

Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad

Nancy Burguet-Lago, Nelson Sierra-Prado, *Lázaro C. Brito-Godoy

Laboratorios Liorad, Avenida 27 A no. 26402 entre calles 264 y 268, Reparto San Agustín, La Lisa, La Habana. Cuba. nburguet@liorad.quimefa.cu, *Hospital Luisa C. de Gandulfo, Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 22 de marzo de 2012.

Aceptado: 1 de septiembre de 2012.

Palabras clave: liofilización, colecciones de cultivos, sustancias lioprotectoras, control microbiológico.
Key words: freeze drying, collections of cultivation, lyoprotector substances, microbiological control.

RESUMEN. La liofilización es uno de los métodos más empleados para la conservación de microorganismos debido a sus numerosas ventajas, entre la que resalta tiempo de supervivencia prolongado. La selección de los aditivos que permitan lograr tanto una buena apariencia como una estabilidad prolongada del material liofilizado es uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta al emplear este método. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los resultados de la conservación de las cepas microbianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de liofilización durante un periodo de cinco años. Para el crecimiento de las cepas se utilizó el medio de cultivo Caldo Tripton Soya y la leche descremada y glicerol al 20 % como sustancias lioprotectoras, se evaluó viabilidad, pureza e identidad de cada una de estas cepas. Las características propias de las especies estudiadas se mantuvieron inalterables con un elevado grado de pureza. Las cepas en leche descremada al 20 %, durante el tiempo evaluado conservaron la viabilidad en niveles adecuados. El glicerol al 20 % resultó una buena sustancia lioprotectora para las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* al mantener la estabilidad de la viabilidad. No así para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* que evidenció una disminución de supervivencia a los tres años. La conservación por liofilización es un método de gran utilidad en el trabajo de las colecciones de cultivos que se emplean para el control microbiológico.

ABSTRACT. Freeze drying is one of the most popular methods used for the preservation of microorganisms. One of the many advantages of this method is the prolonged survival time. The selection of additives to achieve a good appearance as a long-term stability of the freeze dried material is one of the most important aspects to take into the consideration when you are using this method. The objective of this job was to evaluate the results of the conservation of the microbial strains *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by drying method for a period of five years. For the growth of the strains it was used the tryptone soya broth, skim milk and 20 % glycerol as lyoprotector substances. Viability, purity and identity were evaluated of each of these strains. The characteristics of these species remained unchanged with a high degree of purity. The strains in skim milk to 20 %, during this time of observation, retained viability at adequate levels. The glycerol at 20 % was a good lyoprotector substance for the *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* strains to maintain the stability of the viability; however a decrease to the three years was showed for the survival of the *Pseudomonas aeruginosa*. The conservation by freeze-drying is a method of great utility in the work of the collections of cultivation employed to microbiological control.

INTRODUCCION

Los microorganismos representan un papel esencial para el mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas globales y como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología.¹ Por eso es necesario conservar toda esta fuente microbiana y esto se garantiza mediante las colecciones de cultivos.²⁻⁶ En la última década, se ha visto un marcado aumento en la concientización del valor de las colecciones de cultivos. Actualmente, existen en el mundo alrededor de 488 colecciones de 65 países registradas en el Centro de Datos Mundial de Microorganismos de Japón. Además, se han establecido organizaciones mundiales, regionales y nacionales.^{7,8}

El acelerado desarrollo en Cuba de la industria farmacéutica y biotecnológica, así como el potencial uso de los microorganismos, obligan cada vez más a promover actividades de aseguramiento de la calidad para su conservación, de manera que puedan ser utilizados en diversos ensayos analíticos en los laboratorios de control microbiológico.⁹⁻¹¹

La necesidad de mantener y disponer de cultivos de calidad impuso la introducción de métodos de conservación de microorganismos que reducen al mínimo la posibilidad de contaminación y garantizan al menos la supervivencia del 70 % de las células por un periodo determinado de tiempo.¹²⁻¹⁴ La liofilización

es el método de elección debido a sus numerosas ventajas, entre las que se puede resaltar la posibilidad de minimizar al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más.¹⁵⁻¹⁹ Además es recomendable por su comodidad en almacenamiento y transporte de las cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18 a 20 °C o bien de 4 a 6 °C.²⁰⁻²⁴

