplicas disponibles	Cepas microbianas (INHEM)	Año conservación	Réplicas disponibles
Bacillus cereus INHA	1989	2	Salmonella allenton	1987	1

Bacillus subtilis ATCC 6633 1990 1 Salmonella anatum 1988 2  
 Budvicia aquatica IHE 27426 1989 2 Salmonella binza 1988 1  
 Citrobacter freundii INHEM 1988 2 Salmonella braenderly 1987 1  
 Citrobacter sp. INHEM 1986 1 Salmonella bredeney 1987 1  
 Edwardsiella tarda IHE 27456 1989 1 Salmonella B 1987 1  
 Entetobacter sp. INHEM 1989 1 Salmonella C 1987 1  
 Entetobacter aerogenes INHEM 1988 2 Salmonella cerro 1987 1  
 Entetobacter sakazakii IHE 28132 1989 3 Salmonella edmonton 1987 1  
 Enterococcus faecalis INHEM 1988 2 Salmonella havana 1987 1  
 Enterococcus faecalis ATCC 19433 1989 1 Salmonella heidelberg 1987 1  
 Pseudomonas aeruginosa mL 2327 1988 3 Salmonella infantis 1987 1  
 Escherichia coli ATCC 25922 1988 1 Salmonella kentucky 1987 1  
 Escherichia coli 44° INHEM 1988 2 Salmonella mission 1986 1  
 Escherichia vulneris IHE 28599 1989 2 Salmonella minesota 1987 1  
 Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 1990 2 Salmonella montevideo 1986 1  
 Klebsiella pneumoniae INHEM 1988 2 Salmonella muenchen 1986 1  
 Proteus mirabilis INHEM 1988 2 Salmonella ndolo 1986 1  
 Providencia sp INHEM 1988 1 Salmonella otmarschen 1987 1  
 Salmonella agona INHEM 1987 1 Salmonella oranienburg 1987 1  
 Salmonella albany INHEM 1987 1 Salmonella ser 1987 1  
 Salmonella stanleyville INHEM 1986 1 Serratia fonticola IHE 28013 1989 3  
 Salmonella senptemberg INHEM 1986 1 Serratia fonticola IHE 28501 1989 2  
 Salmonella sinstorff INHEM 1986 1 Serratia liquefaciens IHE 28107 1989 4  
 Salmonella soahanina INHEM 1987 1 Serratia marcescens ATCC 8100 1990 1  
 Salmonella tennesse INHEM 1987 1 Serratia marcescens IHE 27938 1989 1  
 Salmonella C INHEM 1987 1 Serratia marcescens 1988 1  
 Salmonella cerro INHEM 1987 1 Shigella flexneri ATCC 12022 1988 1  
 Salmonella typhimurium ATCC 14028 1987 1 Shigella flexneri 1988 2  
 Salmonella typhimurium INHEM 1987 1 Shigella sonnei ATCC 25931 1990 1

ATCC: American Type Culture Collection.

IHE: Instituto de Higiene y Epidemiología de Praga, República Checa.

INHEM: Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba.

## Composición, elaboración y método de siembra del medio de conservación

### Composición:

Caldo corazón 7,5 g

Agar No. 3 1,5 g

Agua destilada csp 300 mL

pH=7

Este medio se basa en el empleo del caldo corazón en sustitución de los componentes de la fórmula original del medio de conservación, propuesto en el Bacteriological Analytical Manual de 1995.<sup>3</sup>

### Elaboración:

- Pesar las cantidades exactas indicadas y calentar los ingredientes hasta lograr su total disolución.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.
- Distribuir asépticamente 3 mL del medio en tubos de 90 x 10 mm (bacilo) y tapar con tapón de goma previamente esterilizados (tubos y tapones por separado).

## Método de siembra del medio de conservación

Tomar inóculos de las cepas cultivadas, previa comprobación de pureza; sembrar en el medio con aguja de nicrón hasta mitad del tubo; incubar por 18-24 h a 37 °C y posteriormente mantener a temperatura ambiente.

