

Evaluación de una estrategia de conservación para *Brevundimonas diminuta*

Nancy Burguet* , Nelson Sierra

Departamento de Investigación y Desarrollo, Laboratorios Liorad. Calle 27 A e/ 264 y 268 Rpto. San Agustín, La Lisa. La Habana, Cuba.

email: nburguet@liorad.quimefa.cu

Brevundimonas diminuta se reconoce internacionalmente como el microorganismo estándar para las pruebas de reto bacteriano. El Laboratorio de Control de la Calidad de los Laboratorios Liorad dispone de una colección de cepas de referencia donde se encuentra depositada esta cepa, conservada por el método de congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, replicada en el medio de cultivo Caldo Lactosa Salina (CLS). Esta metodología no resultó la más conveniente, por lo que se evaluó otra estrategia de conservación para este microorganismo, donde se empleó el Caldo Triptona Soya como medio de crecimiento, la leche descremada al 20% como sustancia lioprotectora y la liofilización como método de conservación. Para verificar el sustento del cultivo se realizó un adecuado control de la calidad que incluyó la comprobación de pureza y la viabilidad y estabilidad de las propiedades de interés. Los resultados obtenidos durante los 24 meses en que se llevó a cabo el estudio de estabilidad en tiempo real confirmaron que el método elegido brindaría una alternativa y solución al problema relacionado con la conservación de esta cepa.

Palabras clave: *Brevundimonas diminuta*, estabilidad, sustancia lioprotectora, liofilización.

Introducción

Las colecciones de cultivos microbianos deben mantener cepas viables sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos (1). Las cepas de referencia depositadas en colecciones de cultivos de microorganismos en laboratorios de control de la calidad de la industria biofarmacéutica son usadas en esquemas de certificaciones de la calidad (2).

El microorganismo *Pseudomonas diminuta*, actualmente reclasificado como *Brevundimonas diminuta* (*B. diminuta*) se encuentra registrado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC con el número 19146 (3,4). Es el microorganismo estándar para las pruebas de reto bacteriano (5).

Laboratorios Liorad es un conjunto de instalaciones tecnológicas y facilidades auxiliares, destinadas a la producción de parenterales líquidos y liofilizados. Dispone de un laboratorio del control de la calidad microbiológico, donde se encuentra depositada *B. diminuta*, conservada por el método de congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, replicada en el medio de cultivo Caldo Lactosa Salina (CLS).

A pesar de que la literatura refiere como uno de los métodos estándares para la conservación de esta cepa el CLS (6), los resultados de viabilidad obtenidos al estudiar su estabilidad en tiempo real mostró que esta metodología no resulta la más conveniente, por tal motivo apremia la necesidad de evaluar otra estrategia de conservación para este microorganismo, con lo cual se brindaría una alternativa y solución al problema relacionado con su conservación (7,8).

Para dar cumplimiento a esta problemática y garantizar que esta cepa sea almacenada en óptimas condiciones por largos periodos de tiempo, el presente trabajo tiene como objetivo formular otra variante para su conservación: el Caldo Triptona Soya (CTS) como medio de crecimiento, la leche descremada al 20% como sustancia lioprotectora y la liofilización como método de conservación.

Esta variante resultó una excelente opción para la conservación de la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* depositada desde hace cinco años en la colección del laboratorio.

Materiales y Métodos

Acervo microbiano: El ámpula original de la cepa *B. diminuta* ATCC 19146 fue adquirida por Laboratorios Liorad y depositada en la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Control Microbiológico.

Recuperación de la cepa microbiana: Para la obtención del banco primario se restituyó con 1 mL de medio de cultivo Caldo Triptona Soya (CTS) (Biocen, Cuba). De la suspensión del microorganismo se diseminaron en forma de césped 20 μL , en una placa de Triptona Soya Agar (TSA), (Biocen, Cuba) y se incubó a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Con un asa de platino estéril se tomaron de dos a tres de las colonias crecidas y se resuspendieron en 5 mL de CTS para comprobar su pureza (9,10).

* Máster en Ciencias, Licenciada en Microbiología.

