

Estudio de consistencia de un cultivo en zaranda de *Streptococcus pneumoniae* 19A a escala de 40 L

Katherin Izquierdo-Fiallo* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1487-174X>

Yuneisy Guerra-Peña. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2561-977X>

Laura Remedios-Jiménez. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0451-9961>

Arbell Lemus-Cortés. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2330-2381>

Adrián Burget-Batista. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9184-1272>

José L. Pérez-Quintero. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8160-4073>

Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

email: kizquierdo@finlay.edu.cu

Streptococcus pneumoniae es un patógeno oportunista que puede causar infecciones como otitis media, neumonía, sepsis y meningitis. Sin embargo, existen muchas limitaciones para el cultivo en zaranda de este microorganismo en los laboratorios de microbiología. Por esta razón, se realizó un estudio de la consistencia del cultivo en zaranda de *Streptococcus pneumoniae* 19A a escala de 40 L. Para esto se desarrolló previamente la curva de crecimiento patrón hasta las 5 h. Desde el pre-inóculo se inocularon 6 frascos de 100 mL, de los cuales se realizó la inoculación en botellones de 1 L y 5 L. En todos los casos, se determinó la pureza a partir de la tinción de Gram y el crecimiento bacteriano se monitoreó por el método de conteo de viables y la densidad óptica cada 1 h. Además, se evaluó el rendimiento del cultivo a partir de la cantidad de biomasa obtenida por peso húmedo. Cada proceso se llevó a cabo en condiciones iguales por triplicado. En los tres procesos se obtuvieron curvas de crecimiento similares, tanto por densidad óptica como por conteo de viables, alcanzando una viabilidad máxima de 10^9 UFC/mL en la última escala. Además, se obtuvieron rendimientos de biomasa de 11,62; 11,92 y 11,60 g/L, respectivamente. Estos resultados demuestran que la metodología utilizada ofrece una consistencia de este proceso, a pesar del alto volumen de cultivo en zaranda, lo cual no afectó la calidad de la biomasa, demostrado por la viabilidad final.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*; medios de cultivo; crecimiento bacteriano; biomasa.

Introducción

Los cultivos microbianos proporcionan el entorno químico y físico requerido para la multiplicación adecuada y el estado fisiológico bacteriano.⁽¹⁾

Por esta razón, se utilizan como una herramienta fundamental para el estudio de bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades infecciosas, de ahí su importancia en el proceso de fabricación de bioproductos, especialmente vacunas. Tal es el caso de *Streptococcus pneumoniae*, un patógeno oportunista que coloniza las superficies de las mucosas del tracto respiratorio superior humano y puede causar infecciones como otitis media, neumonía, sepsis y meningitis.⁽²⁾

Entre los mayores grupos de riesgo se encuentran los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas, por lo que la infección puede terminar con la muerte del individuo. Por esta razón, en el 2017, la Organización Mundial de la Salud incluyó a *S. pneumoniae* como uno

de los 12 patógenos prioritarios,⁽³⁾ de ahí la importancia del estudio y la caracterización del microorganismo. Sin embargo, su estudio se ve limitado en laboratorios de microbiología, pues necesita medios de cultivo complejos que compensen sus elevados requerimientos metabólicos y condiciones de cultivo altamente controladas.⁽⁴⁾ Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio de la consistencia del cultivo en zaranda de *S. pneumoniae* 19A a una escala de 40 L.

Materiales y Métodos

Cepa: cepa de *S. pneumoniae* 19A (de la colección de cepas del Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba).

Medios de cultivo:

- Agar base sangre, suplementado con un 5% de sangre de carnero.

* Licenciada en Microbiología, Especialista CITMA, Departamento de Biomoléculas Bacterianas.

- Medio de cultivo líquido para *S. pneumoniae* (MLSP): se preparó a 100 g/L de peptona y a 50 g/L de glucosa.

Condiciones de cultivo en medio de cultivo sólido: se sembraron 100 µL de una crioconservación de *S. pneumoniae* 19A en placas de agar sangre en forma de césped. Se incubaron durante la noche (18-24 h) en una incubadora de CO₂ con ~5% de CO₂ a 37°C.