El laboratorio de control microbiológico de Laboratorios Liorad disponía de una colección de cepas procedentes de subcultivos de cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC).²⁵ El método de conservación empleado era la congelación a - 70 °C, metodología que no resulta la más conveniente para la conservación por largos periodos de tiempo, por tal motivo surgió la necesidad de evaluar otra estrategia de conservación para estos microorganismos. La metodología propuesta fue emplear el Caldo Triptona Soy (CTS) como medio de crecimiento, la leche descremada y el glicerol al 20% (sustancias lioprotectoras), la liofilización como método de conservación y ensayos de calidad: viabilidad, pureza e identidad.²⁶

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los resultados de la conservación de las cepas microbianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de liofilización empleando dos lioprotectores durante un periodo de cinco años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acervo Microbiano

Formaron parte de este estudio cuatro cepas bacterianas del lote Maestro, el cual fue elaborado a partir de un subcultivo primario de cepas ATCC. Las que se encuentran depositadas en la colección de cultivos microbianos de Liorad: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, todas conservadas por el método de liofilización durante un período de cinco años.

Recuperación de los microorganismos

Para la obtención del lote Maestro, se restituyó con 1 mL de CTS, cada una de las ampulas liofilizadas originales (procedentes de la ATCC). Para comprobar la pureza, se tomó 0,1 mL de las suspensiones bacterianas y se inoculó en una placa de Agar Triptona Soya (TSA), la cual fue incubada a 35 °C $\pm$ 2 °C por 24 h. Se observaron las colonias características para cada uno de los microorganismos y se comprobó su carácter tintorial mediante tinción de Gram.^{17,24}

Conservación de los microorganismos

La conservación de las cepas de microorganismos que forman el lote Maestro se realizó por el método de liofilización. Se empleó como sustancias lioprotectoras: leche descremada y glicerol al 20 %.^{18,19}

Preparación de la suspensión

Se depositó 20 μ L de la suspensión de microorganismo a liofilizar, en una placa de TSA, se diseminó en forma de césped e incubó de 18 a 24 h a (35 $\pm$ 2) °C, se colectó un cuarto del crecimiento del cultivo con un hisopo estéril, e inocularon erlenmeyers que contenían 100 mL de medio CTS, se colocaron en zaranda a 37 °C y 170 r/min durante 2 h. Las células fueron colectadas por centrifugación a 4 °C durante 30 min a 10 000 r/min. La biomasa se resuspendió en 50 mL de las diferentes disoluciones lioprotectoras (leche descremada y glicerol 20 %), y se homogeneizó completamente. Se tomaron 100 μ L de cada suspensión para determinar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) antes de la liofilización. Se distribuyó 1 mL en bulbos estériles y se colocó el tapón sobre la boca del bulbo y este sobre la bandeja de la liofilizadora.^{17,24}

Condiciones de liofilización

La liofilización se realizó en un equipo liofilizador de laboratorio marca Edwards modelo Modulyo. El proceso se inició a una temperatura de congelación - 70 °C, de condensación - 50 °C y de secado 35 - 37 °C. La presión de trabajo en la cámara fue de 10 Pa. Una vez concluido el proceso, los bulbos se sellaron al vacío y fueron identificados con una etiqueta con los datos siguientes: género y especie, código de la cepa, número de lote y fecha de liofilización. Posteriormente se almacenaron entre 2 y 8 °C para garantizar su estabilidad a largo plazo.

Eficacia del método de conservación

Se restituyeron dos bulbos de las cepas en ensayo a su volumen de liofilización con 2 mL de CTS, se mezclaron de forma homogénea para obtener una muestra representativa y se determinó la pureza, viabilidad y se comprobaron las características bioquímicas.^{17,24,26}

Pureza

Con el fin de observar la pureza bacteriana, se transfirió el contenido de los bulbos de cada cepa a un tubo con 20 mL de CTS. Los tubos fueron colocados en zaranda con agitación durante 2 h a una temperatura de 35 °C $\pm$ 2 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió de igual forma que lo descrito para la verificación de la pureza de las cepas provenientes de la ATCC.

Viabilidad

Después de la liofilización, se realizó el recuento de UFC/mL por diluciones seriadas hasta 10^{-8} y siembra en superficie en TSA. Cada dilución se sembró por triplicado. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL, valor establecido en las especificaciones de calidad del lote Maestro.