Conservación de la cepa microbiana: Con un hisopo estéril se tomó un cuarto del césped crecido sobre la superficie de la placa de TSA, se inoculó un Erlenmeyer que contenía 100 mL de CTS y se incubó a 37 °C en zaranda a 150–170 rpm durante 2 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la biomasa con CTS; se tomó 1 mL de la suspensión para realizar posteriormente el ensayo de viabilidad antes de liofilizar (11).

De forma homogénea se distribuyó 1 mL de la suspensión de este microorganismo en bulbos 6R estériles y se adicionó igual cantidad de leche descremada al 20% como sustancia lio protectora para su conservación (12).

Los tapones se colocaron sobre la boca de los bulbos y estos sobre la bandeja de una liofilizadora experimental de laboratorio (marca Edward, modelo Modulyo). Una vez concluido el proceso, los bulbos se sellaron al vacío y se identificaron 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 (13).

Controles de calidad de las cepas liofilizadas (Tiempo cero)

Comprobación de las características culturales y morfológico-tintoriales: El contenido de un bulbo de la cepa liofilizada se transfirió a un tubo con 20 mL de CTS que fue colocado en zaranda con agitación durante 2 h a una temperatura de 37 °C. Transcurrido este tiempo 0,1 mL del cultivo se inoculó en una placa de TSA, la cual fue incubada a 37 °C por 24 h. Tras el periodo de incubación se comprobó la pureza del cultivo al observar las características macroscópicas de las colonias crecidas, como forma, tamaño y color, y las características microscópicas por tinción de Gram (14).

Comprobación de las características bioquímicas: La caracterización bioquímica de la cepa se realizó mediante la determinación de la enzima citocromo oxidasa, fermentaciones de glucosa, manitol, sorbitol, sacarosa, inositol y rafinosa; descarboxilación de lisina y arginina; utilización del citrato y el malonato; hidrólisis de la urea y de la O-N-galactosidasa (ONPG). Para los ensayos se empleó un sistema colorimétrico (Integral System), para la identificación de bacterias gramnegativas (15). Para la comprobación de la motilidad se utilizó el Medio Motilidad, preparado en tubos a razón de 10 mL y solidificado en columna; se realizó una siembra por punción central hasta una profundidad de 5 cm y se incubó durante 48 h a 37 °C (16).

Ensayo de viabilidad: Al concluir el proceso de liofilización se tomaron dos de los bulbos liofilizados, se restituyeron con 2 mL de CTS. De cada bulbo se tomó 1 mL y se añadió a un

tubo con 9 mL de solución salina, considerándose esta la dilución 10^{-1} . A partir de aquí se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-8} en tubos con 9 mL de solución salina. Las cuatro últimas diluciones se sembraron por triplicado a razón de 1 mL/placa mediante el método de placa vertida. Se incubaron las placas a temperatura de 37 °C durante 48 h. Transcurrido el periodo de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en la superficie del medio de cultivo agarizado, se escogió la dilución donde el número de unidades formadoras de colonias estaba entre 100 y 200. En la dilución seleccionada se calculó la media del número de unidades formadoras de colonias contadas (17).

El criterio de aceptación que se tuvo en cuenta para este ensayo fueron los niveles de viabilidad igual o mayor al orden de 10^5 UFC/mL. Se siguió la misma metodología para realizar la viabilidad a la muestra de la suspensión bacteriana antes de liofilizar.

Los cálculos se realizaron según la fórmula:

$$V = (X * F) / C$$

Dónde:

- V: Viabilidad
- X: Promedio de las UFC contadas en las tres placas
- F: Factor de dilución (de las placas seleccionadas)
- C: Volumen sembrado en mL

Eficacia del método de conservación: *B. diminuta* fue depositada en la colección del Laboratorio de Control Microbiológico. La estabilidad en tiempo real se evaluó con una frecuencia trimestral durante los primeros 12 meses y al finalizar este estudio a los 24 meses de conservación. Los ensayos de viabilidad y pureza se realizaron según la metodología descrita en la United States Pharmacopeia 30th ed. (USP30) (17), incluida en los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO), vigentes en el Laboratorio para el Control de Calidad de las cepas. El criterio de aceptación tomado es la obtención de cultivos puros con un orden de viabilidad mayor a 10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y la obtención de cultivos puros (17).