Curva de crecimiento: se realizó determinando el crecimiento celular cada 1 h hasta alcanzar las 5 h, mediante el método de conteo de viables y la densidad óptica (D.O.). A partir de estas curvas, se calculó la velocidad específica de crecimiento considerando nuestras condiciones de laboratorio y medio de cultivo.⁽⁵⁾

Preinóculo (Etapa 1): la biomasa bacteriana se recogió con la ayuda de un hisopo y se colocó en cinco viales, cada uno con 5 mL de MLSP. A cada preinóculo se le determinó la pureza a través de la tinción de Gram. Los pre-inóculos se homogeneizaron y se inocularon en dos botellas ISO de 100 mL. Se ajustó la D.O. inicial a 600 nm en los frascos de 100 mL a 0,2 justo después de la inoculación (To). Una de las dos botellas se seleccionó al azar y se utilizó para controlar el crecimiento bacteriano por turbidez (D.O. λ 600 nm) cada 1 h. Ambos frascos se colocaron en un agitador orbital a 37°C y 80 rpm (RFI-125 Inkubator, Infors AG, Bottmigen, Basilea, Suiza).

Escala 100 mL (Etapa 2): cuando la D.O. del frasco monitoreado era uno o más, se determinó la pureza a través de la tinción de Gram. Al verificar la pureza, se inocularon 10 mL en ocho frascos de 100 mL, que contenían 90 mL de MLSP.

Escala 1 L (Etapa 3): cuando la D.O. era uno o más, se determinó la pureza de todos los frascos a partir de la tinción de Gram. Al verificar la pureza de las suspensiones bacterianas, se homogeneizaron en un frasco de 1 L. A partir de este, se inocularon 100 mL en seis frascos de 100 mL, que contenían 900 mL de MLSP.

Escala 5 L (Etapa 4): cuando la D.O. era uno o más, se determinó la pureza de todos los frascos a partir de la tinción de Gram. Al verificar la pureza de las suspensiones bacterianas, se homogeneizaron y se inocularon ocho frascos de 5000 mL.

En todos los casos, el crecimiento microbiano se realizó y controló de la misma manera.

Cuando la D.O. era uno o más, se determinó la concentración celular mediante el método de conteo de

viables y tinción de Gram, así como se sembró en placas de agar sangre como control de pureza confirmatorio. Se evaluó el rendimiento del cultivo por peso húmedo a partir de la cantidad de biomasa obtenida.

Cada proceso se llevó a cabo en condiciones iguales por triplicado.

Resultados y Discusión

En la siembra en placas de agar sangre, se obtuvieron pequeñas colonias grisáceas, húmedas (mucoïdales) y con bordes lisos, mostrando el halo de alfa hemólisis circundante (verde), características fenotípicas típicas de *S. pneumoniae*.⁽⁶⁾ En la caracterización microscópica se observan cocos Gram-positivos en pares formando diplococos y cadenas en medio líquido.

A partir del análisis integrado de las curvas de crecimiento patrón realizadas (resultados no mostrados) se pudo estudiar y analizar el comportamiento de esta bacteria bajo las condiciones de nuestro laboratorio. Se determinó que la máxima velocidad específica de crecimiento alcanzada es de 1,4; obteniéndose una viabilidad máxima de 2×10^9 UFC/mL, valor correspondiente a una D.O. de 1,5.

En todos los procesos, se obtuvieron curvas de crecimiento similares (Fig. 1) y se obtuvieron valores de viabilidad máxima superior a 1×10^9 UFC/ mL en la última etapa (Fig. 2).

Las curvas de crecimiento en la etapa 1 en los tres procesos se comportaron de manera muy similar. En esta etapa, se observa el período de adaptación durante la primera hora, dado principalmente por el cambio del medio de cultivo, de sólido a líquido, ya que a pesar de que ambos son medios enriquecidos, su composición química y consistencia es diferente, y por tanto cambian las rutas metabólicas involucradas en la adquisición y asimilación de los nutrientes.