## Chequeo de viabilidad

Los cultivos conservados en MSC fueron sembrados en caldo cerebro corazón y se incubaron a 37 °C por 18-24 h. A los cultivos viables se les realizaron las pruebas de tinción de Gram, evaluación de la viabilidad en medios sólidos mediante los métodos de cultivo en placa por agotamiento<sup>4</sup> y la técnica de Miles y Misra "modificada",<sup>5</sup> así como el chequeo de las propiedades bioquímicas por el método convencional de los tubos de ensayo, según lo que reporta la literatura de consulta.<sup>6,7,8</sup> Además, se verificó el mantenimiento de las características antigénicas para las cepas del género *Salmonella sp* mediante la técnica de aglutinación en lámina portaobjetos según el esquema de Kauffman-White,<sup>9</sup> para lo que se utilizaron antisueros comerciales (Wellcome). La figura ilustra la marcha técnica seguida para el desarrollo del trabajo.

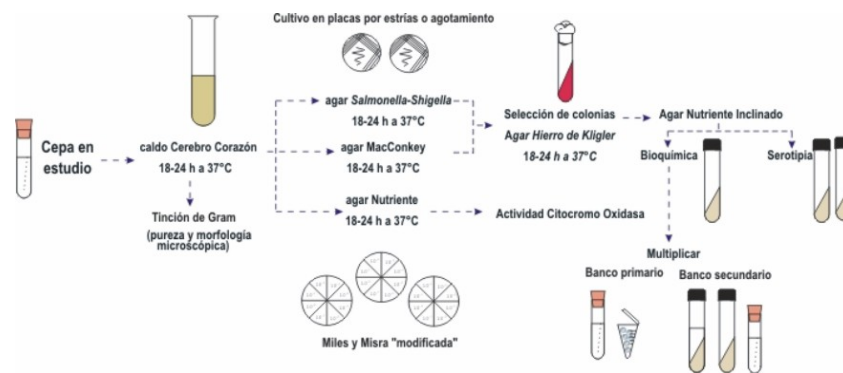


FIG. Procedimiento de comprobación de los cultivos en la CCINHEM. INHEM, 2000-2002.

En la ejecución de este estudio fueron utilizados medios de cultivo BIOCEN<sup>10</sup> y reactivos MERCK<sup>11</sup> de calidad certificada, y los resultados obtenidos referente a la caracterización bioquímica fueron comparados con los datos del estudio inicial correspondiente a la fecha de conservación de las cepas.

## Resultados

La tabla 2 muestra los valores de porcentaje de viabilidad de los cultivos estudiados en correspondencia con la familia microbiana a que pertenecen las cepas, mientras que las tablas 3 y 4 ilustran los resultados de las pruebas fisiológicas evaluadas y la nomenclatura y estructura antigénica de las cepas de *Salmonella sp* incluidas en el estudio, respectivamente. El 87,04 % de los cultivos viables permaneció puro y conservó su respuesta frente a la tinción de Gram, y se obtuvo una buena recuperación de los cultivos en medios sólidos.

Tabla 2. Resultados de la viabilidad de los cultivos por familia bacteriana

Familia bacteriana	Cantidad de cepas		%
	Evaluadas	Viables	
<i>Bacillaceae</i>	2	2	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	55	47	85,45
<i>Enterococaceae</i>	2	1	50,0
<i>Pseudomonaceae</i>	1	1	100
Total	60	51	85,0

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas	Respuestas coincidentes (% de positividad)	Respuestas no coincidentes (% de positividad)

Oxidasa	100	∅
Catalasa	100	∅
Reacción en medio de Kligler		
Glucosa	100	∅
Lactosa	100	∅
Gas	100	∅
H <sub>2</sub> S	100	∅
Descarboxilación en medio de Moeller		
Control	100	∅
Lisina	91	9
Arginina	75	25
Ornitina	91	9
Pruebas misceláneas		
Indol	100	∅
Urea	100	∅
Citrato	100	∅
Movilidad	100	∅
Fermentación de carbohidratos		
Salicina	91	9
Sorbitol	85	15
Manitol	90	10

∅: Respuesta negativa

Tabla 4. Nomenclatura y estructura antigénica de las cepas de *Salmonella* sp estudiadas

Nomenclatura original	Nomenclatura actual	Fórmula antigénica
<i>Salmonella anatum</i>	<i>Salmonella stormont</i>	3,10:d:1,2
<i>Salmonella mission</i>	<i>Salmonella C1</i>	6,7:gms
<i>Salmonella montevideo</i>	<i>Salmonella C1</i>	6,7:gms
<i>Salmonella stanleyville</i>	<i>Salmonella B</i>	O:4
<i>Salmonella senftenberg</i>	<i>Salmonella E4</i>	O:15,19
<i>Salmonella bredeney</i>	<i>Salmonella B</i>	O:4
<i>Salmonella muenchen</i>	<i>Salmonella muenchen</i>	6,8:d:1,2
<i>Salmonella ndolo</i>	<i>Salmonella ndolo</i>	1,9,12:d:1,5