Resultados y Discusión

Los resultados de la evaluación de las características morfológico-tintoriales y culturales de la cepa, una vez concluido el proceso de liofilización, se corresponden con el microorganismo en estudio. Las colonias observadas fueron de pequeño a mediano tamaño, redondeado, grisáceo, de consistencia homogénea y brillante.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se realizaron como parte del control de la calidad de la cepa liofilizada. Se

evidencia que la cepa microbiana en presencia de los azúcares ensayados mostró reacciones negativas en todos los casos, ya que no posee la enzima que permite metabolizar los mismos (Tabla 1). Este es un comportamiento descrito en bibliografía como característico de los microorganismos no fermentadores (18).

De igual forma, no posee la capacidad enzimática para descarboxilar los aminoácidos lisina y arginina. Tampoco es capaz de emplear el citrato y el malonato como única fuente de carbono ni posee la capacidad de hidrolizar la urea y la O-N galactosidasa.

El crecimiento en el medio fluido para la detección de motilidad mostró resultado positivo al observarse una zona difusa con enturbiamiento del medio alrededor del sitio de la inoculación, lo que demostró la presencia de flagelo polar. La reacción de la oxidasa resultó positiva, lo que muestra que posee la enzima citocromo oxidasa.

Con respecto a la viabilidad realizada inicialmente, los valores obtenidos antes y después de la liofilización fueron de $3,1 \times 10^9$ UFC/mL y $3,8 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente. Como se puede apreciar, ambos valores sobrepasan el criterio de evaluación establecido (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 del cultivo liofilizado.

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas de la cepa *B. diminuta* (ATCC19146).

Identificación bioquímica	Resultados de las reacciones bioquímicas
Descarboxilación de la lisina	(-)
Descarboxilación de la arginina	(-)
Utilización del citrato	(-)
Utilización del malonato	(-)
Hidrólisis de la urea	(-)
Hidrólisis de ON-galactosidasa (ONPG)	(-)
Fermentación de la glucosa	(-)
Fermentación del manitol	(-)
Fermentación del sorbitol	(-)
Fermentación del inositol	(-)
Fermentación de la sacarosa	(-)
Fermentación de rafinosa	(-)
Motilidad	(+)
Oxidasa	(+)

Tabla 2. Resultados del estudio de viabilidad de la cepa *B. diminuta* (ATCC19146) conservada en leche descremada al 20% por un periodo de 24 meses.

Viabilidad (UFC/mL)					
<i>B. diminuta</i> (ATCC19146)	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	24 meses
		$2,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$

La estabilidad en tiempo real de *B. diminuta* aparece durante un periodo de 24 meses (Tabla 2).

Al comprobar las características fisiológicas y bioquímicas de la cepa liofilizada se puede plantear que coincide con lo reportado en el certificado de calidad de la cepa *B. diminuta* entregado por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), lo que nos permite plantear que las características bioquímicas, morfológico-tintoriales y culturales se corresponden con el microorganismo en estudio (3).

Los resultados de viabilidad obtenidos en este trabajo nos permiten inferir que la elección del método de conservación empleado fue efectivo, coincidiendo con lo planteado por Escobar (19). La liofilización resultó una variante excelente para la conservación de esta cepa. Al comparar los resultados de la viabilidad en igual periodo de tiempo de *B. diminuta* con la *Pseudomonas aeruginosa*, depositada en la colección del laboratorio y conservada bajo idéntica metodología, llama la atención que existe una disminución en un orden de la viabilidad de dos unidades a los 9 meses de conservación en *B. diminuta*, no así en *Pseudomonas aeruginosa* que mantuvo un valor de viabilidad de $1,6 \times 10^8$ UFC/mL. Este resultado se puede atribuir al aditivo añadido, ya que algunos autores hacen referencia a que se deben añadir mezclas de sustancias lioprotectoras.

Los resultados de viabilidad obtenidos en este trabajo por el método de liofilización permiten corroborar lo reportado internacionalmente por varios autores (12) que han señalado que no existe un método único para la conservación de los cultivos microbianos; el método ideal es el que pruebe adecuadamente su validez en el mantenimiento de las características morfológicas y fisiológicas (13).