Durante esta fase de adaptación o latencia, las bacterias se adaptan a las nuevas condiciones de crecimiento, al mismo tiempo que ocurre un proceso de maduración y no tienen la posibilidad de dividirse. Se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas que les permiten multiplicarse en el medio de cultivo fresco, aumentando la actividad metabólica.^(5,7)

Durante la segunda hora se observa la fase de aceleración positiva, en donde existe un aumento en la tasa de crecimiento hasta alcanzar la máxima velocidad específica de crecimiento posible para esta bacteria

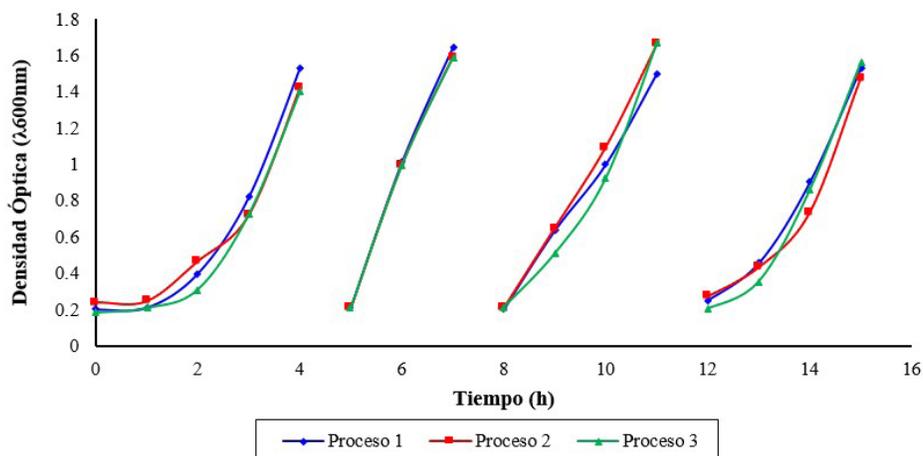


Fig. 1. Curvas de crecimiento realizadas a partir de la densidad óptica medida cada 1 h en cada escala del cultivo en los tres procesos realizados.

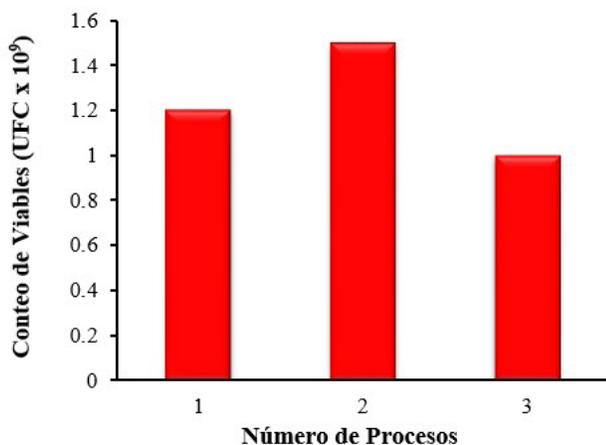


Fig. 2. Conteo final de viables en los tres procesos en la última etapa del cultivo.

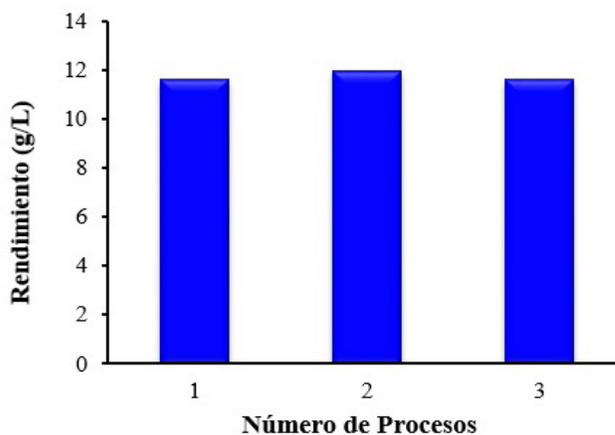


Fig. 3. Rendimiento de Biomasa obtenido en los tres procesos en la última etapa del cultivo.

en estas condiciones de cultivo. Ya en este punto se evidencia la fase exponencial, donde se alcanza la máxima tasa de división bacteriana. A partir de la cuarta hora comenzaría la fase de muerte celular, determinado por la curva de crecimiento patrón.