<i>Salmonella agona</i>	<i>Salmonella B</i>	O:4
<i>Salmonella B</i>	<i>Salmonella B</i>	O:4
<i>Salmonella C</i>	<i>Salmonella C2</i>	O:8
<i>Salmonella ser INHEM</i>	<i>Salmonella B</i>	O:4
<i>Salmonella braenderup</i>	<i>Salmonella C1</i>	6,7:eh
<i>Salmonella sinstorf</i>	<i>Salmonella larochele</i>	6,7:eh:1,2
<i>Salmonella kentucky</i>	<i>Salmonella E1</i>	3,10,15:eh
<i>Salmonella binza</i>	<i>Salmonella E1</i>	3,10,15:y
<i>Salmonella othmarschen</i>	<i>Salmonella othmarschen</i>	6,7,14:gmt:-
<i>Salmonella infantis</i>	<i>Salmonella lomita</i>	6,7:eh:1,5
<i>Salmonella minnesota</i>	<i>Salmonella C</i>	6,7:mt
<i>Salmonella oranienburg</i>	<i>Salmonella oranienburg</i>	6,7,14:mt:Z57
<i>Salmonella havana</i>	<i>Salmonella oranienburg</i>	6,7,14:mt:Z57
<i>Salmonella albany</i>	<i>Salmonella</i>	C2 6,7
<i>Salmonella alachua</i>	<i>Salmonella no tipable</i>	-
<i>Salmonella allerton</i>	<i>Salmonella E</i>	3,10:eh
<i>Salmonella tennessee</i>	<i>Salmonella C1</i>	O:6,7
<i>Salmonella soahanina</i>	<i>Salmonella C1</i>	6,7:enx
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	1,4,12:i:1,2
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimuriumm</i>	1,4,12:i:1,2

## Discusión

Del análisis de la tabla 2 se aprecia que el 85,0 % de los cultivos bacterianos se mantuvo viable durante 12 años. El 15,0 de las cepas que no mostró crecimiento (*Budvicia aquatica* IHE 27426; *Enterobacter* sp INHEM; *Shigella flexneri* ATCC 12022; *Salmonella cerro*; *Salmonella edmonton*; *Salmonella heidelberg*; *Salmonella C*; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433), pudiera responder a que originalmente estas fueran preservadas con una viabilidad inferior a 105 Ufc/mL, o a la influencia de factores externos como luz, humedad, temperatura y condiciones de almacenamiento que condicionaron este comportamiento.

Al verificarse la pureza y la morfología microscópica por tinción de Gram de las cepas, se obtuvo que el 87,04 % de los cultivos viables permaneció puro y conservó su respuesta frente a esta prueba. Además, se constató que la morfología microscópica resultó ser algo variable por la existencia de bacilos cortos Gram-negativos, explicable por el tiempo de conservación que tienen las cepas durante el cual han permanecido inactivas y sometidas a condiciones de stress. Las 7 conservaciones restantes 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, ilustrada por el crecimiento hasta las últimas estrías en los medios ensayados. Durante la cuantificación de las Ufc/mL en agar nutriente se obtuvo que el 45,3 % de los cultivos mantuvo sus niveles de viabilidad del orden de  $10^7$  Ufc/mL, valor considerado como muy bueno si se considera el tiempo de vida de las cepas, dato que sugiere que su conservación se efectuó a partir de cultivos en óptimas condiciones de crecimiento, es decir, fase exponencial. Este resultado, al igual que los obtenidos por Aulet de Saab<sup>12</sup> contribuye a enriquecer la evidencia de que la probabilidad de obtener resultados satisfactorios de recobrado es mayor cuando se realiza la preservación de los microorganismos, partiendo de cultivos con niveles de viabilidad elevados ( $>10^{10}$ ).