La evaluación de la estrategia utilizada para la preservación de la cepa *B. diminuta* durante el tiempo objeto de estudio resultó satisfactoria. No obstante, se recomienda continuar estudios a largo plazo y, además, realizar uno añadiendo otros aditivos para la liofilización y comparación con los resultados obtenidos en este trabajo.

Referencias

- Morales YE, Duque E, Rodríguez O, De la Torre J, Martínez RD, Pérez R, et. al. Bacterias Preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Rev. Biotecnología Aplicada 2010;4(2):11-29.

2. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Argent Microbiol 1998;30:42-51.
3. American Type Culture Collection. Certificate of Analysis Microbiology Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Certificate Upon Initial Release. *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146. Manassas, Virginia, EEUU: American Type Culture Collection; 2003
4. ATCC Technical Bulletin No. 6 Reference strains: How many passages are too many? Reprinted from ATCC Connection 2003; 23(2):6-7.
5. Jordan G. Micro-Filtration in the Production of Parenterals. Bull Parenteral Drug Assoc 1959;13(2):21-4.
6. Fennington GJ, Howar G. Preparation and evaluation of bacterial stock for filter Validation. PDA. Journal of Pharmaceutical Science and Technology 1997;51(3):153-7.
7. World Federation of Culture Collections. World Federation for Culture Collections Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd ed. Manassas, Virginia, EEUU: World Federation of Culture Collections; 2010.
8. Palazon Z, Delgado AM. Estudio y desarrollo de un método de conservación de cepas. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana: Finlay Ediciones; 2006. Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>
9. Snell JJ. General Introduction to Maintenance Methods. En: Kirsop BE, Doyle A. (eds.). Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2da edición. London: Academic Press; 1991. p. 21-30.
10. Hawsworth DL, Sastramihardja I, Kokke R, Stevenson R. Guidelines for the Establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. WFCC Standards Committee. Richmond Surrey, UK: Simwort Press; 1990.
11. Weng Z, Díaz OE, Álvarez I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Rev Cubana Hig Epidemiol 2005;43(3):1-7.
12. Moreira T, Gutiérrez A, Delgado H. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. Biotecnología Aplicada 1994;11(2):113-7.
13. Stell KJ, Ross HE. Survival of freeze dried bacterial cultures. J Appl Microbiol 2008; 26(3):370-5.
14. Collins CH. Métodos Microbiológicos. España: Editorial Acribia; 1969.
15. Liofilchem Diagnostici. Integral System Enterobatteri Ref.71714; Code F00113: Colorimetric System for biochemical identification and susceptibility testing of enterobacteria. Roseto DA, Italy: Liofilchem Diagnostici; 2004.
16. Rojas N, Coto O, Pazos V. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología Clínica. Ciudad Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1987.
17. The United States Pharmacopeia, 30th ed. The National Formulary, 25th ed. USP30-NF25. Rockville: Mack Printing; 2007.
18. Prieto M. Bacilos gramnegativos no fermentadores (monografía en Internet). Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2006. Disponible en: [//www.aam.org.ar/actividades/T2-3.pdf](http://www.aam.org.ar/actividades/T2-3.pdf)
19. Escobar B, Llanes L, Parra M. Obtención de un stock de *Brevundimonas diminuta* utilizando un método alternativo de conservación. En: IV Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos. La Habana: Ediciones Finlay; 2006. Disponible en: <http://www.finlay.sld.cu/ediciones.htm>

Assessment of a preservation strategy for *Brevundimonas diminuta*

Abstract

Brevundimonas diminuta is internationally recognized as the standard micro-organism for bacterial challenge tests. The Quality Control Laboratory of Liorad Laboratories has a collection of reference strains, among them *Brevundimonas diminuta* are kept by the freezing method at -70 °C, replicated in Lactose Broth Saline (CLS) culture medium. This methodology was not the most convenient, that is why another strategy was assessed. Triptone Soy Broth was used as growth method, skim milk 20% as protective substance and lyophilization as preservation method. An adequate quality control, which included purity verification, viability and stability of the properties, was carried out. Results obtained during the 24 months of the stability study in real time, suggest that the chosen method would provide an alternative and solution to the problem of this strain preservation.

Keywords: *Brevundimonas diminuta*, stability, protective substance, liophilization.