Comprobación de las características bioquímicas

Se llevó a cabo a través del empleo de una prueba de diagnóstico e identificación Liofilchem de Italia (sistema colorimétrico). Se procedió a inocular 0,2 mL de la suspensión bacteriana en los pocillos que contenían los substratos bioquímicos desecados. La interpretación de los resultados se realizó mediante el viraje de color de los distintos pocillos del sistema, a los cuales se les dió puntuación de acuerdo con un código numérico establecido por el fabricante en forma tabulada para cada una de las pruebas, lo que permitió la identificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La recuperación de los microorganismos evidenció que para las cepas estudiadas se seleccionó un buen método de conservación (la liofilización).^{19,22} Las sustancias lioprotectoras (leche descremada y glicerol al 20 %) en ambos casos permitieron lograr una buena apariencia de la pastilla liofilizada y rehidratación instantánea. A pesar que de manera general está más extendido el empleo de mezclas de lioprotectores porque en la mayoría de los casos, se obtienen mejores resultados que cuando se emplean las sustancias puras. No obstante, en este trabajo se obtuvieron buenas características durante el proceso de liofilización. Las disoluciones lioprotectoras son sustancias que se añaden con el objetivo de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización o de almacenamiento de ambos, aunque en la mayoría de los casos, los mecanismos del efecto protector son poco conocidos.^{21,23}

La observación microscópica de los cultivos demostró la presencia, de cultivos puros, en cada una de las especies estudiadas. Las colonias observadas coincidieron con la morfología típica de las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 morfología reportada en los certificados de calidad de estas cepas. La valoración de que los microorganismos estén biológicamente puros es un aspecto crítico en la caracterización microbiológica, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes.⁹

El estudio de viabilidad de las cepas bacterianas de referencia liofilizadas con leche descremada y glicerol al 20 % por un periodo de cinco años se muestran en las tablas 1 y 2. Para un buen recobrado de la viabilidad después de la liofilización, el agente lioprotector debe adoptar el papel del agua y restablecer los puentes de hidrógeno con las membranas.¹⁵ De este modo, para un microorganismo dado existen solo uno o dos lioprotectores adecuados.²²

Tabla 1. Recuentos de UFC/mL de recobrado de las cepas bacterianas de referencia conservadas en leche descremada al 20 %, antes y después de la liofilización en los diferentes tiempos evaluados.

Cepas bacterianas	Antes de Liofilizar	24 h	1.º año	2.º año	3.º año	4.º año	5.º año
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,6 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	$3,8 \cdot 10^8$	$6,4 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5$
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,5 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^6$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,3 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$

La viabilidad se expresa en UFC/mL.

El efecto protector de la leche descremada fue observado en las cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* al obtener resultados de viabilidad después de la liofilización durante los cinco años de estudio por encima de 10^6 UFC/mL, valores que sobrepasaron el criterio de evaluación establecido en las especificaciones de calidad del laboratorio (niveles de viabilidad igual o mayor al orden de 10^5 UFC/mL) por lo que se consideró que el procedimiento evaluado, mantuvo la viabilidad de los cultivos liofilizados (Tabla 1). Se recomienda como sustancia lioprotectora de excelencia la leche descremada (sustancia proteica) por sus buenos resultados en la preservación de la viabilidad en el proceso de liofilización.^{21,23}

Tabla 2. Recuentos de UFC/mL de recobrado de las cepas bacterianas de referencia conservadas en glicerol al 20 %, antes y después de la liofilización en los diferentes tiempos evaluados.

Cepas bacterianas.	Antes de Liofilizar	24 h	1.º año	2.º año	3.º año	4.º año	5.º año
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,6 \cdot 10^9$	$6,6 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	$2,0 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,5 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^6$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,3 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^5$	---	---

La viabilidad se expresa en UFC/mL.

Los factores que influyen en la supervivencia de los microorganismos a la liofilización son muy complejos y poco entendidos. La adición de polioles (glicerol) previene el daño del material liofilizado.^{20,23} Los resultados de este trabajo confirman que en la variante glicerol 20 % la viabilidad en las cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* no se afectó significativamente durante el tiempo objeto de estudio. Sin embargo, no se obtuvieron los mejores resultados con el empleo de esta sustancia lioprotectora con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que evidenció una disminución de viabilidad a los tres años de depositadas en la colección, por lo que este lioprotector resulta inadecuado para este microorganismo (Tabla 2).