En la tabla 3 se muestra que el 95,2 % de las respuestas bioquímicas obtenidas en los 2 estudios (inicial y actual) fueron coincidentes para las 17 pruebas evaluadas de forma común en ambos estudios. Esto corrobora que ambas caracterizaciones son válidas, sin errores en la identificación de los microorganismos, lo que se comprueba al compararse los datos obtenidos en el comportamiento bioquímico de cada uno de los microorganismos con los valores de las tablas de identificación de Barrow & Feltham<sup>6</sup> y Weissfeld.<sup>7</sup>

La nomenclatura y estructura antigénica de las cepas de *Salmonella sp* incluidas en el estudio, se muestra en la tabla 4, en las cuales se verificó que todas las cepas corresponden a serovares de *Salmonella enterica subsp enterica*<sup>9</sup> y, aunque algunas mantienen su nombre original, otras han adquirido uno nuevo, lo que demuestra, una vez más, que la nomenclatura de estas bacterias ha cambiado muchas veces y todavía no es estable,<sup>13</sup> por la aparición de nuevas estructuras antigénicas. De las 28 cepas identificadas como especies del género *Salmonella sp*, se reporta que el 64,29 % de los cultivos (18) se identificaron hasta el nivel de grupo al no disponer de una batería completa de antisueros flagelares, el 32,14 (9) hasta el nivel de serogrupo y sólo una cepa resultó no tipable (3,57).

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que el medio semisólido de conservación resultó apropiado para el mantenimiento de las cepas bacterianas en estudio durante más de 12 años, al permitir la conservación de los cultivos con un 85,0 % de viabilidad del orden de  $10^7$  Ufc/mL, la pureza en un 87,0 y la estabilidad de las propiedades fisiológicas en un 95,2. Este hecho, unido a las ventajas de fácil elaboración, manipulación y condiciones de almacenamiento del medio, sugiere su utilización como método simple de conservación en los laboratorios con limitados recursos.

## Referencias bibliográficas

1. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Argen Microbiol 1998;30:42-51.
2. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM 2000; 30:12-6.



3. Solomon HM. Media and reagents. In: Jackson GL (eds). Bacteriological Analytical Manual. 8ed. App. 3. Washington: US Food and Drugs Administration; 1995.p.32.
4. Washington JA. Principle of diagnosis. En: Baron S (eds). Medical microbiology. 4 ed. Washington, DC: Library of the Congress; 1996:134-43.
5. López N. Manual de procedimientos del área de control de la calidad. 2 ed. Ciudad de La Habana: INHEM;1998:10.
6. Barrow GI, Feltham RKA. Characters of Gram-negative bacteria. En: Barrow GI & Feltham RKA (eds). Cowan & Steel's manual for identification of medical bacteria. 3 ed. Chapter 7th. Cambridge: University Press; 1999.p.:94-164.
7. Weissfeld AS; McNamara AM; Tesh VL; Howard BJ. Enterobacteriaceae. En: Howard BJ (eds). Clinical and pathogenic microbiology. 2 ed. Washington: Mosby Year Book, Inc; 1994.p.299-336.
8. Valdés-Da Pena MM. En: Enterobacterias. Llop A, Valdés-Da pena MM Zuazo JL. Microbiología y Parasitología médicas. TI, Cap 26. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2000:251-80.
9. Popov YM. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 8th rev. WHO Collaborating Center for reference and research on Salmonella. Paris: Institute Pasteur; 2001:151.
10. Rodríguez C. Manual de medios de cultivo. 2 ed. La Habana: Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN); 2001:200.
11. Merck E. Microbiology manual. Darmstadt: Merck KGAA; 2000:407.
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. Euzéby JP. Revised Salmonella nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Poppo 1987 sp Nov., nom. Rev. As the neotype species of the genus *Salmonella lignieres* 1900 (approved list 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1984) Weldin 1927 (approved list 1980), conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved list 1980). Request for an opinion. International Journal of Systematic and Bacteriology, 1999;49:927-30.

Recibido: 3 de marzo de 2005. Aprobado 15 de abril de 2005.

Lic. *Zulia Weng Alemán*. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Departamento de Microbiología Sanitaria. Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel, Centro Habana, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: [weng@infomed.sld.cu](mailto:weng@infomed.sld.cu)

<sup>1</sup>Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Agregada, Instructora.

<sup>2</sup>Máster en Salud Ambiental. Especialista en Microbiología. Investigadora y Profesora Auxiliar.

<sup>3</sup>Técnico A en Laboratorio Sanitario.

<sup>4</sup>Técnica en Procesos Biológicos. Adiestrada.