En la etapa 2, el inóculo se extrae de un cultivo en fase exponencial y se inocula al mismo medio de cultivo en las mismas condiciones de crecimiento, de modo que no se observa otra fase de latencia y el crecimiento exponencial continúa a la misma velocidad en línea recta. Uno de los principales inconvenientes de trabajar con *S. pneumoniae* en el laboratorio es su alta susceptibilidad y la pérdida de viabilidad atribuido al fenómeno de autólisis,⁽⁸⁾ que puede causar las variaciones observadas en las curvas en las etapas 3 y 4.

Si se toma el inóculo a partir de un cultivo donde existen células autolisadas, aunque se inocule en el

mismo medio, generalmente se produce una fase corta de latencia (diferente al de la etapa 1), pues las células requieren un tiempo para reparar el daño celular reversible y neutralizar las posibles sustancias tóxicas producidas,⁽⁵⁾ este fenómeno determinará el tiempo de restauración de la viabilidad celular. Sin embargo, esto no afectó ni la viabilidad final, ni los rendimientos asociados a la biomasa bacteriana, pues se obtuvieron valores de 11,62; 11,92 y 11,60 g/L en los procesos 1, 2 y 3 respectivamente (Fig. 3), siendo superior el del proceso 2.

Conclusiones

Estos resultados demuestran que la metodología utilizada ofrece una alta consistencia del proceso, ya que en cada uno de ellos se obtuvo un rendimiento de biomasa muy similar. Además, la metodología utilizada,

a pesar del alto volumen de cultivo en zaranda, no afectó la calidad de la biomasa, lo que se demostró mediante la viabilidad bacteriana final.

Conflicto de intereses

Los autores son trabajadores del Instituto Finlay de Vacunas, pero no han recibido ningún tipo de apoyo financiero por esta investigación.

Referencias

1. Junco-Díaz R de los A, Rodríguez-Pérez CM. Capítulo 7. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En: Llop-Hernández A, Váldez Dapena-Vivanco MM, Zuazo-Silva JL. *Microbiología y Parasitología Médica*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p.45-54.
2. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:355-67.
3. World Health Organization. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: WHO; 2017. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255336>.
4. Texeira E, Checa J, Rial A, Chabalgoity JÁ, Suárez N. A new chemically defined medium for cultivation of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 1. *J. Biotech Res*. 2015;6:54-62.
5. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. *Brock Biology of Microorganism*. 13ª edition. London: Pearson; 2012.
6. Organización Panamericana de la Salud e Instituto Nacional de Salud de Colombia. Procedimientos para el diagnóstico de Neumonías y Meningitis Bacterianas y la caracterización de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, SIREVA II; 2012. Bogotá: INS; 2012.
7. Woolverton CJ, Willey JM, Sherwood LM. *Prescott's Microbiology*. 8ª edition. New York: McGraw-Hill; 2010.
8. Adeniyi-Jones CC, Stevens DL, Rasquinha ES. False no-growth blood cultures in pneumococcal pneumonia. *J. Clin Microbiol* 1980;12:572-5.

Study of the consistency of a culture on of *Streptococcus pneumoniae* 19A on rotational shaker at a scale of 40 L

Abstract

Streptococcus pneumoniae is an opportunistic pathogen that can cause infections including otitis media, pneumonia, sepsis and meningitis. However, there are many limitations for the cultivation in shaker of this microorganism in microbiology laboratories. For this reason, a study of the consistency of the culture in shaker of *Streptococcus pneumoniae* 19A was carried out at a scale of 40 L. The pattern growth curve was made until 5 h, under our laboratory conditions and culture medium. From the pre-inoculum 6 bottles of 100 mL were inoculated, from which the scaling was accomplished to bottles of 1 L and 5 L. In all cases the purity was determined by Gram staining and the bacterial growth by viable counting method and the optical density were monitored every 1 h. In addition, the yield was evaluated from the determination of the amount of biomass obtained by wet weight. Each process has been made in equal conditions in triplicate. In the three processes, similar growth curves were obtained both by optical density and by viable counts, reaching a maximum viability of 10^9 CFU/mL on the last scale. In addition, biomass yields of 11.62, 11.92 and 11.60 g/L were obtained, respectively. These results demonstrate that the methodology used offers a high process consistency, despite the high volume of culture in rotational shaker, and did not affect the quality of the biomass, which could be demonstrated by the viable count.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; culture media; bacterial growth; biomass.

Recibido: 29 de Enero de 2020

Aceptado: 4 de Febrero de 2020