Los ensayos de identidad de todas las cepas mostraron que el comportamiento de las características culturales, morfológico-tintoriales y fisiológico-bioquímicas ensayadas se mantuvieron de acuerdo con la descripción de las especies.²⁶

CONCLUSIONES

Al emplear la liofilización como método de conservación se comprobó que se mantienen inalteradas las características propias de las especies microbianas estudiadas, con un alto grado de pureza. De las sustancias lioprotectoras ensayadas durante un periodo de cinco años, la leche descremada al 20 % contribuye a conservar las cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* al obtener resultados de viabilidad con valores que sobrepasaron el criterio de evaluación establecido en las especificaciones de calidad del laboratorio. El glicerol al 20 % resultó una buena sustancia lioprotectora para las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, no así para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* cuya viabilidad disminuye en su presencia a partir de los tres años de depositadas en la colección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Morales YE, Duque E, Rodríguez O. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Rev. Biotecnología Aplicada. 2010; 14 (2):11.
- Del Puerto CA, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocedo MD, Carnota GY *et al.* Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. Rev. Vaccinimont. 2009; 18 (1): 20-24
- Smith D. Culture collections over the world. Int Microbiol. 2003; 6(2): 95-100
- Pérez G, Iglesias E, Travieso F. Reporte del Grupo Nacional de Colecciones de Cultivos Microbianos. 1997. Revista CENIC Ciencias Biológicas 1998; 29(3):212-4.
- Smith D, Ryan MJ. Culture collections in the twenty first century. Biologist. 2001; 48(3):125-8.
- World Federation of Culture Collection. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd ed. Japan: WFCC Executive Board; 2010. Available from: <http://www.wfcc.info/guidelines/>
- Iglesias E, Morales M, Morales R, Weng Z, Cabrera R, *et al.* Colecciones cubanas de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. 2008; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay; 2008.
- Iglesias E, Del Puerto CA, Martínez R, González M, Baños N, Simón B, *et al.* Establecimiento del cepario central del polo. VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. 2010 Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Rev Cubana Hig. Epidemiol. 2005; 43 (3):1-7.
- Uruburu F. History and services of culture collections. Int Microbiol. 2003; 6 (2): 101-103.
- Montes de Oca N, Gonzáles RA, Riverón Y, Núñez A, Villoch A, Rodríguez N. Las Colecciones de Cultivos en el CENSA. VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. 2008; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Argent Microbiol. 1998; 30 (1):42-51
- Weng Z. Conservación de microorganismos: importancia y retos. VII Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. 2010; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Palazon Z, Delgado AM. Estudio y desarrollo de un método de conservación de cepas. V Taller sobre colecciones de cultivos microbianos. 2006; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Stell KJ, Ross HE. Survival of freeze dried bacterial cultures. J. Appl. Microbiol. 2008; 26 (3):370-375.
- Perry SF. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Methods Molecular Biotechnology. 1995; 38 (7): 21-30.
- Burguet N, Sierra N, Trimiño JA. Estudio sobre la recuperación de la cepa microbiana *Escherichia coli* conservada en liofilización. VI Taller de Colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos. 2008; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Sotolongo J. Conservación de microorganismos por liofilización. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. 2006; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- Giono S, Arteaga RI. Recomendaciones generales para la liofilización de cultivos microbianos. Boletín FELACC: 2010(4):2-4
- Delgado H, Moreira T, Luis L, García H, Martino TK, Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. Cryo-Letters 1995 [Acceso citado: enero -abril. 2004]; 16: 91-101.
- Dráber P, Dráberová E, Nováková M. Stability of monoclonal IgM antibodies freeze-dried in the presence of trehalose. J. Immunol. Methods. 1995; 181(1): 37-43.
- Theunissen JJH, Stolz E, Michel ME. The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. J Appl Bacteriol. 1993; 75 (5): 473-477.
- Hensel A. Influence of serum and glucose additives on survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* aerosolized from the freeze-dried state. Appl Environ Microbiol. 1994; 60 (6): 2155-2157.
- Del Puerto CA, Callicó A. Preservación de *Pseudomonas aeruginosa* por liofilización. Resultados preliminares. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. 2006; Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay.
- American Type Culture Collection Technical Bulletin no. 6 Reference strains: How many passages are too many? Reprinted from ATCC Connection. 2003; 23 (2):6-7.
- Liofilchem Diagnostici. Integral System colorimetric per l'identificazione biochimica. Roseto DA., Italy: Liofilchem Bacteriology Products; 2007